

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

***Copaifera langsdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos
cromatográficos e análise sazonal**

João Paulo Barreto de Sousa

Ribeirão Preto

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

***Copaifera langsdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientado: João Paulo Barreto de Sousa

Orientador: Jairo Kenupp Bastos

Ribeirão Preto

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sousa, João Paulo Barreto

Copaifera langsdorffii: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal, 2011

179 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp

1. *Copifera langsdorffii*, 2. CLAE, 3. CG, 4. óleorresina, 5. fitoquímica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: João Paulo Barreto de Sousa

Título do trabalho: *Copaifera langsdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Jairo Kenupp Bastos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dimar José de Sousa

Maria Aparecida Barreto de Sousa

Jesus José Ferreira

Maria Eleuza Ferreira de Sousa

Lidiane Cristina Silva Barreto de Sousa

*“Palavras são difíceis de serem escritas para expressar o significado destas pessoas.
Portanto, utilizando-me de uma linguagem científica, apresento acima somente os nomes”.*

Agradecimento Especial

Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

“Muitíssimo obrigado por todas as oportunidades, ensinamentos e compreensão. Seguindo suas orientações os caminhos foram direcionados. A confiança, amizade e carinho sempre foram crescentes e nunca serão modificadas”.

Agradecimentos

À Deus, pela vida;

À toda família, repleta de pessoas boas e compreensivas;

Aos amigos Niede e Paulo, fazem parte de nossas vidas, sempre passando carinho e afeto;

Aos amigos Fernando e Paulinha, pela valiosa confiança e divertidas discussões;

Aos amigos que na atualidade são exímios Professores Doutores: Sérgio Ambrósio, Sérgio Faloni, Ademar, Luiz Elídio, Nilton, Gustavo, Ricardo, Juliana, Marley, Fábio, muito obrigado por todos os ensinamentos, experiências e compreensão;

Ao amigo Prof. Dr. Ademilson Espencer E. Soares, muito obrigado por toda amizade e confiança;

Ao amigo Prof. Dr. Mateus e sua nova família, é caro amigo agora é a hora, parabéns;

Ao amigo Prof. Alexandre Pinty, perto de suas palavras: amizade e confiança devem ser conquistadas, valeu;

Aos amigos Renata, Willian, Ana, Rejane, Eliane, Mariza, Daniela, Bruno, Juliana, Ricardo, Mauro, Cristiane, Vanessa, Juliana C., obrigado pelo entendimento e ótimo convívio durante as disciplinas e no dia-a-dia no laboratório;

Aos amigos e pesquisadores Cássia Mizuno, Henrique e família, surpreendentemente bom conhece-los. Exemplos de muita força, perseverança e solidariedade. Nunca esqueceremos. Muito obrigado;

Aos amigos e pesquisadores Lourival e família, Cerdeira e Rita, nós agradecemos pela ótima aceitação e apoio. Certamente continuaremos nossas “fortes reuniões”, preferencialmente, com blue moon;

To Prof. Dr. Dhammika Nanayakkara and family, thank you for all the teachings, we thank you for help, understanding and the dinners in his home. All very good;

To Tibba, Redy, Malikka, Rangedy and Atish, thanks for the acceptance and good relationships;

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica, Prof. César, Ana Cris, Alcides, Nadir, Ingrid, Cadu;

Ao pessoal do Laboratório de Química Orgânica, Lopes, Gobbo, Tomás, Cris, Giba;

Ao pessoal do Laboratório de Química Farmacêutica, Porfa. Mônica, Denise, Warley, Cláudia, Keyler, Adriana, Noemi;

Ao Prof. Luíz Alexandre - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica;

À Profa. Maria José e Yris Fonseca do Laboratório de Controle de Qualidade;

Aos Técnicos do Laboratório de Farmacognosia, Valter Lopes, Mário e João G.;

Ao programa de Pós-Graduação da FCFRP – USP e aos funcionários Rosana, Eleni, Ana;

A todos os funcionários e ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Agradecemos a ampla disponibilidade de infra-estrutura, bem como a significativa credibilidade em nosso trabalho por meio de excelentes suportes financeiros tais como bolsas e projetos regulares:



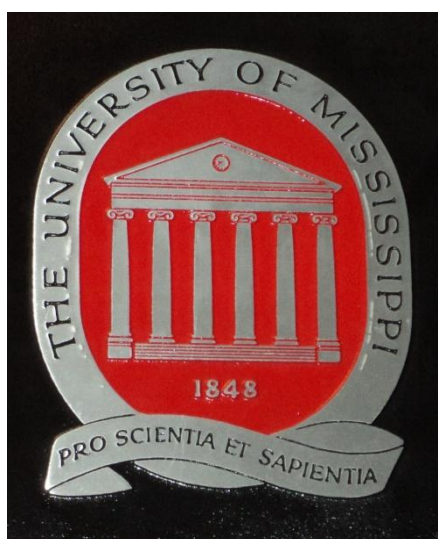
Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Mestrado: 04/13004-1; Doutorado: 06/59893-0; Projetos regulares: Nº 01/14219-7; Nº 08/57775-6.



University of Mississippi

National Center for Natural Products Research

RESUMO

SOUSA, J. P. B. ***Copaifera langsdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal.** 2011. 179 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Copaíbas referem-se às grandes árvores que crescem, principalmente, nos estados do Amazonas, Pará, Ceará e no norte do Brasil. *Copaifera langsdorffii* pode ser encontrada em praticamente todas as regiões do Brasil. Amostras de óleorresina, especialmente àquelas obtidas da *C. langsdorffii*, têm sido utilizadas na medicina popular como anti-inflamatório, antiséptico urinário e cicatrizante. Além disso, o extrato hidroalcoólico das folhas desta árvore despertou a atenção do nosso grupo por apresentar propriedades antilinfáticas. Portanto, os objetivos do presente trabalho foram: investigar a composição química de amostras de *C. langsdorffii*; desenvolver e validar métodos cromatográficos capazes de quantificar os principais componentes presentes nas amostras de *C. langsdorffii* e avaliar a influência da sazonalidade no perfil químico dos extratos hidroalcoólicos da espécie. Para os estudos fitoquímicos foram utilizados os processos de maceração e percolação para obtenção dos extratos. Extratos brutos e respectivas frações foram analisados e fracionados por técnicas cromatográficas em camada delgada e em colunas de sílica gel. Os compostos promissores foram purificados por CCDF e CLAE na escala semipreparativa. As estruturas químicas destes compostos foram elucidadas por RMN de ^1H e ^{13}C . O método analítico para avaliar o extrato hidroalcoólico foi desenvolvido por CLAE/UV-DAD. Neste sentido, foi desenvolvido protocolo para preparação da amostra, no qual envolve agitação, temperatura e a utilização de solução etanólica a 70% como solvente extrator. Na análise sazonal, alíquotas das folhas da espécie foram coletadas mensalmente durante 14 meses. CG/EM e CG-DIC foram utilizadas para identificação e desenvolvimento de método, considerando os principais compostos voláteis presentes no óleo e nas folhas. Para tanto, aparelho tipo Clevenger foi utilizado para obtenção destes voláteis. Na investigação fitoquímica 13 compostos foram isolados e identificados e 12 sesquiterpenos foram identificados. Dentre os voláteis destacam-se α -copaeno, β -cariofileno, α -humuleno e óxido de cariofileno. O ácido caurenóico foi isolado do óleorresina e dos extratos das folhas, flores e frutos da *C. langsdorffii*. O ácido copálico e seus derivados foram obtidos do fracionamento com o óleorresina. O fracionamento dos extratos obtidos das folhas, flores e frutos também resultou no isolamento dos ácidos *ent*-labda-7,13-dien-15-óico e 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-óicos. Dois flavonóis, 3-O- α -ramnopiranosil-quercetina e 3-O- α -ramnopiranosil-canferol foram isolados dos extratos hidroalcoólicos das folhas da espécie. O éter 2-hidróxifenilvinil etílico foi isolado do extrato dos frutos. A partir da reação de derivatização com algumas amostras obtiveram-se o caurenóico de metila, 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-oato de metila e o 4-metóxi-cinamoato de etila. O método por CLAE permitiu a quantificação de cinco flavonóis: rutina, 3-O- α -ramnopiranosil-quercetina, 3-O- α -ramnopiranosil-canferol, quercetina e canferol. Este método apresentou recuperação média de 97%. As análises qualitativas sazonais dos extratos hidroalcoólicos das folhas indicaram a presença de 3-O- α -ramnopiranosil-quercetina, 3-O- α -ramnopiranosil-canferol durante todo período de estudo. Nas análises quantitativas, estes dois flavonóis apresentaram teores médios de 1,8 e 1,0%, respectivamente. O método desenvolvido por CG-DIC detectou e quantificou α -copaeno, β -cariofileno, α -humuleno em óleo de copaíba e no óleo essencial das folhas. Para ambos os métodos validados, os parâmetros de seletividade, LOD, LOQ, exatidão, precisão e robustez apresentaram resultados satisfatórios. De modo geral, as composições químicas das amostras estudadas são semelhantes. Os métodos validados podem ser utilizados como ferramentas analíticas no controle de qualidade do óleo de copaíba, extratos e derivados.

Palavras-chave: *Copifera langsdorffii*, CLAE, CG, óleorresina, fitoquímica.

ABSTRACT

SOUSA, J. P. B. ***Copaifera langsdorffii*: phytochemical study, chromatographic method validation and seasonality role.** 2011. 179 p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Copaiba refers to large trees that grow mainly in the states of Amazonas, Pará, Ceará and northern Brazil. *Copaifera langsdorffii* can be found in almost all regions of Brazil. Samples of its oilresin, especially one obtained from *C. langsdorffii* have been used in folk medicine as anti-inflammatory, antiseptic, urinary antiseptic and wound healing. In addition, the hydroalcoholic leaves extract of this tree has drawn the attention of our research group because of its antilithiasic properties. Therefore, the goals of this work were: to investigate the chemical profile of samples of *C. langsdorffii*; to develop and validate chromatographic methods capable of quantifying the main components present in the samples of *C. langsdorffii*; to evaluate the influence of seasonality in the chemical profile of the ethanolic extracts of this species. For preparation of the extracts maceration and percolation were used. Crude extracts and fractions were analyzed and fractionated by thin layer chromatography and silica gel column chromatography. Promising compounds were purified by HPLC and preparative TLC. The chemical structures of the isolated compounds were elucidated by ^1H NMR and ^{13}C . The method for the analysis of the hydroalcoholic extract was developed by HPLC/UV-DAD. Also, a protocol for sample preparation was also developed, including shaking, temperature and ethanol 70% as solvent extractor. For the seasonal analysis, aliquots from the leaves of trees were collected monthly for 14 months. GC/MS and GC-FID was used to identify and develop the method, considering the main volatile compounds present in the oil and leaves. For both, Cleverger type apparatus was used to obtain these volatiles. The phytochemical study led to the isolation and identification of 13 compounds. Also, 12 sesquiterpenes were identified, including α -copaene, β -caryophyllene, α -humulene and caryophyllene oxide. Kaurenoic acid was isolated from oilresin and from the extracts of leaves, flowers and fruits of *C. langsdorffii*. Copalic acid and its derivatives were obtained by fractionation of the oilresin. Fractionation of extracts from leaves, flowers and fruits also resulted in the isolation of *ent*-labda-7,13-dien-15-oic acid and 2-hydroxy-*ent*-labda-7,13-dien-15-oic acid. Two flavonols, 3-O- α -rhamnopyranosyl-quercetin and 3-O- α -rhamnopyranosyl-kaempferol were isolated from the hydroalcoholic extracts of the leaves of this species. The 2-hydroxyphenylvinyl ethyl ether was isolated from the extract of the fruits. The some fraction was derivatized furnishing methyl kaurenoate, methyl 2-hydroxy-*ent*-labda-7,13-dien-15-oate and the 4-methoxy-ethyl cinamoate. The developed HPLC method allowed the quantification of five flavonols: rutin, 3-O- α -rhamnopyranosyl-quercetin, 3-O- α -rhamnopyranosyl-kaempferol, quercetin and kaempferol. This method showed average recovery of 97%. The qualitative analysis of seasonal variation in the hydroalcoholic extracts of leaves indicated the presence of 3-O- α -rhamnopyranosyl-quercetin and 3-O- α -rhamnopyranosyl-kaempferol throughout the studied period. Regarding the quantitative analysis, these two flavonols showed average levels of 1.8 and 1% respectively. The method developed by GC-FID detected and quantified α -copaene, β -caryophyllene, α -humulene in copaiba oil and leaves essential. For both validated methods, the parameters of selectivity, LOD, LOQ, accuracy, precision and robustness showed satisfactory results. In general, the chemical compositions of the studied samples are similar. The developed validated methods can be used as analytical tools for the quality control of copaiba oil, its extracts and products.

Keywords: *Copaifera langsdorffii*, HPLC, GC, oilresin, phytochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	A coloração verde ilustra os locais onde gênero <i>Copaifera</i> é encontrado	5
Figura 2:	Numeração e estereoquímica comuns aos esqueletos diterpênicos: caurano, clerodano e labdano	6
Figura 3:	Sesquiterpenos e diterpenos comuns ao óleo-resina da copaíba	8
Figura 4:	Coléteres nas folhas de <i>C. langsdorffii</i>	10
Figura 5:	Amostras de óleo-resina em tubos com capacidade de 10 mL	11
Figura 6:	Resumo gráfico com destaque para as etapas desenvolvidas com a espécie em estudo.....	12
Figura 7:	Cromatografia em coluna clássica para o fracionamento do extrato das flores	22
Figura 8:	Purificação de compostos por CCDP.....	23
Figura 9:	Coluna com Sephadex® LH 20 durante a realização do fracionamento da amostra	26
Figura 10:	Cromatógrafo de fase líquida.....	26
Figura 11:	Perfis cromatográficos analíticos apresentando a separação dos componentes CL 10 e CL 11	28
Figura 12:	Ao lado esquerdo esquema demonstrando os recipientes. Ao lado direito <i>Diazald Kit – Sigma Aldrich</i>	31
Figura 13:	Em destaque apresenta-se a <i>C. langsdorffii</i> ao lado do Laboratório de Farmacognosia.....	42
Figura 14:	Em destaque apresenta-se a <i>C. langsdorffii</i> nas proximidades do Lago no Campus da USP, FFCLRP	42
Figura 15:	Perfil cromatográfico da fração aquosa por CLAE em 257 nm.....	45
Figura 16:	Composto polar purificado eluindo-se com fase móvel consistindo de 95% de água e 5% metanol, sob gradiente linear	46
Figura 17:	Distintas fases estacionárias na purificação de polares	47
Figura 18:	Exemplo representativo do isolamento de CL Y	47
Figura 19:	Aspecto físico de CL Y	48
Figura 20:	Espectro de RMN de ¹ H obtido de CL Y (DMSO-d ₆ /400 MHz).....	48
Figura 21:	Espectro de RMN de ¹³ C obtido de CL Y (DMSO-d ₆ /100 MHz)	49

Figura 22:	(A) Perfil cromatográfico dos voláteis das folhas de <i>C. langsdorffii</i> por CG – DIC; (B) Substâncias avaliadas para escolha do padrão interno; (C) Perfil destes voláteis com adição de a: TMB	51
Figura 23:	(A) Perfil cromatográfico dos padrões de hidrocarbonetos. (B) Perfil da amostra obtida das folhas de copaíba. (C) Co-injeção, amostra com adição dos padrões de hidrocarbonetos	52
Figura 24:	Estruturas químicas dos constituintes identificados por CG/EM	54
Figura 25:	Perfis cromatográficos comparativos de amostras de <i>C. langsdorffii</i>	55
Figura 26:	Composição química da fração 1 – CLV	56
Figura 27:	Sesquiterpeno e diterpenos isolados e identificados do óleo-resina	58
Figura 28:	Componentes isolados do extrato obtido dos frutos	60
Figura 29:	Análise por CCDC dos extratos das flores e frutos	61
Figura 30:	Composição química do extrato obtido das flores.....	61
Figura 31:	Análise por CCDC das SFrações obtidas do fracionamento descrito no esquema 3.....	62
Figura 32:	Compostos isolados da fração em acetato de etila obtida das folhas	63
Figura 33:	Ácido caurenóico obtido da <i>C. langsdorffii</i>	64
Figura 34:	Análise por CCDC visando obtenção de CL X	65
Figura 35:	Perfis por CCDC, demonstrando o antes e depois da derivatização.....	66
Figura 36:	Análise por CCDC das frações obtidas durante o processo de purificação da amostra derivatizada	67
Figura 37:	Derivados metilados obtidos das partes aéreas da <i>C. langsdorffii</i>	68
Figura 38:	Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico obtidos das folhas de <i>C. langsdorffii</i> em 257 nm	80
Figura 39:	Perfis cromatográficos dos compostos avaliados para a escolha dos padrões interno e secundário	82
Figura 40:	Estruturas químicas: benzofenona (pi) e piperonal (ps)	82
Figura 41:	Estruturas químicas dos flavonóis envolvidos na validação do método	83
Figura 42:	Perfil cromatográfico dos flavonóis estudados neste método (257 nm)	84
Figura 43:	Perfis cromatográficos das amostras em 257 nm	86
Figura 44:	Estudo de linearidade para rutina	88
Figura 45:	Estudo de linearidade para quercitrina	89

Figura 46:	Estudo de linearidade para 3-O- α -ramnopiranosil-canferol.....	90
Figura 47:	Estudo de linearidade para quercetina	91
Figura 48:	Estudo de linearidade para canferol	92
Figura 49:	Estudo de linearidade para benzofenona (pi)	93
Figura 50:	Estudo de linearidade para piperonal (ps)	94
Figura 51:	Curvas analíticas em triplicatas para estimativa dos limites de detecção e quantificação	96
Figura 52:	Curvas analíticas em triplicatas para estimativa dos limites de detecção e quantificação	97
Figura 53:	Curvas analíticas em triplicatas para estimativa dos limites de detecção e quantificação	98
Figura 54:	Matriz esgotada após ser submetida à extração com aparelho de Soxhlet....	103
Figura 55:	Efeitos dados pelo CV (%) para quercitrina	110
Figura 56:	Efeitos dados pelo CV (%) para 3-O- α -ramnopiranosil-canferol.....	110
Figura 57:	Ramos com flores da <i>C. langsdorffii</i>	112
Figura 58:	Destaque para as flores da espécie em estudo	113
Figura 59:	Fruto maduro da <i>C. langsdorffii</i>	114
Figura 60:	Em único ramo é possível observar, frutos verde, seco e fruto se abrindo, liberando a semente	114
Figura 61:	Destacam-se as sementes retiradas dos frutos	115
Figura 62:	Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico das flores	116
Figura 63:	Perfis cromatográficos dos extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>C.</i> <i>langsdorffii</i> obtidos para o estudo sazonal.....	119
Figura 64:	Análises quantitativas para quercitrina e 3-O- α -ramnopiranosil-canferol	120
Figura 65:	Perfil cromatográfico por CG-DIC dos compostos padrões.....	125
Figura 66:	Perfil cromatográfico por CG-DIC de três frações voláteis obtidas do óleo de copaíba.....	126
Figura 67:	Curvas analíticas de todos os compostos em análise.....	129
Figura 68:	Curvas analíticas utilizadas na determinação de LOD e LOQ.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimentos obtidos de cada fração por processo de partição.....	25
Tabela 2: Fatores e níveis investigados no teste de robustez considerando CLAE	39
Tabela 3: Fatores e níveis investigados no teste de robustez considerando CG-DIC.....	39
Tabela 4: Planejamento fatorial para onze fatores e doze experimentos.....	40
Tabela 5: Planejamento fatorial para sete fatores e oito experimentos.....	40
Tabela 6: Dados utilizados para a identificação dos componentes voláteis.....	53
Tabela 7: Dados de ¹³ C para o sesquiterpeno e diterpenos	72
Tabela 8: Dados de ¹³ C para flavonóis.....	76
Tabela 9: Dados de ¹³ C para 4-metóxi-cinamoato de etila e éter 2-hidróxifenilvinil etílico ...	78
Tabela 10: Respostas que compõem a seletividade do método.....	85
Tabela 11: Parâmetros das curvas analíticas.....	95
Tabela 12: Estimativas de LOD e LOQ para os padrões	99
Tabela 13: Repetibilidade.....	100
Tabela 14: Precisão intermediária realizada no 1º dia.....	101
Tabela 15: Precisão intermediária realizada no 2º dia.....	102
Tabela 16: Determinação da recuperação e exatidão para rutina	104
Tabela 17: Determinação da recuperação e exatidão para quercitrina.....	105
Tabela 18: Determinação da recuperação e exatidão para 3-O- α -ramnopiranosil-canferol	106
Tabela 19: Determinação da recuperação e exatidão para o canferol.....	107
Tabela 20: Determinação da recuperação e exatidão para quercetina.....	108
Tabela 21: Respostas que compõem a seletividade do método ($n = 5$).....	125
Tabela 22: Parâmetros das curvas analítica dos compostos em estudo ($n = 3$)	127
Tabela 23: Limites operacionais de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) ($n = 3$)	131
Table 24: Precisão, recuperação e exatidão do método.....	132
Table 25: CV (%) obtidos para o teste de robustez do método cromatográfico ($n = 3$)	134
Tabela 26: Quantificação dos sesquiterpenos em distintos óleos de copaíba disponíveis comercialmente ($n = 3$).....	135

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AcOEt – acetato de etila
CCDC – cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa
CG – cromatografia de fase gasosa
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
CLV – cromatografia líquida a vácuo
CN – grupo ciano
C-ram – 3-O- α -ramnopiranosil-canferol
CV – coeficiente de variação
 δ - deslocamento químico (em ppm)
DAD – detector com arranjo de diodos
DCM – diclorometano
d – dubleto
dd – duplo dubleto
DIC – detector de ionização de chamas
DMSO – dimetilsulfóxido
DP – desvio padrão
EM – espectrometria de massas
EtOH: Etanol
Hex - hexano
HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HMQC – *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*
IR – índice de retenção
J – constante de acoplamento (em Hz)
m – multiplete
MeCN – acetonitrila
MeOH – metanol
mM – concentração em milli-molar
PA – para análise
pi – padrão interno
ppm – partes por milhão
ps – padrão secundário
Q-ram – quercitrina
RMN de ¹³C – Ressonância magnética nuclear de ¹³C
RMN de ¹H – Ressonância magnética nuclear de ¹H
rpm – rotações por minuto
SFração – subfração
s – singleto
t – tripleto
TMB – 1,2,4,5-tetrametilbenzeno
TR – tempo de retenção
UV – ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vi
Lista de símbolos e abreviaturas	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações iniciais	1
1.2 Aspectos sobre o gênero <i>Copaifera</i> L	4
1.3 O óleo de copaíba	6
1.4 <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf	9
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Conceitos gerais	14
3.2 Amostras de <i>Copaifera langsdorffii</i>	15
3.2.1 Extratos brutos	16
3.3 Metodologias para caracterizações químicas de amostras da <i>C. langsdorffii</i>	17
3.3.1 Óleoresina	17
3.3.2 Avaliação dos compostos voláteis	18
3.3.3 Extratos brutos dos frutos e flores	20
3.3.4 Extrato bruto das folhas	23
3.3.5 Metilação de amostras com reagente diazometano	31
3.4 Desenvolvimento dos métodos de análise e extração	32
3.4.1 Métodos de extração e análise dos extratos hidroalcoólicos das folhas	32
3.4.2 Métodos de obtenção e análise dos óleos essenciais	33
3.5 Características de desempenho para validação dos métodos cromatográficos	34
3.6 Metodologias para avaliar a sazonalidade de compostos fixos	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
4.1 Fase inicial	44
4.2 Voláteis da <i>C. langsdorffii</i> : rendimento, análise e identificação	49
4.3 Sesquiterpeno e diterpenos obtidos do óleoresina da <i>C. langsdorffii</i>	57
4.4 Caracterizações químicas dos extratos dos frutos, flores e folhas da <i>C. langsdorffii</i>	59
4.4.1 Elucidação estrutural dos compostos purificados	68
4.5 Validação do método por CLAE/UV-DAD	79
4.6 Influência da sazonalidade	111
4.7 Validação de método por CG-DIC	122
4.8 Considerações finais	136
5. CONCLUSÕES	139
6. REFERÊNCIAS	141
APÊNDICES	151

1. Introdução

1.1 Considerações iniciais

A comunidade científica mundial está fortemente presente na descoberta de produtos naturais biologicamente ativos. Excelentes pesquisas demonstram que as plantas medicinais, na sua forma *in natura*, como tinturas ou extratos, apresentam potenciais terapêuticos para o desenvolvimento de novos produtos (KINGHORN; BALUNAS, 2005; NEWMAN; GRAGG, 2007). Neste sentido, grande parte da população do mundo confia no poder destas espécies vegetais como o primeiro recurso para cuidar da saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). As etapas e requerimentos para descoberta, desenvolvimento e comercialização destes produtos estão amplamente descritos na literatura (McCHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007). Historicamente, os produtos naturais são considerados como excelentes fornecedores de princípios ativos para benefício da saúde, sendo que mais de 90% das classes terapêuticas derivam de protótipos naturais (NEWMAN; GRAGG, 2007). Portanto, o contínuo estudo da composição química de matérias-primas naturais visando à proposição de novos princípios ativos é condição essencial para o desenvolvimento de novos medicamentos.

No âmbito das investigações fitoquímicas, merecem destaque a cromatografia, a espectrometria e a espectroscopia (PHILLIPSON, 2007). Há pelo menos 20 anos, os diferentes aparelhos de análise vêm sendo produzidos com novas tecnologias, tornando as técnicas analíticas mais sofisticadas. Por exemplo, a partir dos conceitos da ressonância magnética nuclear – RMN foi possível o desenvolvimento de técnicas como a correlação espectroscópica entre prótons hidrogênicos e correlação espectroscópica entre hidrogênicos e carbonos, as quais contribuem com mais eficiência para o entendimento sobre as conectividades entre prótons vizinhos e entre ligações de ^1H e ^{13}C (CLARIDGE, 1999). Em conjunto ao crescente desenvolvimento tecnológico foram sedimentadas as aplicações por

cromatografia de fase líquida de alta eficiência – CLAE, acoplada com diferentes detectores: ultravioleta com arranjo de diodo – UV-DAD, espectrometria de massas – EM e ressonância magnética nuclear – RMN, obtendo-se, por meio destas modalidades, compostos puros e informações sobre as estruturas químicas com maior rapidez e eficiência (BOHLIN; BRUHN, 1999; de RIJKE et al., 2006). Além destas, a cromatografia de fase gasosa com detector de ionização de chama, CG-DIC e acoplada à espectrometria de massas, CG/EM, já há algum tempo são consideradas a primeira escolha para análise de substâncias voláteis (MERFORT, 2002; BAKKALI et al., 2008). As cromatografias contracorrente de alta velocidade *HSCCC* e líquida de alta pressão *UPLC* ganham espaço na proposta de separações de compostos com grau de pureza adequado e em melhores quantidades (MARSTON, 2007; PAULI; SAMUEL; FRIESEN, 2008). A ionização por *electrospray* e o uso de diferentes analisadores contribuem na proposição dos perfis de fragmentações de diferentes compostos (KORFMACHER, 2005). Somados a estes fatores, os programas de computador também ganharam importância especial. As análises vêm sendo adquiridas com melhores informações (DENG; SANYAL, 2006). Por isso, as estruturas químicas puderam ser propostas com maiores níveis de confiança, já que a atribuição de sinais e a obtenção de dados ficaram mais precisas (FULLBECK et al., 2006). As bibliotecas eletrônicas de espectros também ficaram mais rápidas e com maior capacidade de armazenamento, possibilitando a realização de estudos comparativos com mais coerência, utilizando estruturas químicas parciais ou completas (de RIJKE et al., 2006; DENG; SANYAL, 2006).

A produção de medicamentos requer o desenvolvimento de métodos analíticos que ostentem o tripé segurança, eficácia e qualidade (CALIXTO, 2005). Neste sentido, o controle de qualidade e a padronização de produtos naturais, especialmente plantas, são importantes para estudar a influência da sazonalidade, selecionar a melhor população para o cultivo, determinar a melhor época de colheita, desenvolver processos de extração e formulação, analisar o produto final, bem como monitorar a qualidade destes produtos durante os ensaios pré-clínico e clínico. Depois do desenvolvimento de um novo

procedimento analítico e da sua implementação no sistema de controle de qualidade, a validação do método é requerida para garantir a credibilidade das medições químicas (FEINBERG, 2007). Neste contexto, as técnicas cromatográficas de alta resolução com fases líquida ou gasosa e eletroforese capilar têm sido extensivamente utilizadas em química analítica por apresentar vantagens como alta eficiência e rapidez (RIBANI et al., 2004).

Por meio de uma rápida e simples pergunta, em qualquer biblioteca eletrônica (Science Direct; Pub Med; Scirus) é possível definir a palavra validação considerando a literatura analítica. Taverniers, De Loose e Van Bockstaele (2004), destacaram o amplo uso desta palavra e divulgaram as diversas interpretações sugeridas por diferentes pesquisadores. Contudo, o termo validação em sua forma mais integrada significa ato ou efeito de validar, dar validade, tornar legítimo ou legal. Visa a diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão e inexatidão de um resultado obtido.

Durante o desenvolvimento de qualquer procedimento analítico o conhecimento sobre sua confiabilidade deve ser requerido. Portanto, é necessário que cada procedimento seja validado visando demonstrar ótima adequabilidade para o propósito exigido (SHABIR, 2003). O processo de validação o qual, normalmente é requerido pelas agências nacionais e internacionais, (GOWICK, 2009) é uma fase essencial para direcionar o uso diário do método e tem como objetivo principal fornecer produtos com alta credibilidade e com elevada aceitação comercial. Assim, a validação de um método, normalmente é realizada pela avaliação do desempenho analítico, o qual pode ser determinado pelos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Estes parâmetros de validação têm sido definidos por diferentes grupos de pesquisas (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; RIBANI; COLLINS; BOTTOLI, 2007) e comitês e/ou agências nacionais e internacionais como: ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), FDA (*Food and Drug Administration*), ICH (*International Conference on Harmonization*); ISO

(*International Organization for Standardization*) e AOAC (*Association of Official Analytical Chemistry*) (ROZET et al., 2007). Dentro do âmbito geral de metrologia química, estas agências e/ou comitês definem, praticamente, todos os critérios de validação.

1.2 Aspectos sobre o gênero *Copaifera* L.

O Brasil é bastante conhecido pela exuberância e a variedade de suas plantas tropicais. Ao longo dos tempos, muitas destas espécies vêm sendo utilizadas pela população nativa como remédios naturais visando à cura e ou tratamento de distintas doenças. Neste âmbito, o gênero *Copaifera* L. possui importância inestimável.

Inicialmente, quanto à classificação botânica, o gênero *Copaifera* pertence à família Leguminosae Juss. e subfamília Caesalpinoideae Kunth. Importante explicar que as Leguminosae eram denominadas, anteriormente por Faba. Considerando a nomenclatura botânica atual, Fabaceae Lindley dá lugar a Leguminosae Juss. Todavia, a classificação referindo-se apenas como Fabaceae ainda pode ser encontrada em alguns livros e publicações (JUDD et al., 1999; SANTOS et al., 2008a).

As plantas deste gênero são conhecidas popularmente como “copaíba ou copaibeiras”. A origem do nome copaíba pode ser atribuída ao tupi *cupa-yba*, “árvore de depósito”, ou que tem jazida em alusão ao óleo que guarda em seu interior. As copaibeiras são árvores de crescimento lento, alcançam de 5 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos. O tronco é áspero, de coloração escura, medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro. As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma semente ovóide envolvido por um arilo abundante e colorido. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arranjas em panículos axilares (VAN DEN BERG, 1982; PIO CORRÊA, 1984)

As copaíbas são árvores nativas da região tropical da América Latina e também da África Ocidental. Na América Latina são encontradas espécies na região que se estende do México ao norte da Argentina (VEIGA JR; PINTO, 2002). Conforme a última edição do Index

Kewensis (1996) o gênero *Copaifera* possui 72 espécies. No Brasil são encontradas facilmente nas regiões Amazônica e Centro-oeste. Entre as espécies mais abundantes, destacam-se: *C. officinalis* L., *C. guianensis* Desf., *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. confertiflora* Bth, *C. langsdorffii* Desf., *C. coriacea* Mart. e *C. cearensis* Huber ex Ducke (ANDRADE; FERRAZ; VEIGA JR, 2000). Na África Ocidental as espécies: *C. convertifolia*, *C. demeusii*, *C. coleosperma*, *C. conjugata*, *C. hymenaefolia*, *C. chodatiana* e *C. fissicuspis* são notadamente conhecidas (VEIGA JR; PINTO, 2002). Na figura 1 ilustra-se o mapeamento das localidades onde as espécies do gênero *Copaifera* são encontradas.

Quimicamente, o gênero *Copaifera* destaca-se por apresentar uma enorme diversidade de metabólitos secundários. Estudos realizados, especialmente com o óleo de copaibeiras, revelam em grande maioria a presença de sesquiterpenos e diterpenos (BRAGA, 1998; MORIM et al., 1986; PINTO et al., 1996). Dentre os diterpenos já descritos na literatura, todos pertencem aos esqueletos caurano, clerodano e labdano (Figura 2). (CASCON; GILBERT, 2000).

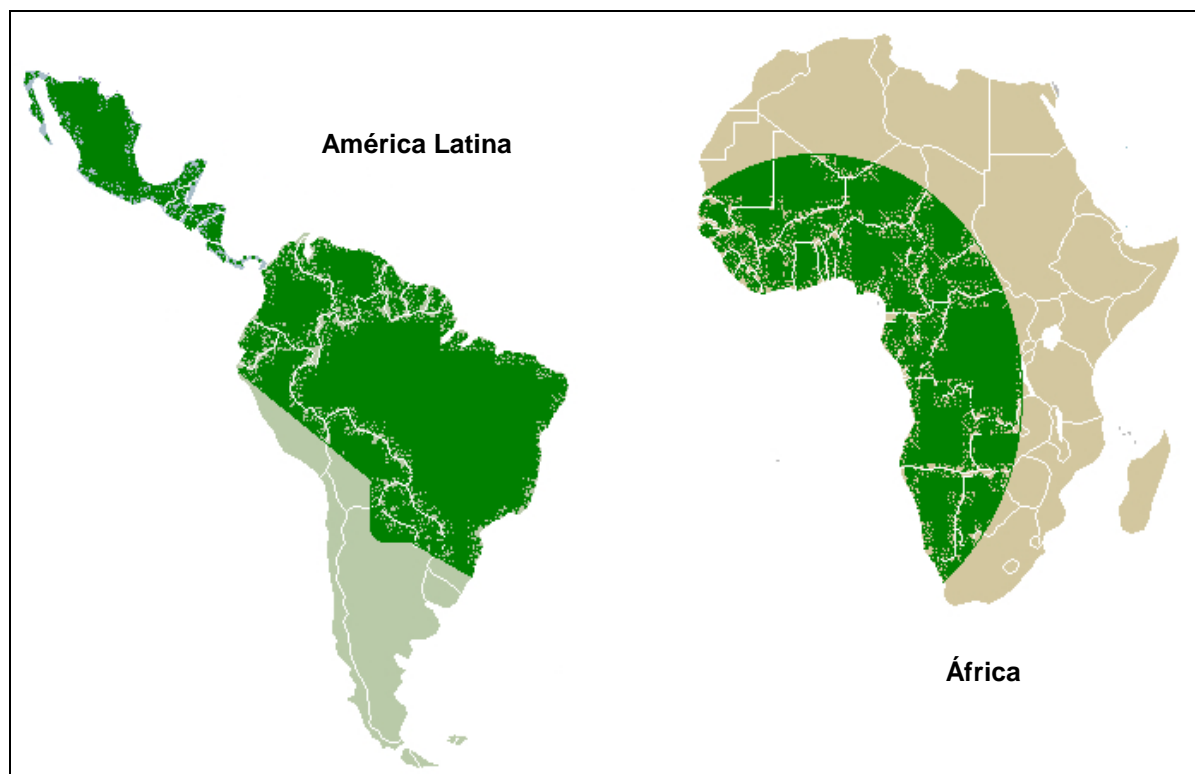


Figura 1: A coloração verde ilustra os locais onde gênero *Copaifera* é encontrado.

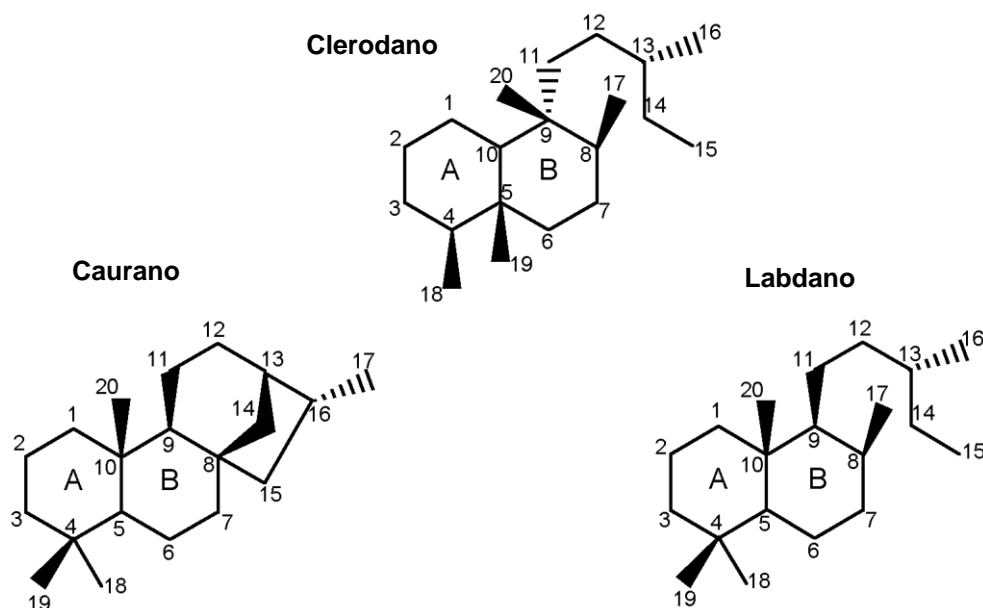


Figura 2: Numeração e estereoquímica comuns aos esqueletos diterpênicos: caurano, clerodano e labdano. Sistema decalínico representado pelos anéis A e B.

1.3 O óleo de copaíba

O óleo copaíba pode ser encontrado em mercados populares sendo conhecido por diferentes denominações, como: Copahyba, Copaibarana, Copaúba, Copaibo, Copal, Maram, Marimari e Bálsamo dos Jesuítas (RODRIGUES, 1989). Contudo, a designação correta para o óleo da copaíba é a de óleorresina, por ser um exsudato constituído por seiva formada por ácidos resinosos e compostos voláteis (BRUNETON, 1987, VEIGA JR et al., 2007). Visando o melhor contexto geral, as variações óleorresina ou óleo de copaíba serão admitidas no presente trabalho.

Dentre os produtos naturais que se destacam no país, o óleo de copaíba tem uma grande representação social e econômica, especialmente na região Amazônica onde é amplamente utilizado (VALDEVITE, 2007). Historicamente, o uso deste óleo já era bastante difundido entre os índios quando os primeiros exploradores portugueses chegaram ao Brasil. Acredita-se que sua primeira descrição como cicatrizante e anti-inflamatória data a época do descobrimento (RAMOS, 2006). A utilização deste óleorresina se perpetua até os

dias atuais. Na região Amazônica seu uso é tão extenso que a copaíba se destaca como a planta medicinal mais empregada e conhecida pela população. Em 1982 a produção de óleo de copaíba na Amazônia brasileira foi estimada em 200 ton/ano (ALENCAR, 1982). Pesquisa divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística revelou que este valor vem aumentando, atingindo em 2002 cerca de 400 toneladas (RAMOS, 2006). Este óleo é intensamente aplicado nas indústrias de perfumes e cosméticos, como loções capilares, fixador, cremes, sabonetes, entre outros, sendo utilizado também na indústria de vernizes e tintas (VEIGA JR; PINTO, 2002). Esta importância se reflete quanto ao número de patentes relacionadas à copaíba nas áreas de cosméticos e perfumaria (LION CORPORATION, 2000; AVEDA CORPORATION, 2000; KOSE CORPORATION; TANABE SEITAKU CORP LTDA, 2001; KAO CORPORATION, 2002), sendo algumas referentes a produtos para repelência e sanitários (RIFUSE:KK, 2001; HAYASE; RIFUSE; SUZUKI, 2002 e 2004) e outras com fins na terapêutica (GEROLANO; GIMENES, 1988 e HARGER, 2002).

Os estudos científicos atuais a partir do óleo de copaíba apresentam como base fundamental seu extensivo uso na medicina tradicional. Por isso, este óleorresina já foi submetido a diferentes ensaios experimentais apresentando atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, cicatrizante e contra o parasita *Leishmania amazonensis*. Também apresentou propriedades anticancerígena, antisséptica urinária e de repelência contra insetos. Além destas atividades, este óleo também foi avaliado para os tratamentos da bronquite, da úlcera e de doenças da pele (GILBERT et al., 1999; TINCUSI et al., 2002; LIMA et al., 2003; PAIVA, et al., 2004a e 2004b; ARAÚJO-JR et al., 2005; BRITO et al., 2005; CARVALHO et al., 2005; VEIGA JR, et al., 2006; GOMES, et al., 2007; SANTOS, et al., 2008a e 2008b).

Quimicamente, o óleorresina extraído das espécies *C. officinalis* L., *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. langsdorffii* Desf., e *C. cearensis* Huber ex Ducke são os mais estudados na atualidade (VALDEVITE, 2007). O óleo de copaiba apresenta fração volátil rica em sesquiterpenos e fração constituída por compostos fixos predominantemente diterpênicos. O conteúdo destas classes de componentes pode variar principalmente

levando em conta os fatores bióticos externos como ataques provocados por insetos e fungos (RAMOS, 2006). Todavia, na literatura corrente já foram divulgados 72 sesquiterpenos e 27 diterpenos (VALDEVITE, 2007). Dentre os principais sesquiterpenos destacam-se o β -cariofileno, α -humuleno, α -copaeno, bergamoteno e δ -cadineno. Já com relação aos diterpenos, o ácido copálico, ácido hardwíckiico, ácido caurenóico e ácido colavênico são os mais representativos (ROMERO, 2007). Na figura 3 apresentam-se as estruturas químicas destes compostos.

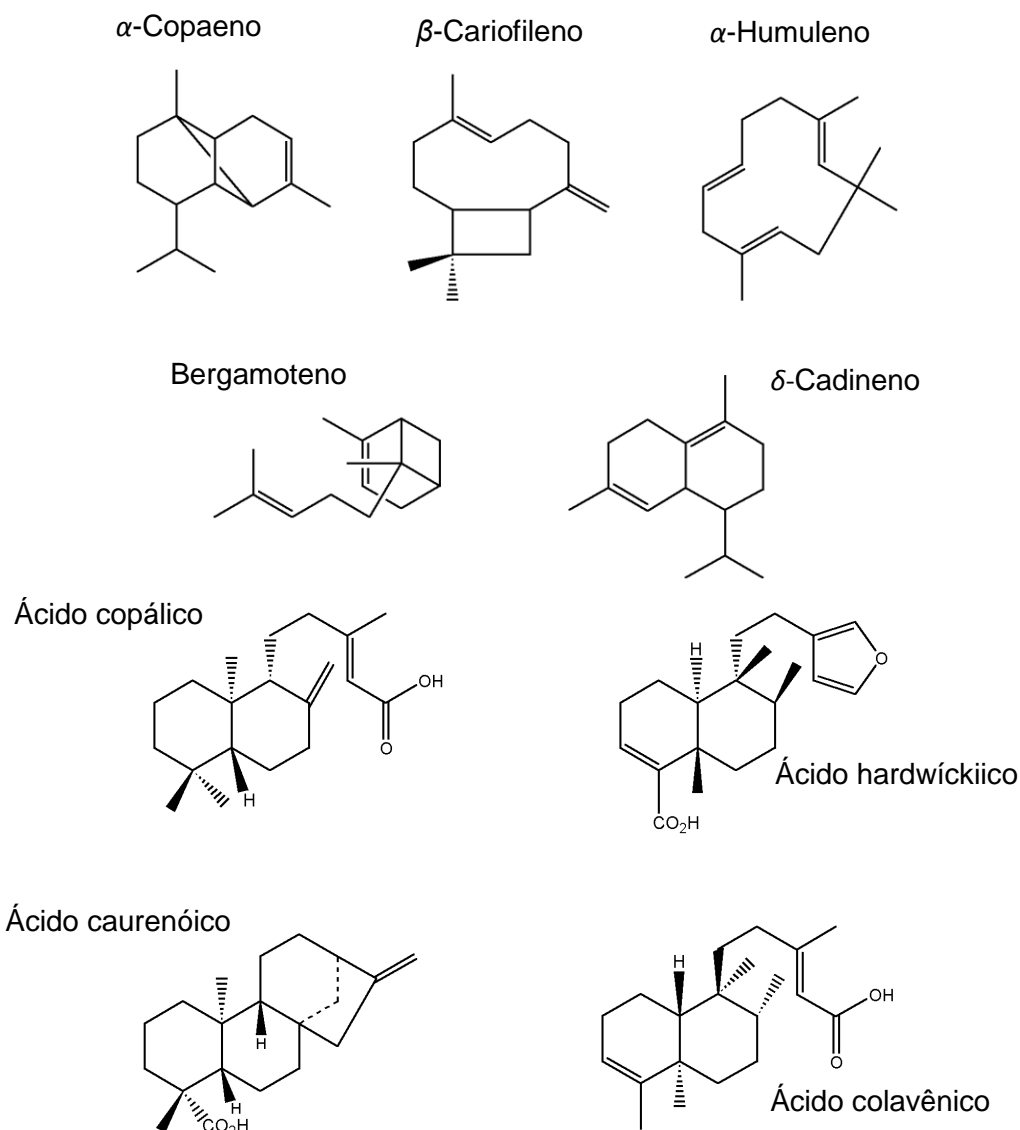


Figura 3: Sesquiterpenos e diterpenos comuns ao óleo-resina da copaíba.

1.4 *Copaifera langsdorffii* Desf.

Copaifera langsdorffii Desf. (Leguminaceae-Caesalpinioideae) é uma árvore que pode ser encontrada em praticamente todo o Brasil, mas especialmente nos estados do Amazonas, Pará e Ceará (PAIVA et al., 2002). Esta espécie é polinizada no período diurno, com grande participação de *Trigona sp* e *Apis mellifera*. A biologia de suas sementes foi estudada por diversos pesquisadores que abordaram desde sua morfologia e anatomia, passando pela sua conservação e maturação (EIRA et al., 1992), até a germinação (BARBOSA; AGUIAR; SANTOS, 1992). Sua identificação botânica é difícil, sendo realizada, na maioria das vezes, segundo as características de suas flores (VEIGA JR; PINTO, 2002). Recentemente, em trabalho divulgado na literatura, foi explicado a ocorrência e aspectos estruturais e funcionais de coléteres nas folhas de *C. langsdorffii* (PAIVA, 2009). Coléteres são tricomas especiais que produzem uma espécie de secreção ou mucilagem. Estes tricomas possuem a função de proteger as folhas jovens de fatores como baixa umidade relativa ou altos níveis de radiação solar (DICKISON, 2000). Segundo Paiva, (2009) os coléteres em *C. langsdorffii* são longos, levemente sinuosos, detectados na face adaxial de suas folhas e medem de 400 a 800 µm de comprimento com diâmetro na faixa de 100 a 150 µm (Figura 4). As secreções produzidas por este tricomas tendem sequencialmente a desidratar, cristalizar e retornar ao seu estado de mucilagem inicial dependendo das condições do ambiente. Este mecanismo, certamente, é um dos meios de proteção das folhas desta espécie (PAIVA, 2009).

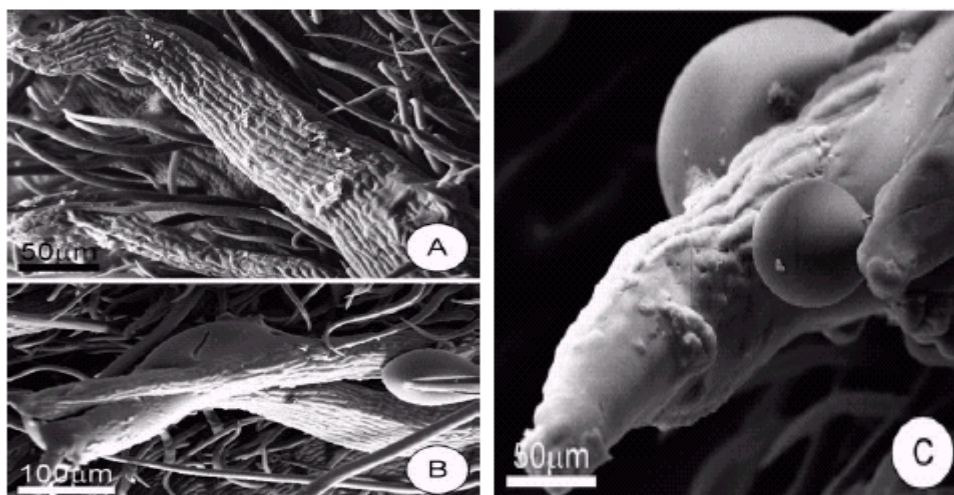


Figura 4: Coléteres nas folhas de *C. langsdorffii*. **A:** *in natura*; **B:** iniciando o processo de secreção e **C:** secretando a mucilagem (PAIVA, 2009).

A exemplo de outros óleos obtidos de diferentes espécies de copaíba, o óleo-resina extraído de *C. langsdorffii* (Figuras 5 e 6) também é considerado, na sua forma *in natura*, um valioso remédio na medicina popular, sendo utilizado como anti-inflamatório e agente anti-infeccioso pulmonar (PAIVA et al., 1998). Estudos sobre as atividades biológicas em animais com o óleo desta espécie apresentaram atividades protetoras de colite aguda e de danos do intestino (PAIVA et al., 2004a e 2004b). O ácido caurenóico isolado do óleo de *C. langsdorffii* também foi avaliado sob distintos ensaios biológicos apresentando potenciais anti-inflamatório e citotóxico inibindo o crescimento de células cancerosas (COSTA-LOTUFO et al., 2002; PAIVA et al., 2003).

Quanto à composição química, a presença da cumarina umbeliferona nos extratos etéreos das sementes de *C. langsdorffii* foi descrita pela primeira vez por Mors e Monteiro (1959). Nos estudos realizados por Lima-Neto, Gramosa e Silveira (2008), a partir destas sementes, a umbeliferona juntamente com o ácido caurenóico, ácido poliático e o nivenólídeo foram isolados e identificados. Nestas sementes também foram identificados amilóides xiloglucânicos (BUCKERIDGE et al., 1992) e a presença de polissacarídeos (FRANCO et al., 1996). A fração obtida em clorofórmio destas sementes foi estudada apresentando em seu conteúdo majoritário 11 diferentes ácidos graxos, destacando-se os ácidos palmítico e oléico (LIMA-NETO; GRAMOSA; SILVEIRA, 2008). Pesquisas da química

e farmacologia dos óleos essenciais dos frutos e das cascas dos frutos de *C. langsdorffii* já foram divulgadas (GRAMOSA; BRIGIDO; SILVEIRA, 2001; GRAMOSA; SILVEIRA, 2005). Nestas pesquisas, os principais constituintes foram: γ -muuroleno, β -cariofileno e óxido de cariofileno.

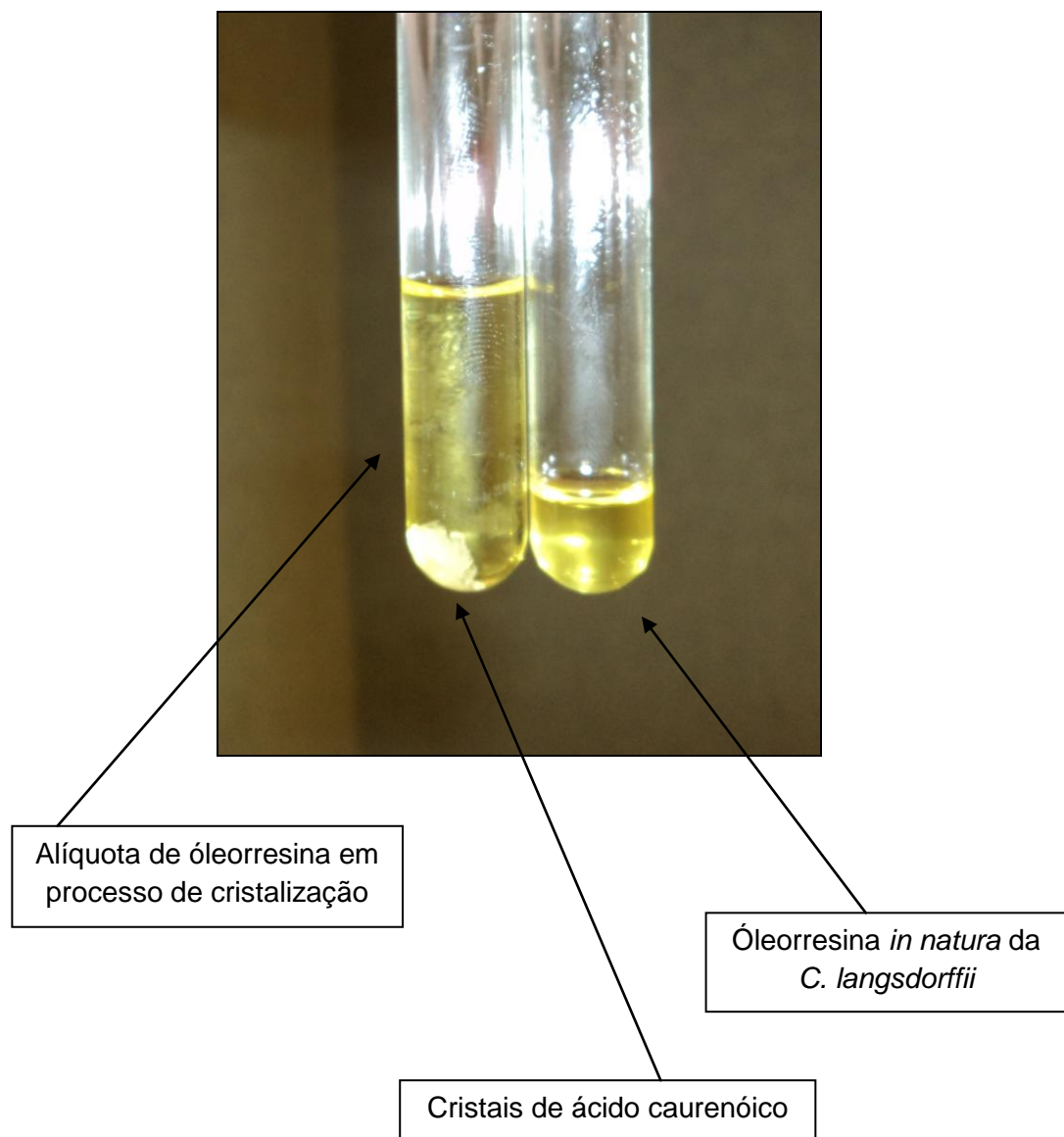


Figura 5: Amostras de óleoresina em tubos com capacidade de 10 mL.

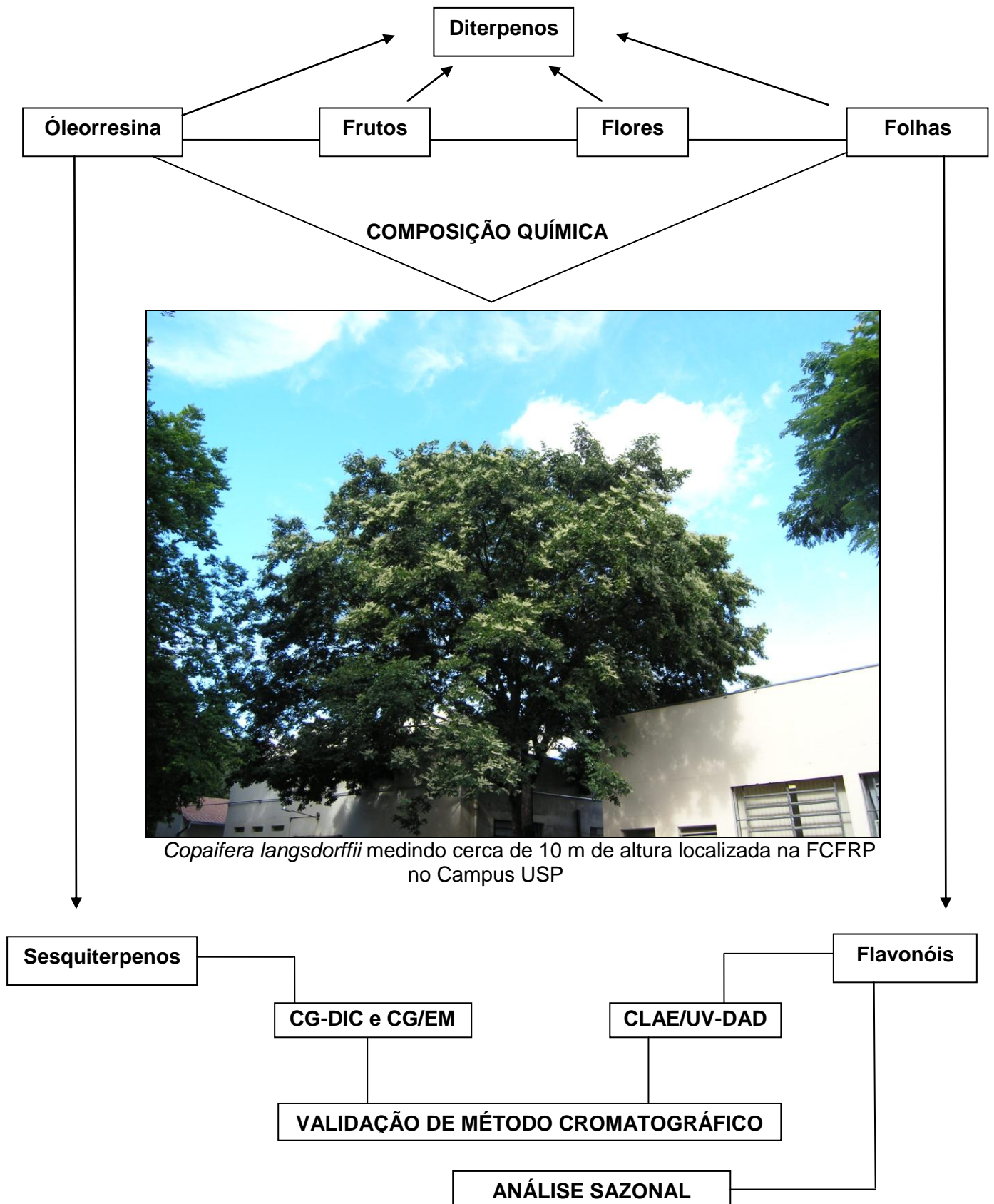


Figura 6: Resumo gráfico com destaque para as etapas desenvolvidas com a espécie em estudo.

2. Objetivos

Copaifera langsdorffii apresenta alto potencial medicinal e econômico para o desenvolvimento de novos produtos. Portanto, no presente trabalho objetivam-se:

- Investigar a composição química de amostras de *C. langsdorffii*, visando enriquecer e contribuir para o conhecimento da química desse gênero;
- Desenvolver e validar métodos cromatográficos capazes de quantificar, com exatidão, os principais componentes presentes nas amostras de *C. langsdorffii*;
- Avaliar a influência da sazonalidade no perfil químico dos extratos hidroalcoólicos da espécie.

3. Material e Métodos

3.1 Conceitos gerais

O material vegetal foi seco em estufa de ar quente e circulante (modelo 170 N° 370/82 Soc. Fabre LTDA) e transformado em pó com auxílio de moinho de facas.

O grau de pureza dos solventes utilizados (Hx: hexano, AcOEt: acetato de etila, CHCl_3 : clorofórmio, DCM: diclorometano, MeOH: metanol, e EtOH: etanol) variou de acordo com cada finalidade. Nas extrações, partições líquido-líquido e sistemas cromatográficos básicos, foram utilizados solventes de grau P.A., das marcas *Merck*, *Synth* e *Fisher Scientific* e grau técnico, previamente submetido à destilação fracionada.

Quanto às separações por cromatografia de fases líquida (CLAE) ou gasosa (CG) utilizaram-se solventes grau cromatográfico (*J. T. Baker*, *Fisher Scientific* e *Tedia*) e água deionizada *Milli-Q*. Quando necessário, estes solventes foram filtrados através de membrana (0,45 μm) e desgaseificados durante 10 min. sob vácuo e ultra-som.

As características das fases estacionárias, as quais foram utilizadas nos processos cromatográficos variaram de acordo com a separação desejada:

- Para cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) utilizou-se sílica gel 60 GF₂₅₄, com espessura de 0,25 mm. Na cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP) também foi usado sílica gel 60 GF₂₅₄ com espessura de 0,5 mm;
- Na cromatografia líquida a vácuo (CLV) utilizou-se sílica gel 60 H, empregando-se colunas de vidro contendo placas sinterizadas de diferentes alturas e diâmetros, variando-se estes parâmetros de acordo com a quantidade de amostra a ser fracionada;
- Para cromatografia em coluna clássica foram utilizados dois tipos de fases estacionárias: sílica gel 70-230 mesh na separação de compostos não polares e/ou

média polaridade; Sephadex[®] LH 20 na separação de compostos polares. Para tanto, foram utilizadas colunas de vidro diferenciando-se na altura e diâmetro, respeitando-se a quantidade da amostra.

Os perfis cromatográficos obtidos por meio de CCDC foram visualizados com o uso de agente revelador como solução de anisaldeído sulfúrico e/ou irradiação no UV (254 e 366nm).

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram registrados utilizando-se espectrômetros das marcas *Brucker – Avance DRX 400* e/ou *Varian – Mercury 400BB*. Estes equipamentos operaram em 400 e 100 MHz para obtenção de RMN de ¹H e ¹³C, respectivamente. Para obtenção destes espectros, todas as amostras foram dissolvidas em solventes da marca *Aldrich*.

3.2 Amostras de *Copaifera langsdorffii*

Amostra de óleoresina da *C. langsdorffii* foi coletada por integrantes da Empresa Apis Flora na região de Ribeirão Preto-SP. O procedimento para esta coleta seguiu os principais parâmetros descritos por Medeiros e Vieira (2008). Para tanto, em uma árvore da espécie, com diâmetro acima de 30 cm, foi feita uma perfuração utilizando um perfurador manual (trado) medindo 1,2 m de comprimento e 2 cm de diâmetro. Esta perfuração foi feita cerca de 1 m do solo no centro da árvore. Durante a perfuração, no momento em que o trado atingiu o centro interior do tronco, coletaram-se cerca de 100 mL da amostra. Logo em seguida o orifício foi vedado adequadamente utilizando-se um tampão de madeira.

Os frutos e flores da espécie em estudo foram coletados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP – USP), mais precisamente de uma árvore localizada ao lado do Laboratório de Farmacognosia desta instituição. Neste procedimento frutos e flores foram coletados na forma *in natura* pesando cerca de 400 e 600 g, respectivamente.

As folhas desta espécie foram coletadas em três distintas localidades: Ao lado do Laboratório de Farmacognosia (FCFRP – USP), na região da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras (FFCLRP – USP) e na região de Sorocaba – SP. Estas folhas foram separadas de ramos e galhos, submetidas à secagem utilizando-se estufa de ar quente e circulante a 40°C e, em seguida, foram submetidas à moagem em moinho de facas, previamente esterilizado. As quantidades destas folhas secas, logo após a moagem, foram cerca de 2, 2 e 5 kg, respectivamente.

As excisatas foram devidamente identificadas pelo Prof. Dr. Milton Groppo (Departamento de Biologia – FFCLRP), e depositadas no herbário da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras sob o código SPFR 10120.

3.2.1 Extratos brutos

Uma alíquota de 3,1 kg do pó obtido após moagem das folhas coletadas na região de Sorocaba - SP foi submetido à maceração em solução hidroalcoólica 70% seguida de percolação, por três vezes, a cada 72 horas. As soluções hidroalcoólicas obtidas foram filtradas, transferidas progressivamente para balões de fundo redondo e concentradas sob pressão reduzida com auxílio de rotaevaporador e banho de aquecimento funcionando com temperatura de 60 ± 10 °C. O extrato resultante foi transferido para frasco previamente pesado e a diferença gravimétrica foi calculada obtendo-se 520 g, o equivalente a 16,8% de rendimento, do extrato bruto das folhas de *C. langsdorffii*. Seguindo esta mesma metodologia de extração, os extratos das folhas as quais foram coletadas na FCFRP e FFCLRP também foram preparados. Para cada um destes, a partir de alíquotas de 1 kg do pó das folhas foram obtidas as soluções hidroalcoólicas. Estas soluções foram concentradas, resultando em rendimentos de 15% (150 g) e 18% (180 g) para amostras da FCFRP e FFCLRP, respectivamente.

Quanto aos frutos, estes foram secos e submetidos à moagem semelhantemente às folhas. Logo em seguida, cerca de 300 g do pó resultante foram macerados em solução

hidroalcoólica 95%. Visando melhorar o processo extrativo, esta amostra foi colocada em aparelho ultra-som e a cada 60 minutos a solução hidroalcoólica (500 mL) foi renovada, num total de quatro vezes. As tinturas obtidas foram reunidas e concentradas por meio de rotaevaporador. Ao final desta extração, obtiveram-se cerca de 20 g de extrato bruto, equivalentes a 7% de rendimento.

Considerando a flores, cerca de 500 g desta amostra *in natura* foram submetidas ao mesmo processo extrativo descrito para os frutos. Ao final deste processo, obtiveram 30 g de extrato bruto, equivalentes a 6% de rendimento.

3.3 Metodologias para caracterizações químicas de amostras da *C. langsdorffii*

3.3.1 Óleorresina

A caracterização química desta amostra foi realizada em colaboração com a equipe do Núcleo de Pesquisa da Universidade de Franca, sendo o coordenador principal, o Prof. Dr. Sérgio R. Ambrósio. Para tanto, cerca de 20 g (~ 23 mL) de óleorresina foi submetido à cromatografia líquida a vácuo - CLV (PELLETIER; CHOKSHI; DESAI, 1986), utilizando-se como fase móvel os solventes hexano e acetato de etila. Por meio deste procedimento foram obtidas seis frações de 500 mL cada. A primeira fração foi obtida com 100 % de hexano. Nas frações 2 a 5 foram adicionadas alíquotas de 20, 40, 60 e 80 % de acetato de etila, respectivamente. A fração 6 foi obtida com 100 % de acetato de etila. A fração 1 foi caracterizada por cromatografia de fase gasosa acoplada à detector de ionização de chama (CG-DIC) e espectrometria de massas (CG/EM). Logo após secagem da fração 2, esta foi purificada por cromatografia em coluna usando-se como fase móvel hexano:AcOEt:éter na proporção de 75:10:15 % resultando na obtenção do composto **CL 1**. A fração 3 (1,0 g) foi fracionada por cromatografia em coluna usando-se a mistura de 70% de hexano e 30% de acetato de etila como fase móvel. Por meio deste procedimento foram purificados os componentes **CL 2** e **CL 3**. As frações 4 e 5 foram novamente fracionadas por CLV, usando-

se mesma fase móvel e proporções da CLV anteriormente descrita. As subfrações resultantes, (4.1-4.5 e 5.1-5.5), foram purificadas por cromatografias em coluna e em camada delgada preparativa. Por meio destes fracionamentos os compostos **CL 4**, **CL 5** e **CL 6** foram isolados. Esta metodologia foi descrita na íntegra por Souza et al., (2011).

3.3.2 Avaliação dos compostos voláteis

Inicialmente, para obtenção dos dados de rendimento, folhas frescas de *C. langsdorffii*, coletadas na FCFRP, foram cortadas em duas ou três partes com o auxílio de uma tesoura. Em seguida, 300 g deste material foram transferidos para balão de fundo redondo com capacidade para 2 L. A este balão foi adicionado 1 L de água destilada e, logo depois, este sistema foi submetido a hidrodestilação por 6 h utilizando-se aparelho tipo Clevenger (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). O rendimento dos voláteis presentes no óleo-resina desta espécie também foi calculado. Para tanto, utilizou-se o mesmo método de hidrodestilação por 2 h usando-se 20 g (~ 23 mL) de óleo-resina em 500 mL de água destilada, acondicionados em balão de fundo redondo com capacidade de 1 L.

Após a obtenção dos óleos voláteis das folhas e do óleo-resina, 100 µL de cada amostra foram dissolvidos, separadamente, em 5 mL de hexano. Em seguida, acrescentaram-se 200 µL da solução de 1,2,4,5 - tetrametilbenzeno TMB (~ 10 mg/mL), utilizado como padrão interno. Desta fração orgânica, 1 µL foi analisado por cromatografia de fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) e com espectrometria de massas (CG/EM).

As análises destes constituintes foram realizadas por CG-DIC da marca Hewlett Packard, modelo 6890N plus, equipado com injetor operando no modo *split* (50:1). Para as análises foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5 % fenil-metil-siloxano) (comprimento: 30 m, diâmetro interno: 0,32 mm, filme líquido: 0,25 µm). O hidrogênio foi usado como gás de arraste. A programação de temperatura, a qual foi utilizada para o forno,

foi determinada da seguinte forma: iniciou-se com escala de 100 – 140 °C elevando-se a temperatura com proporção de 10°C/min; na sequência a temperatura foi de 140 - 180 °C com 2,8°C/min, mantendo-se 180°C por 1 minuto e, em seguida, esta foi de 180 - 280 °C com 20°C/min, assegurando-se 280°C por 1 min, finalizando a análise com o tempo de 25 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram de 240°C e 290°C, respectivamente.

A caracterização dos principais componentes das frações voláteis foi realizada por CG/EM. Para assegurar a identificação dos compostos, foram determinados os índices de retenção. Estudos comparativos também foram feitos levando-se em consideração o banco de dados da biblioteca Wiley e trabalhos divulgados na literatura. O aparelho utilizado foi um cromatógrafo de fase gasosa da marca Shimadzu – QP 2010 equipado com injetor automático AOC – 20Si operando no modo *split* (50:1), acoplado com um detector seletivo de massas. A aquisição dos resultados foi realizada com o auxílio do sistema de dados Shimadzu e biblioteca de espectro de massas Wiley 7.0. Para as análises foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O hidrogênio foi usado como gás de arraste e os espectros de massas foram obtidos no modo impacto eletrônico a 70 eV, com escala de massas variando entre 40-500 *m/z*. A temperatura do injetor foi de 240 °C e a programação de aquecimento para o forno foi à mesma descrita para o CG-DIC.

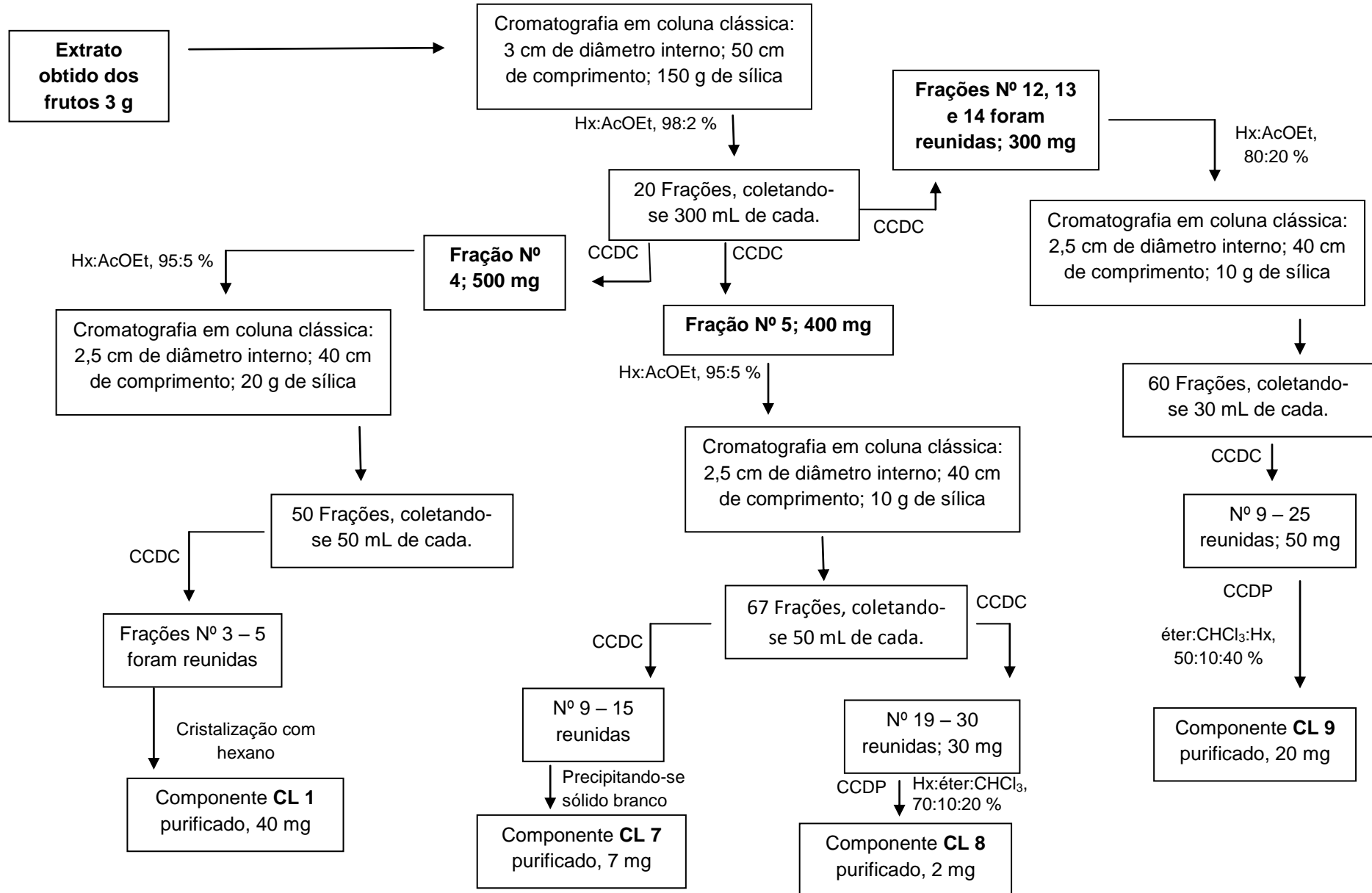
Os índices de retenção dos principais voláteis foram determinados utilizando CG-DIC e CG/EM de acordo com o seguinte procedimento: Injetou-se 1 µL de cada amostra obtendo-se os tempos de retenção para cada componente. Em seguida, injetou-se 1 µL de solução de série homóloga de hidrocarbonetos (C₉ a C₂₅), utilizando as mesmas condições cromatográficas obtendo-se os tempos de retenção para cada hidrocarboneto. Logo após, foi efetuada a co-injeção de 1 µL de cada amostra juntamente com 1 µL da solução de hidrocarbonetos. Calcularam-se os índices de retenção por meio da equação divulgada por Clement, (1990).

3.3.3 Extratos brutos dos frutos e flores.

A caracterização química dos extratos dos frutos e flores foi realizada no *National Center for Natural Products Research, University of Mississippi, Oxford, MS, USA*, sob a co-orientação do Prof. Dr. Dhammika Nanayakkara. Em geral, esta caracterização pode ser representada por cromatografia em colunas clássicas, desenvolvimento de diferentes fases móveis, análises por CCDC, purificação de compostos por CCDP e análises espectroscópicas por RMN de ^1H e ^{13}C .

Destaca-se que a metodologia de trabalho, considerando os fracionamentos por cromatografia em coluna e sílica de fase normal, foi sempre por meio do desenvolvimento de uma fase móvel inicial. Ao longo do procedimento cromatográfico a polaridade desta fase era gradualmente aumentada até atingir o ponto de limpeza da coluna. Normalmente, estas fases móveis visavam eluir os compostos de interesse de uma forma lenta, tornando o processo mais seletivo e eficiente. Logo após a eluição destes compostos, aumentava-se a polaridade finalizando o procedimento. A escolha dos solventes e das respectivas proporções foi sempre respeitando os perfis cromatográficos das amostras obtidos por CCDC.

No esquema 1 é apresentado um resumo dos fracionamentos mais promissores considerando o extrato bruto dos frutos. Para tanto, cerca de 3 g desta amostra foram fracionados por meio de coluna cromatográfica utilizando-se fase móvel inicial composta por hexano:AcOEt na proporção de 98:2 %. Neste procedimento coletaram-se 20 frações. A fração N^o 4 foi purificada em outra coluna cromatográfica resultando no isolamento do composto **CL 1**. De modo geral, para a fração de N^o 5 foram realizados procedimentos semelhantes aos descritos para a N^o 4, obtendo-se os compostos **CL 7** e **CL 8**. Por meio de CCDC, as frações 12, 13 e 14 foram reunidas e purificadas, resultando no isolamento do componente **CL 9**.

Esquema 1: Fracionamento do extrato bruto obtido dos frutos.

Quanto ao fracionamento do extrato das flores, este foi bastante semelhante ao descrito para os frutos. O fracionamento inicial foi realizado a partir de 6 g desta amostra para 70 g de sílica de fase normal em coluna cromatográfica medindo 5 cm de diâmetro interno, 30 cm de altura. A fase móvel inicial foi composta por Hx:acetona, 95:5 %. Coletaram-se 300 frações de 50 mL cada. Estas frações foram agrupadas conforme similaridade por CCDC. As subfrações promissoras foram novamente fracionadas e os compostos foram purificados por CCDP. Os compostos **CL 1** (20 mg), **CL 7** (10 mg), **CL 9** (12 mg) e **CL 10** (5 mg) foram isolados e identificados. Na figura 7 apresenta-se a fase inicial deste fracionamento e na figura 8 é mostrado exemplo representativo de purificação de compostos por CCDP.

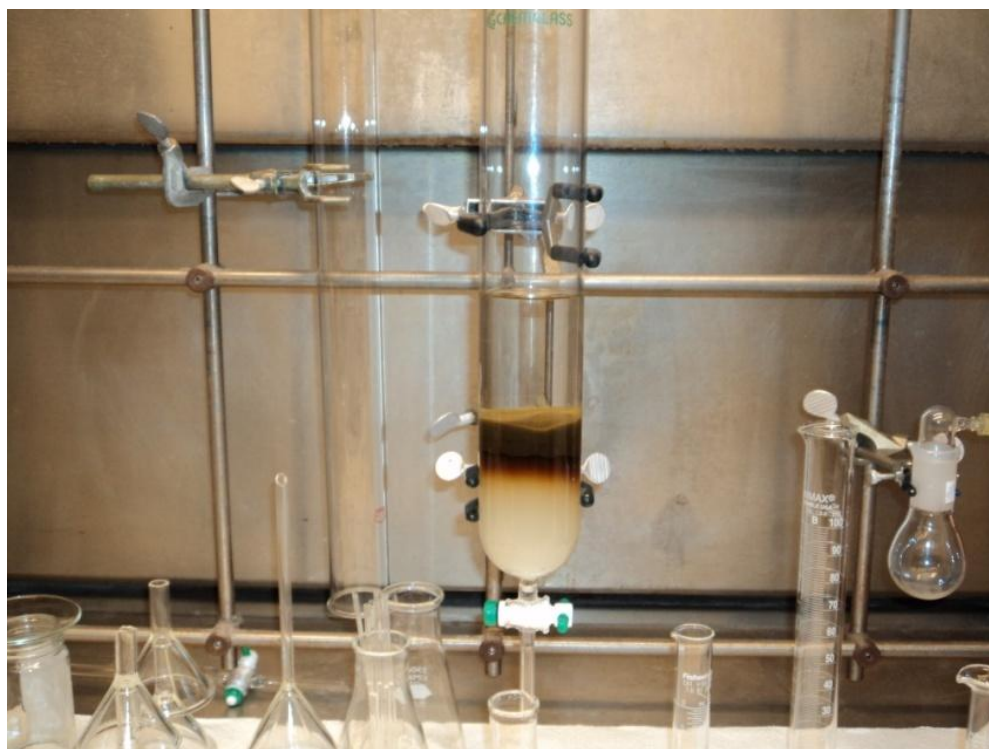


Figura 7: Cromatografia em coluna clássica para o fracionamento do extrato das flores.



Figura 8: Purificação de compostos por CCDP.

3.3.4 Extrato bruto das folhas

No Laboratório de Farmacognosia – FCFRP, o trabalho com o extrato das folhas foi iniciado com amostra obtida das folhas coletadas na região de Sorocaba-SP.

Inicialmente, este extrato foi submetido à partição com solventes orgânicos com a finalidade de separarem-se seus grupos de constituintes. Para tanto, 100 g deste extrato foram solubilizados em 1000 mL de metanol-água (90:10 %). Em seguida, esta amostra foi transferida para funil de separação e particionada três vezes com 400 mL de hexano. A fração hexânica resultante foi transferida para balão de fundo redondo, no qual foi concentrada sob pressão reduzida a 45°C com auxílio de rotaevaporador. Depois de concentrada, esta fração foi transferida para frasco previamente pesado e a diferença gravimétrica foi calculada. A solução hidrometanólica restante foi rotaevaporada com o objetivo de eliminar o metanol. Em seguida, à solução aquosa remanescente foram adicionados 600 mL de água destilada e realizou-se o mesmo procedimento de partição descrito para a fração hexânica, porém utilizando-se os solventes diclorometano e acetato

de etila em sequência. O processo de partição líquido-líquido do extrato está resumido no esquema 2 e os dados de rendimento de cada fração são mostrados na tabela 1.

Esquema 2: Procedimento de partição líquido-líquido do extrato bruto das folhas.

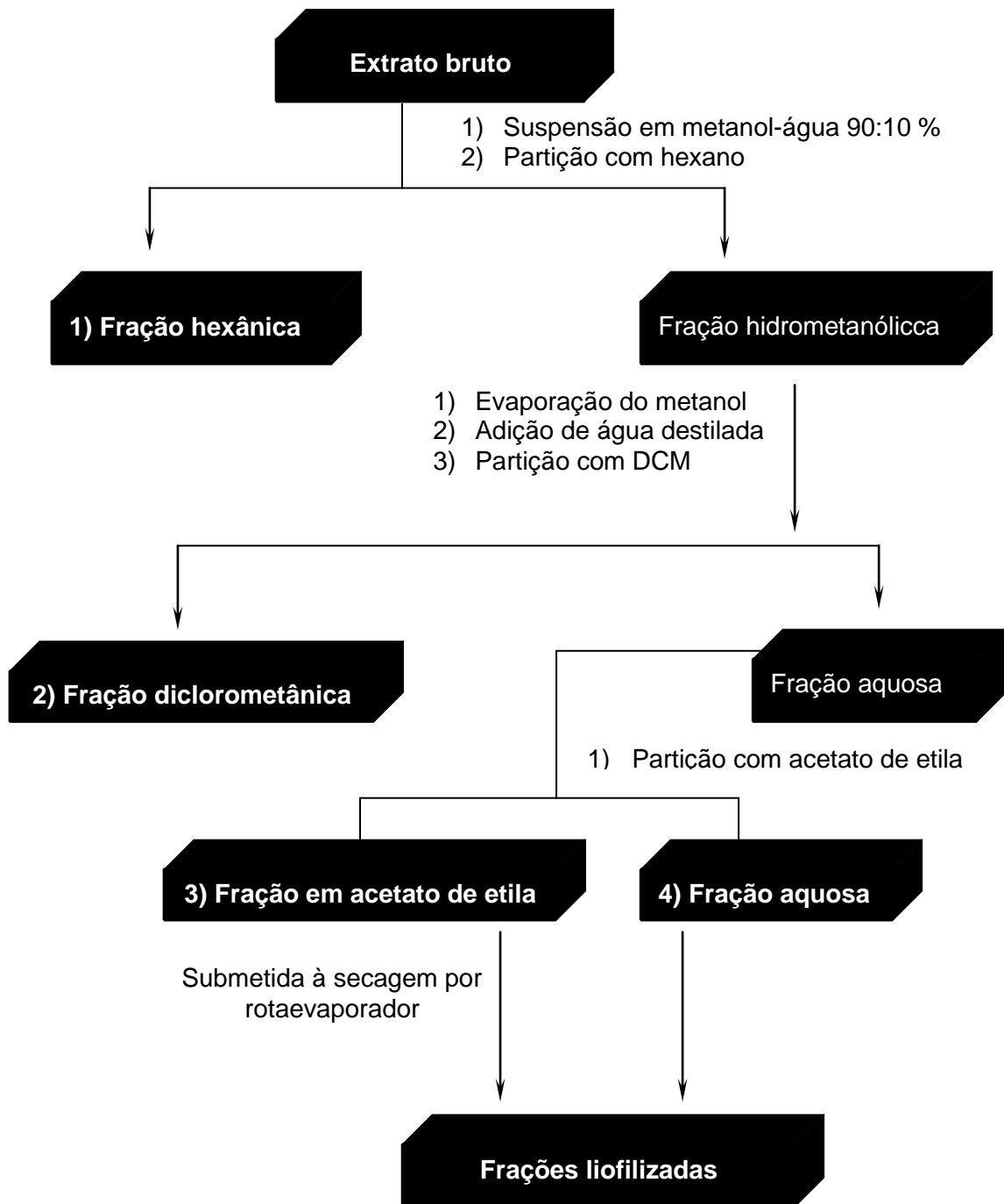


Tabela 1: Rendimentos obtidos de cada fração por processo de partição.

Extrato bruto = 100 g		
Nome das frações	Quantidade obtida g	Rendimento %
Hexânica	4,0	4,0
Diclorometânica	2,0	2,0
Acetato de etila	34,0	34,0
Aquosa	55,0	55,0

Depois de realizado trabalho piloto, no qual envolveu a avaliação do extrato bruto e suas respectivas frações (Tabela 1) sob distintas técnicas cromatográficas usando-se diferentes modos de detecção, a fração obtida com acetato de etila foi fracionada.

Para tanto, cerca de 5 g desta fração foram solubilizadas em 50 mL de metanol P. A. com auxílio de aparelho ultra-som. Logo na sequência, esta amostra foi centrifugada sob rotação de 7000 rpm, com auxílio de centrífuga da marca Eppendorf. Em seguida, o sobrenadante resultante deste procedimento foi filtrado através de filtro analítico (0,45 µm). Depois de centrifugada e filtrada, toda a amostra remanescente foi aplicada no topo da Sephadex® LH 20, a qual estava empacotada, na proporção de 1 g:100 g, (relação amostra:fase estacionária), em coluna de vidro medindo 3,5 cm de diâmetro interno por 120 cm de altura. Esta coluna (Figura 9) estava montada e instalada no Laboratório de Química Orgânica – FCFPR. Durante este procedimento coletaram-se 159 frações, sendo 155 com volume de 25 mL e 4 com volume de 500 mL usando-se metanol como fase móvel. Por meio de CCDC, as frações 45 a 120 foram reunidas resultando em cerca de 800 mg de um sólido, na forma de pó, de coloração amarela. Posteriormente, esta amostra foi purificada por CLAE.



Figura 9: Coluna com Sephadex[®] LH 20 durante a realização do fracionamento da amostra.



Figura 10: Cromatógrafo de fase líquida (Laboratório de QO da FCFRP-USP).

Para tanto, foi utilizado cromatógrafo marca Shimadzu composto por duas bombas Shimadzu LC-6A, detector espectrofotométrico UV/VIS Shimadzu SPD-6AV, sistema controlador SCL-10A ν p, conectado a um computador com software Shimadzu Class-VP versão 5.02 e injetor automático SIL-10AD ν p. Utilizou-se coluna cromatográfica semipreparativa de fase reversa CLC-ODS – Shimadzu, 20 mm x 250 mm, diâmetro das partículas 5 μ m e pré-coluna de fase reversa C₁₈ fabricada pela mesma companhia. Como fase móvel foi utilizada água na fase A e metanol na fase B, sob vazão de 6 mL / min. e um gradiente iniciando-se com 20 – 60 % de fase B (0 – 15 min.), mantendo-se 60 % de fase B até 25 minutos, elevando-se de 60 – 100 % de B (25 – 35 min.), permanecendo 100 % de fase B até 37 minutos, além de outros 8 min. para retorno às condições iniciais e re-equilíbrio da coluna. Este aparelho (Figura 10) estava instalado no Laboratório de Química Orgânica da FCFRP-USP e foi gentilmente disponibilizado pelo Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes. A figura 11 exemplifica-se a purificação dos compostos **CL 10** e **CL 11**.

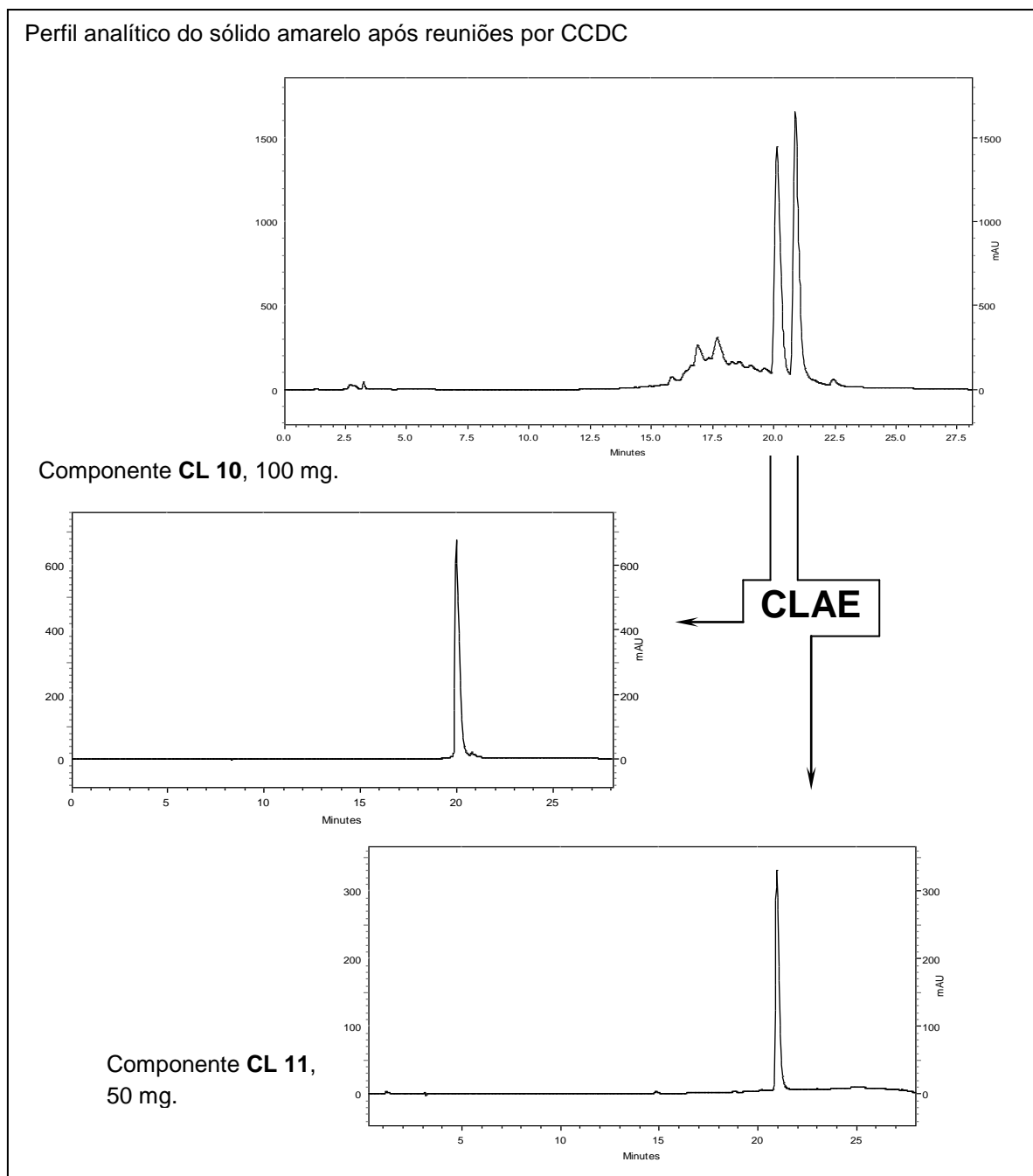
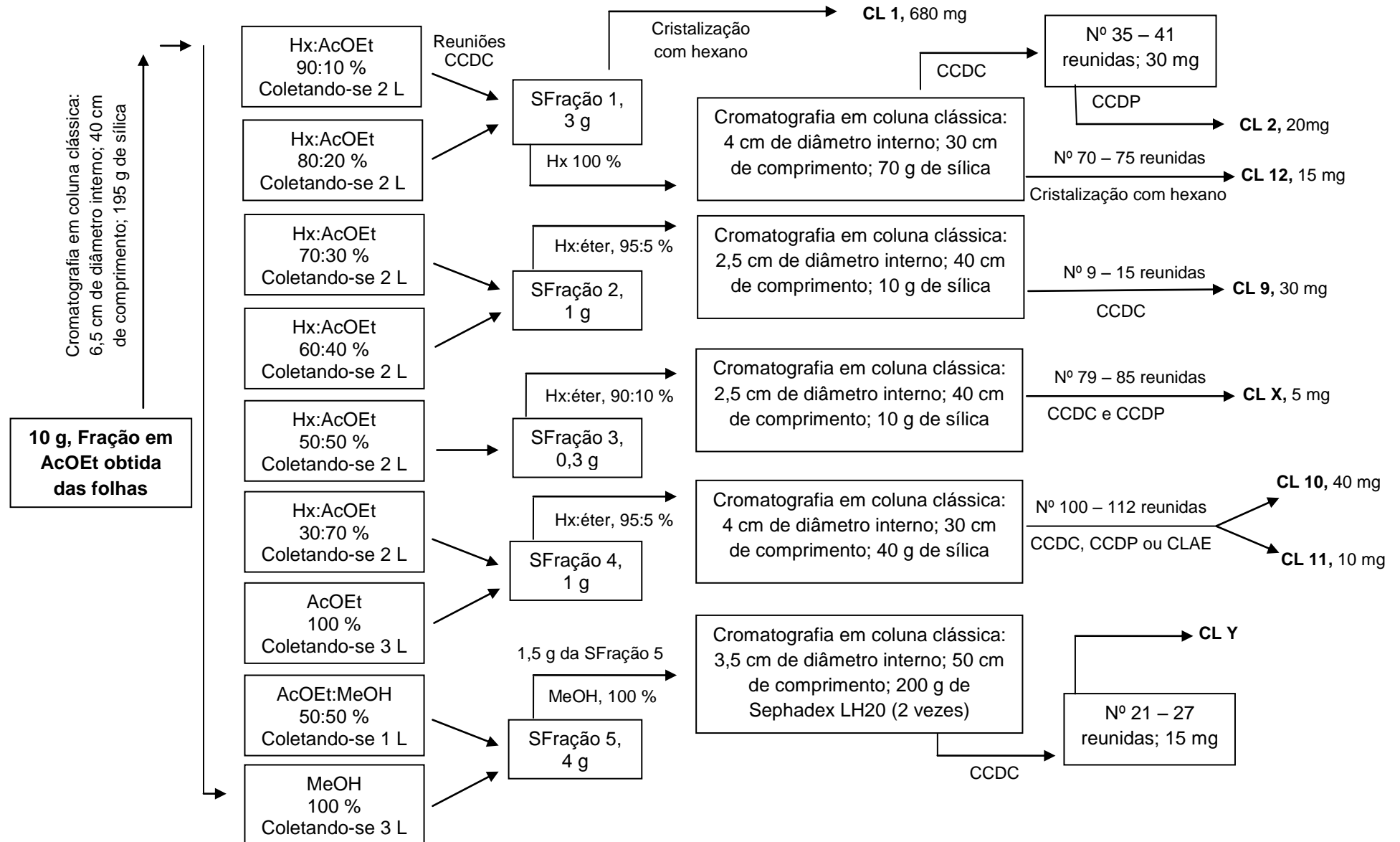


Figura 11: Perfis cromatográficos analíticos apresentando a separação dos componentes **CL 10** e **CL 11**.

Amostra do extrato das folhas, coletadas no campus da FFCLRP, foi fracionada na *University of Mississippi*. Para isso, 100 g deste extrato foi particionado seguindo a mesma metodologia demonstrada no esquema 2. Logo em seguida, uma alíquota de 10 g da fração obtida em acetato de etila foi submetida à cromatografia em coluna clássica (Esquema 3). Por meio deste procedimento foram obtidas nove frações. Estas frações foram agrupadas considerando-se os perfis por CCDC, resultando em 5 subfrações (SFração). Cada uma destas subfrações foi purificada por meio de outras colunas clássicas, utilizando-se CCDC e metodologias de cristalização com solventes. Considerando todos os procedimentos apresentados no esquema 3, a partir SFração 1 foram isolados os compostos **CL 1**, **CL 2** e **CL 12**. A SFração 2 foi purificada resultando no componente **CL 9**. O componente **CL X** foi obtido da SFração 3. Já os compostos **CL 10**, **CL 11** foram isolados da SFração 4.

O isolamento do componente **CL Y** foi realizado por meio de dois procedimentos. No primeiro, a partir de 1,5 g da SFração 5 foi realizado cromatografia em coluna utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH 20, coletando-se amostras de 50 mL cada (Esquema 3). Após agrupamento destas amostras, o resultado foi a obtenção de 3 frações. As análises por CCDC indicaram a fração 3 como promissora. Esta fração, pesando cerca de 600 mg, foi submetida ao mesmo procedimento de separação utilizando-se Sephadex LH 20 coletando-se as frações em tubos de ensaio com capacidade de 10 mL. As análises por CCDC indicaram a reunião das frações 21 a 27, resultando na obtenção de **CL Y**.

Esquema 3: Fracionamento da fração obtida com acetato de etila das folhas coletadas na FFCLRP, Campus da USP.

3.3.5 Metilação de amostras com reagente diazometano

Inicialmente, o reagente diazometano foi preparado. Para tanto foi utilizado *Diazald Kit – Sigma Aldrich*. Seguindo o manual deste *kit* duas soluções foram preparadas separadamente: em um frasco com capacidade para 100 mL foram misturados 25 mL de etanol 95% e 10 mL de solução aquosa contendo 5 g de hidróxido de potássio (solução 1); a solução 2 foi obtida solubilizando-se 21,5 g de N-metil -N-nitroso-*p*-toluenosulfonamida em 200 mL de éter etílico. Conforme a figura 12, a solução 1 foi colocada no recipiente 2. A solução 2 foi transferida para o recipiente 1. No recipiente 3 foram colocados cerca de 30 mL de éter. O recipiente 3 foi resfriando abaixo de 0 °C utilizando-se gelo. O recipiente 2 foi aquecido a 65 °C. Iniciou-se o gotejamento da solução 2 ao recipiente 2 durante 25 minutos. Procedeu-se a destilação durante 25 minutos. Finalizou-se o gotejamento utilizando-se toda solução 2. Em seguida, adicionou-se, lentamente, 40 mL de éter ao recipiente 2 e continuou-se a destilação por cerca de mais 10 min. Ao final deste procedimento, cerca de 100 mL de solução etérea contendo 3 g de diazometano foram obtidos no recipiente 3.

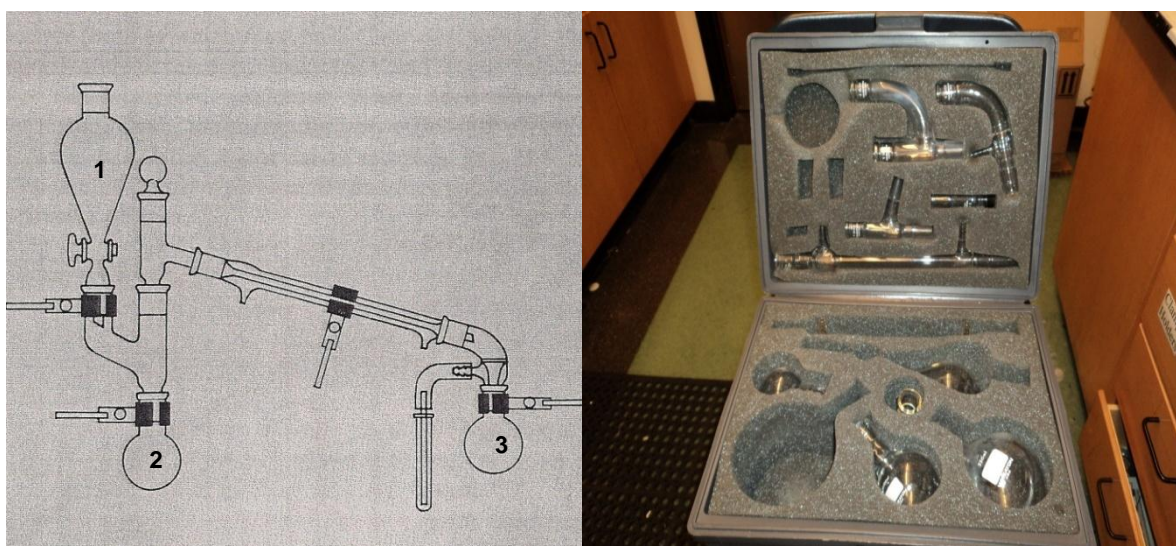


Figura 12: Ao lado esquerdo esquema demonstrando os recipientes: **1** = funil de separação de 250 mL, **2** = balão de 500 mL e **3** = balão de 250 mL. Ao lado direito *Diazald Kit – Sigma Aldrich*.

Posteriormente à obtenção do reagente de diazomentano, frações promissoras e o composto **CL 1**, resultantes dos fracionamentos dos extratos brutos dos frutos, flores e folhas, foram derivatizados. Para tanto, cerca de 5 mL deste reagente foram adicionados às frações e composto com auxílio de pipeta graduada. Estas frações estavam secas com aspectos resinosas, acondicionadas em tubo de ensaio com capacidade para 10 mL. O composto **CL 1** apresenta aspecto físico na forma de cristais, o qual estava armazenado no mesmo tipo de tubo. O fim da reação foi observado quando a emissão de bolhas, liberação do gás nitrogênio, foi cessada, após 5 min. da adição do reagente. Estas frações foram secas à temperatura ambiente e analisadas por CCDC. As frações que apresentaram composição química similares foram reunidas. Logo em seguida, estas amostras foram fracionadas seguindo procedimentos semelhantes aos descritos para fração Nº 5 (Esquema 1). Por meio destes fracionamentos foram obtidos os derivados metilados **CL 1M** (20 mg), **CL 9M** (25 mg) e **CL 13** (7 mg).

3.4 Desenvolvimento dos métodos de análise e extração

3.4.1 Métodos de extração e análise dos extratos hidroalcoólicos das folhas

Inicialmente, as amostras de cada localidade em estudo (FCFRP - USP, FFCLRP - USP e Sorocaba-SP) foram submetidas à moagem em moinho de facas comum e com o auxílio de um tamis o tamanho da partícula foi padronizado em 35 mesh. Uma porção homogênea de 500 mg de cada localidade foi separada para extração com utilização de padronização interna. O padrão interno selecionado foi a benzofenona. Para tanto, transferiram-se os 500 mg do material vegetal para frasco do tipo Erlenmeyer de 50 mL de capacidade e adicionaram-se 20 mL de solução hidroalcoólica na proporção de 7:3 contendo 50 µg de benzofenona (pi)/mL. As amostras foram mantidas em agitador mecânico do tipo shaker a 40°C, por 60 minutos e a 150 rpm. Após este período, o material foi filtrado em papel de filtro comum, obtendo-se o extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii*. Em

seguida, 1 mL deste extrato foi filtrado através de filtro analítico Millex-LCR-PTFE (0,45 µm x 13 mm) e transferido para frasco apropriado para injetor automático (1 mL). Prosseguindo, uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência. Para isso, foi utilizado um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência da marca Shimadzu, equipado com controlador SCL-10Avp, equipado com três bombas LC-10AD, detector de arranjo de diodos modelo SPD - M10Avp, injetor automático (SIL-10ADvp) e sistema controlador computadorizado com software Shimadzu Class-VP versão 5.02. Também foram utilizadas duas colunas monolíticas (Onyx™ 100 X 4,6 mm – C₁₈ Phenomenex) interligadas em série protegidas por pré-coluna do mesmo material. Como fase móvel foi utilizada água na fase A e acetonitrila (MeCN) na fase B, sob vazão de 1 mL / min. e um gradiente desenvolvido da seguinte forma: iniciando-se de 5 – 6 % de fase B em 1 min., 6 – 8 % de B (1 – 2 min.), 8 – 10 % de B (2 – 5 min.), 10 – 15 % de B (5 – 12 min.), mantendo-se 15 % de fase B até 22 minutos, elevando-se de 15 – 25 % de B (22 – 27 min.), permanecendo 25 % de fase B até 35 minutos, aumentando-se de 25 – 40 % de B (35 – 39 min.), mantendo-se 40 % de fase B até 42 minutos, elevando-se de 40 – 100 % de B (42 – 47 min.), permanecendo 100 % de fase B por 1 minuto, além de outros 13 min. para retorno às condições iniciais e re-equilíbrio da coluna. Todos os perfis cromatográficos por CLAE foram obtidos na absorção de 257 nm.

3.4.2 Métodos de obtenção e análise dos óleos essenciais

Visando desenvolver e validar método cromatográfico para os voláteis obtidos do óleo-resina, os métodos de obtenção e análise foram otimizados.

Amostras de diferentes fornecedores foram estudadas. As amostras de óleo-resina foram fornecidas pelas Empresas Apis Flora Indústria e Comércio - LTDA e Santos Flora Comércio de Ervas – LTDA. As amostras provenientes da Empresa Vid Amazon - LTDA foram adquiridas no mercado local e por isso foram analisados diferentes lotes de fabricação.

Os padrões comerciais, com teor de pureza ≥ 95 %, utilizados na validação foram comprados da Empresa *Sigma-Aldrich*.

A obtenção da fração volátil a partir do óleoresina foi desenvolvida da seguinte forma: em um balão de fundo redondo com capacidade para 1L foram colocados em conjunto 250 mL de água destilada e 2 mL de óleoresina. Este sistema foi submetido à hidrodestilação por 30 min utilizando-se aparelho tipo Clevenger. Logo após este período 0,5 mL da fração volátil foi obtida. Em seguida, 100 μ L deste óleo foram dissolvidos em 20 mL de hexano contendo 400 μ g/mL de 1, 2, 4, 5-tetrametilbenzeno (TMB), o qual foi selecionado como padrão interno. Prosseguindo, 1 μ L desta amostra foi analisada por cromatografia de fase gasosa. Para as análises foi usado o mesmo cromatógrafo descrito no item 3.3.2 (Hewlett Packard; CG-DIC) com a mesma coluna (HP-5; 5 % fenil-metil-siloxano), operando no modo *split* (80:1). O hidrogênio foi usado como gás de arraste com 2 mL/min. A programação de temperatura, a qual foi utilizada para o forno, foi otimizada da seguinte forma: iniciou-se com escala de 100 - 140 °C elevando-se a temperatura com proporção de 10°C/min; na sequência a temperatura foi de 140 - 180 °C com 2,5°C/min. Em seguida, esta foi de 180 - 200 °C com 20°C/min, finalizando a análise com o tempo de 21 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram de 240°C e 280°C, respectivamente.

3.5 Características de desempenho para validação dos métodos cromatográficos

No presente trabalho estão descritos dois métodos cromatográficos. Um deles foi desenvolvido por CLAE visando assegurar a qualidade de compostos fixos presentes no extrato hidroalcoólico das folhas da planta em estudo. O outro foi elaborado por CG e tem como objetivo garantir a qualidade de compostos voláteis presentes na mesma espécie. Para ambos os métodos, procurou-se respeitar as principais normas descritas pela ANVISA (2003), INMETRO (2003), ICH (1996), além de referências como Thompson, Ellison, Wood (2002), Feinberg, (2007) e Ribani, Collins, Bottoli (2007). Assim, as características de

desempenho avaliadas foram: seletividade, linearidade, limites operacionais de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão, recuperação, exatidão e robustez.

Considerando todas estas características, para ambos os métodos foram obtidas diferentes respostas tais como: área do pico, tempo de retenção, altura do pico, fator de separação α , largura de base do pico (W_b) ou *width*, concentração do componente e número de pratos teóricos (N). De forma geral, todas estas respostas foram avaliadas com base nos seus respectivos coeficientes de variação CV (%), o qual é dado pela equação:

$$CV (\%) = (S/X).100$$

Em que, **CV %**: corresponde ao coeficiente de variação, **S**: é a estimativa do desvio padrão e **X**: é a média das medidas em replicatas.

A **seletividade** tanto para os compostos fixos como para os voláteis foi dada pelo estudo comparativo entre perfis cromatográficos de padrões autênticos em relação àqueles obtidos para as amostras, além da avaliação das respostas: fator de separação α , largura de base do pico e número de pratos teóricos. Além disso, considerando os compostos fixos também foi feita a comparação dos espectros de UV envolvendo os padrões e amostras.

A **linearidade** foi avaliada por meio da elaboração de curvas analíticas dos padrões cromatográficos. Estas curvas foram obtidas a partir de diluições seriadas de soluções-mãe de cada padrão, com os valores expressos em $\mu\text{g/mL}$, considerando os compostos fixos e mM considerando os voláteis. As faixas lineares dinâmicas de cada padrão cromatográfico foram calculadas pelas respostas relativas fornecidas pelo sinal do detector, neste caso, área do pico dividido pelas respectivas concentrações. Para tanto, gráficos foram construídos com as repostas relativas no eixo das ordenadas e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo das abscissas para cada padrão. Foram desenhadas faixas paralelas em cada gráfico, as quais correspondem às variações de $\pm 5\%$ (voláteis) e $\pm 10\%$ (fixos), conforme descrito por Augusto, Valente e Riedo (2003). Respeitando os resultados encontrados, na determinação das faixas dinâmicas de cada composto, foram reconstruídas curvas analíticas obedecendo tais faixas, relacionando área

do pico no eixo das ordenadas *versus* suas respectivas concentrações no eixo das abscissas. As análises estatísticas dos dados foram obtidas pelo método de regressão linear por mínimos quadrados e expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$, em que, y : corresponde à resposta medida (área do pico), x : concentração ($\mu\text{g/mL}$ ou mM), a : corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta e b : corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de interseção da reta com o eixo das ordenadas. Além disso, o coeficiente de correlação, r , também foi calculado.

Os **LOD** e **LOQ** foram determinados por procedimentos semelhantes ao processo de linearidade. Para isso, foram elaboradas curvas analíticas com o componente de interesse respeitando a faixa dinâmica de trabalho próxima ao limite de detecção. Após a elaboração destas curvas, obteve-se a regressão linear por mínimos quadrados, a qual foi expressa pela equação de primeira ordem ($y = ax + b$), determinando-se, então, a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e a média do coeficiente angular. Em seguida, estes dados foram aplicados às seguintes equações: **LOD = 3,3.(s/S)** e **LOQ = 10.(s/S)**, obtendo-se os limites de detecção e quantificação, respectivamente. Nestas equações, s é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e S é a média do coeficiente angular.

A **precisão** foi avaliada de duas formas: repetibilidade ou precisão intra-ensaio e intermediária ou inter-ensaio. As repostas obtidas foram: área do pico, tempo de retenção e altura do pico. A repetibilidade foi avaliada conforme ao grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de no mínimo seis amostras. Tais medições foram efetuadas sob as mesmas condições cromatográficas e procedimentos de extração, único local e equipamento, realizando repetições em curto espaço de tempo. A precisão intermediária seguiu os mesmos parâmetros da repetibilidade, porém esta foi realizada em dias consecutivos.

Em geral o estudo de **recuperação** de um método é realizado em função de obter duas principais informações: 1ª saber o quanto do componente de interesse é possível de recuperar depois de efetuado, por exemplo, o método de extração; 2ª calcular a **exatidão** do método, a qual pode ser dada pelo cálculo do erro relativo entre os valores teóricos e reais

obtidos ao final do processo. O estudo de recuperação apresentado neste trabalho foi realizado com a fortificação de uma dada matriz, elaborando-se um total de 15 experimentos, dividido em três níveis de concentração, os quais foram analisados em triplicata.

A matriz, **considerando os compostos fixos**, foi elaborada da seguinte maneira: cerca de 100 g das folhas pulverizadas de *C. langsdorffii* foram submetidas à extração exaustiva com auxílio de aparelho de Soxhlet (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Logo depois, o material vegetal foi seco em estufa de ar quente e circulante (45°C) e o tamanho da partícula foi padronizado em 35 mesh. Em seguida, procederam-se os métodos de extração e análise conforme descrito no item 3.4.1. Desta forma foi possível avaliar se o material vegetal estava esgotado corretamente.

Prosseguindo com o estudo de **recuperação dos fixos**, em 15 frascos tipo Erlenmeyer de 50 mL de capacidade, pesaram-se 500 mg da planta seca e esgotada (matriz). Estes frascos foram divididos em três grupos, compostos por 5 replicatas.

No grupo 1 adicionaram-se 2 mL de solução etanólica do padrão 3-O- α -ramnopiranosil-quercetina (quercitrina) na concentração de 3,22 mg/mL. Esta concentração foi chamada de **Nível 1**. No grupo 2 adicionou-se 1 mL desta solução padrão, **Nível 2**. No grupo 3 adicionou-se 0,5 mL da mesma solução, **Nível 3**.

A homogeneização e incorporação do padrão de quercitrina na matriz foram obtidas após evaporação do etanol à temperatura ambiente. A seguir adicionaram-se 20 mL de uma solução de benzofenona (~ 49 μ g/mL) em etanol-água (7:3) e procedeu-se à extração utilizando-se a metodologia descrita no item 3.4.1. Terminado o processo de extração, a amostra foi filtrada e alíquotas de 5 mL foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1 mL de solução de piperonal (2,9 mg/mL) usado como padrão secundário. Logo em seguida, estas amostras foram analisadas por CLAE (item 3.4.1). Ao final de todo o processo as concentrações finais (valores teóricos) de quercitrina foram: 67,08 μ g/mL (nível 3), 134,16 μ g/mL (nível 2) e 268,33 μ g/mL (nível 1). As concentrações finais do padrão interno foram cerca de 40 μ g/mL e a concentração final do padrão secundário foi 483 μ g/mL.

Este mesmo procedimento foi realizado com todos os outros compostos de interesse, mas com solução padrão inicial em diferentes concentrações: rutina em 2,39 mg/mL, 3-O- α -ramnopiranosil-canferol em 2,0 mg/mL, quercetina em 4,27 mg/mL e canferol em 2,07 mg/mL. Os cálculos da exatidão podem ser expressos em função da porcentagem do erro relativo, por meio da seguinte equação:

$$\text{Exatidão (\% erro)} = [(\text{valor teórico} - \text{valor real})/\text{valor real}].100$$

Quanto à **recuperação dos voláteis**, a matriz selecionada foi hexano, grau cromatográfico.

Considerando o β -cariofileno, pesaram-se separadamente, alíquotas de 68 mg (**Nível 1**), 26 mg (**Nível 2**) e 13 mg (**Nível 3**), em frascos com capacidade para 25 mL. Logo em seguida, estas alíquotas foram dissolvidas com 20 mL de solução hexânica de padrão interno, TMB, na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, alíquotas de 2 mL de cada nível de concentração foram submetidas à hidrodestilação em quintuplicata seguindo o item 3.4.2. Ao final destes procedimentos, 1 mL de cada replicata foi coletado e transferido para tubos de ensaio contendo 500 μL de solução hexânica de octadecano (ps; 2,2 mg/mL). Em seguida, cada replicata foi analisada três vezes por CG-DIC (item 3.4.2). Ao final de todo processo, os valores teóricos de β -cariofileno foram 11,09, 4,30 e 2,10 mM. Os valores finais para os padrões interno e secundário foram 2,0 e 3,0 mM, respectivamente. Este mesmo procedimento foi realizado com os outros dois sesquiterpenos em estudo. Os valores teóricos para o α -copaeno foram de 2,20, 1,10 e 0,45 mM. Já os teóricos para o α -humuleno foram de 3,40, 1,70 e 0,70 mM. O erro relativo foi dado pela equação da exatidão anteriormente descrita.

A **robustez** dos métodos cromatográficos de fases líquida (CLAE) e gasosa (CG) e de extração dos compostos fixos foi realizada seguindo o planejamento fatorial proposto por Plackett – Burman, o qual foi descrito por Heyden et al., (2001). Na tabela 2 apresentam-se os fatores, limites, níveis e o método nominal considerando a cromatografia de fase líquida e

o método de extração dos fixos. Na tabela 3 apresentam-se os mesmos parâmetros levando-se em conta a CG-DIC.

Tabela 2: Fatores e níveis investigados no teste de robustez considerando CLAE.

Fatores	Limite	Nível (-1)	Nível (+1)	Nominal
A Quantidade de amostra (mg)	± 20	480	520	500
B Tempo de extração (minutos)	± 10	50	70	60
C Temperatura de extração (°C)	± 5	35	45	40
D Rotação (rpm)	± 5	145	155	150
E Partícula (mesh)	± 5	30	40	35
F Solvente extrator (mL)	± 5	15	25	20
G Vazão (mL/min)	± 0,1	0,9	1,1	1
H Fase móvel inicial (%)	± 1	4	6	5
I Fase móvel intermediária (%)	± 1	39	41	40
J Comprimento de ondas (nm)	± 1	256	258	257
K Volume injetado (µL)	± 1	9	11	10

Tabela 3: Fatores e níveis investigados no teste de robustez considerando CG-DIC.

Fatores	Limite	Nível (-1)	Nível (+1)	Nominal
A Temperatura do injetor °C	± 5.0	235	245	240
B Temperatura do detector °C	± 5.0	275	285	280
C <i>Split</i> (divisor de amostra)	± 2.0	78	82	80
D Vazão de gás H ₂ (mL/min)	± 0.2	1.8	2.2	2.0
E Temperatura inicial do forno °C	± 5.0	95	105	100
F Temperatura final do forno °C	± 5.0	195	205	200
G Vazão de gás N ₂ (mL/min)	± 3.0	42	48	45

Neste estudo de robustez, para os compostos fixos, foram selecionados onze fatores, portanto, 12 experimentos foram realizados (HEYDEN, et al., 2001; Tabela 4). Já com relação aos voláteis sete fatores e 8 experimentos foram efetuados (Tabela 5).

Tabela 4: Planejamento fatorial para onze fatores e doze experimentos.

Fatores	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	Respostas
Experimentos												
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	y_1
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	y_2
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	y_3
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	y_4
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	y_5
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	y_6
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	y_7
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	y_8
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	y_9
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	y_{10}
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	y_{11}
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	y_{12}

As letras correspondem aos fatores da tabela 2.

Tabela 5: Planejamento fatorial para sete fatores e oito experimentos, CG-DIC.

Fatores	A	B	C	D	E	F	G	Respostas
Experimentos								
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	y_1
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	y_2
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	y_3
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	y_4
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	y_5
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	y_6
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	y_7
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	y_8

As letras correspondem aos fatores da tabela 3.

Considerando as tabelas 4 e 5, notam-se que cada experimento deve ser realizado seguindo os níveis (- 1) e (+ 1) já pré-determinado para cada um dos fatores (Tabelas 2 e 3). Ao final de cada experimento obtém-se uma resposta y . As respostas selecionadas foram: área do pico, tempo de retenção, altura do pico e concentração do componente de

interesse. Obtendo-se, por exemplo, as doze respostas calculam-se o efeito estimado para cada fator levando-se em conta as respostas selecionadas. Para tal, utiliza-se a equação:

$$E_x = \frac{\sum y(+)}{N/2} - \frac{\sum y(-)}{N/2}$$

E = efeito estimado da resposta **X** (selecionada). Em que **X** pode ser a área ou tempo de retenção ou altura ou concentração;

$\sum y(+)$ = somatória das respostas no nível positivo;

$\sum y(-)$ = somatória das respostas no nível negativo;

N = número de experimentos do desenho experimental.

Visando melhorar a interpretação do efeito estimado, o qual foi obtido pela equação anterior, pode-se converter este pelo coeficiente de variação (**CV %**) da seguinte forma: utiliza-se a equação **CV (%) = (S/X).100**, na qual, **S**: é o efeito estimado e **X**: é a média das respostas **y**, considerando as diferentes respostas e fatores.

3.6 Metodologias para avaliar a sazonalidade de compostos fixos

As folhas de *C. langsdorffii* para avaliação sazonal foram coletadas de uma árvore localizada ao lado do Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP (Figura 13). As coletas destas amostras foram iniciadas em 20 de fevereiro de 2009 e finalizadas em 20 de março de 2010. Ao longo deste período, geralmente todo dia 20 de cada mês, uma alíquota pesando cerca de 20 g das folhas deste indivíduo foram coletadas e submetidas à secagem. Posteriormente, os extratos hidroalcoólicos destas amostras foram obtidos e analisados, como descrito no item 3.4.1. Esta *C. langsdorffii* mede cerca de 10 m de altura e seu tronco base mede cerca de 50 cm de diâmetro. Uma foto representativa desta árvore pode ser vista na Figura 6. Adicionalmente, na figura 14 é apresentada a localização da *C. langsdorffii* na FFCLRP Campus da USP, da qual também foram coletadas folhas, visando principalmente à realização dos estudos fitoquímicos.



Figura 13. Em destaque apresenta-se a *C. langsdorffii* ao lado do Laboratório de Farmacognosia.

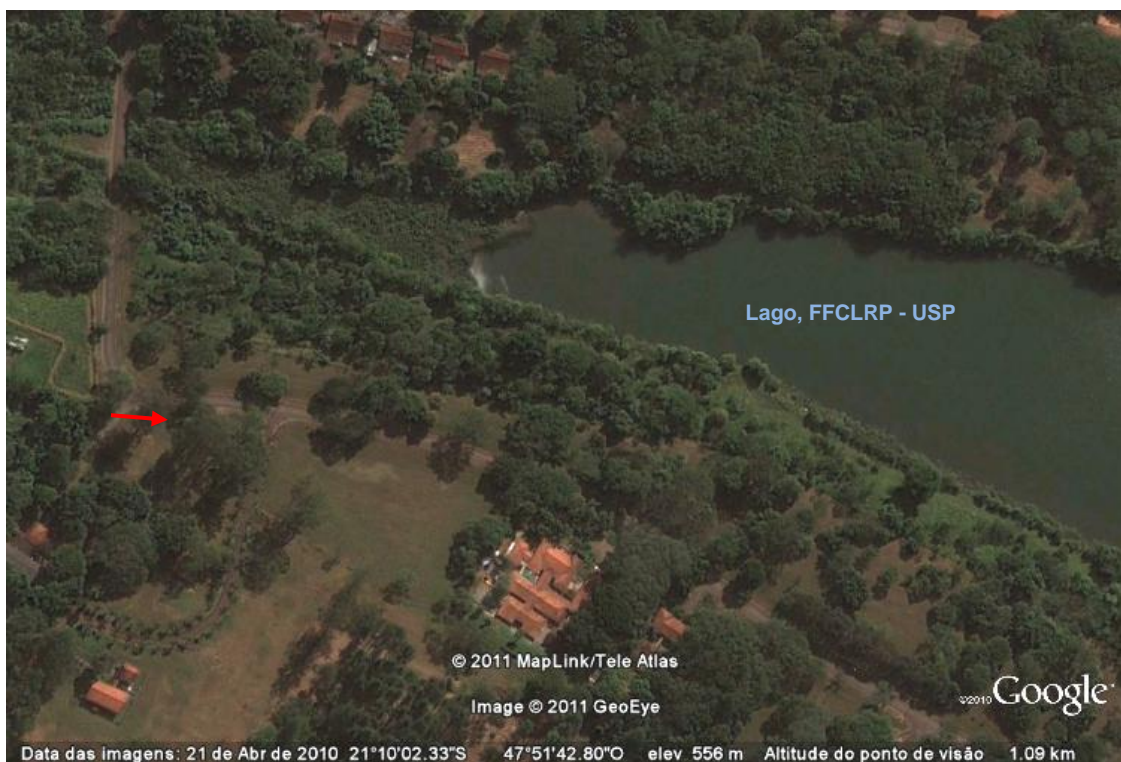


Figura 14. Em destaque apresenta-se a *C. langsdorffii* nas proximidades do Lago no Campus da USP, FFCLRP.

As análises qualitativas dos extratos hidroalcoólicos foram realizadas com base nos perfis cromatográficos obtidos por CLAE/UV-DAD. Para tanto, os perfis cromatográficos das amostras foram comparados com os perfis de padrões autênticos. A quantificação dos principais compostos foi dada por curvas analíticas, as quais foram elaboradas com os devidos padrões cromatográficos. Além disso, para minimizar eventuais erros de quantificação foi utilizada padronização interna.

4. Resultados e Discussões

I - FITOQUÍMICA

4.1 Fase inicial

A proposição inicial durante o estudo fitoquímico foi o isolamento e a identificação de padrões cromatográficos, a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii*, para serem utilizados na validação de método analítico. Por isso, este extrato foi, preliminarmente, analisado por cromatografia sob diferentes meios de detecção. No entanto, naquele momento estas análises não foram suficientemente esclarecedoras. Assim, uma alíquota deste extrato hidroalcoólico bruto foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna clássica. Por meio deste fracionamento os resultados obtidos também não foram adequados. Desta forma, optou-se em separar este extrato bruto em frações por partição líquido-líquido (Esquema 2). Depois deste procedimento dois fatores despertaram atenção: na fração obtida em acetato de etila foi possível observar presença de dois componentes, aparentemente majoritários; o rendimento da fração aquosa foi cerca de 50% do total. Diante destas informações, a primeira alternativa foi à purificação dos compostos presentes na fração em acetato. Diferentes metodologias para tal fracionamento foram utilizadas, porém a mais promissora, naquele momento, foi utilizando fase estacionária Sephadex[®] LH 20 seguida de cromatografia líquida - CLAE com detector UV. Por meio destes procedimentos, os componentes **CL 10** e **CL 11** foram isolados. Posteriormente, em estudo comparativo por CLAE, os compostos **CL 10** e **11** foram detectados no extrato hidroalcoólico da espécie em estudo na forma de dois picos majoritários. Estes compostos foram identificados por técnicas espectroscópicas.

A investigação inicial da fração aquosa foi feita por CLAE/UV. Diferentes parâmetros cromatográficos foram desenvolvidos e avaliados obtendo-se o perfil cromatográfico apresentado na figura 15.

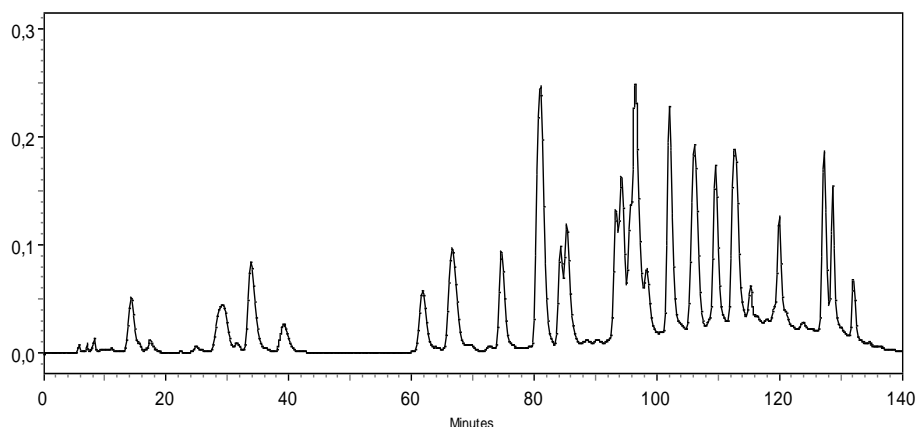


Figura 15: Perfil cromatográfico da fração aquosa por CLAE em 257 nm.

Na figura 15 nota-se a presença de pelo menos 17 picos. Por isso, naquele momento, a purificação da fração aquosa liofilizada passou a ser o objetivo principal do trabalho. Diferentes meios de separação foram utilizados, incluindo cromatografia líquida a vácuo, colunas clássicas e/ou tipo *flash* empacotadas com sílica de fase reversa C₁₈ e Sephadex. Além disso, as subfrações obtidas dos procedimentos em coluna foram purificadas por CLAE no modo preparativo. No entanto, sempre depois de, aparentemente, obter um componente com pureza adequada, este era novamente analisado por CLAE na forma analítica em que se detectava a presença de impurezas significativas. Na figura 16 apresenta-se um exemplo de composto polar purificado, porém não identificado. Em um dado momento, a partir de amostras polares bem purificadas foram realizadas análises espectroscópicas, visando pelo menos sugerir a classe destes compostos. Entretanto, os resultados não foram condizentes.

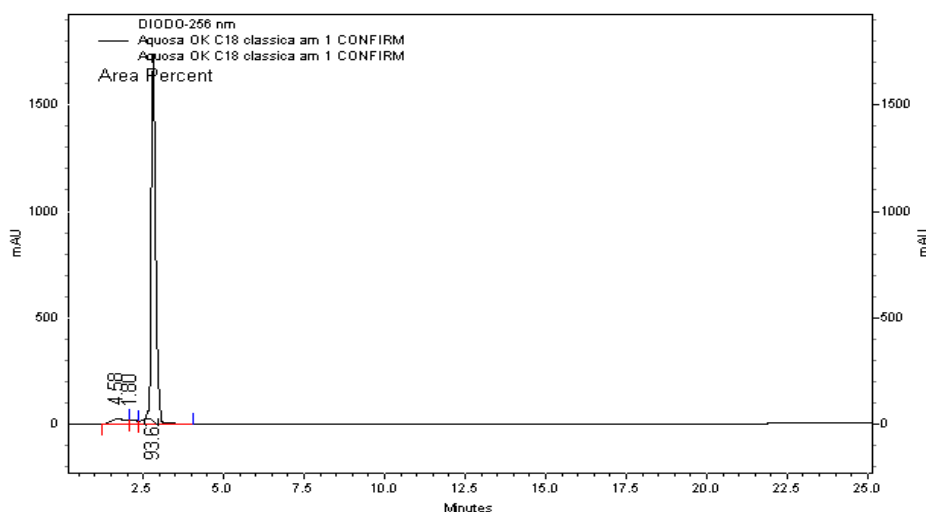


Figura 16: Composto polar purificado eluindo-se com fase móvel consistindo de 95% de água e 5% metanol, sob gradiente linear.

Dentre os trabalhos realizados na *University of Mississippi*, novas tentativas foram feitas visando à obtenção de compostos polares. Para tanto, metodologias de fracionamento (Esquema 3) similares às usadas no Laboratório de Farmacognosia – USP foram repetidas. Além disso, diferentes sistemas de solventes, bem como fases estacionárias de distintas composições como fase normal, polimérica, C₁₈ e celulose foram avaliadas. Por meio destes procedimentos, o componente denominado **CL Y** foi purificado. Na figura 17 é mostrado o processo de análise por meio de diferentes fases estacionárias. Nas figuras 18 e 19 apresentam-se a purificação de **CL Y** e seu aspecto físico, respectivamente. Depois de obter o composto **CL Y** seco e purificado, este foi analisado por métodos espectroscópicos – RMN de ¹H e ¹³C. Mantendo-se a linha de raciocínio, estes espectros estão apresentados nas figuras 20 e 21. No entanto, os próximos espectros serão apresentados em apêndices. Na avaliação destes espectros não foi possível sugerir a elucidação estrutural de **CL Y**. Considerando todos os procedimentos com os polares surgiram algumas hipóteses como, por exemplo, a presença de compostos minoritários capazes de serem detectados por UV, porém difíceis de serem purificados. Outras sugestões foram com relação à presença de açúcares, taninos, eventualmente degradáveis, peptídeos e/ou aminoácidos. O fato é que até o momento não foi possível sugerir a estrutura química destes compostos.

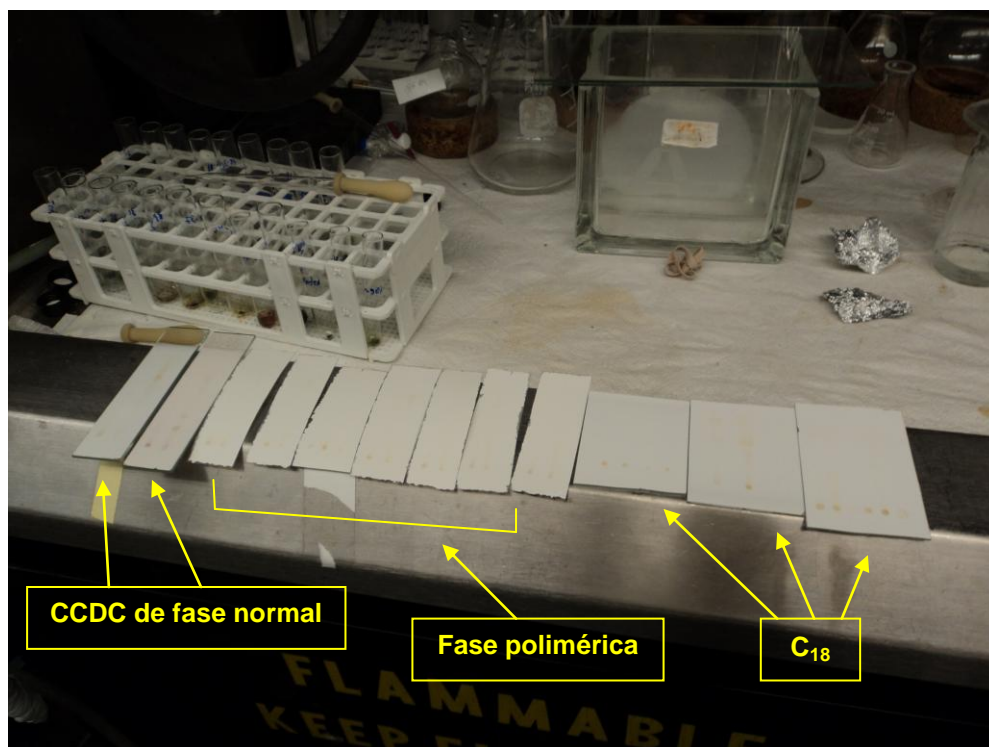


Figura 17: Distintas fases estacionárias na purificação de polares.

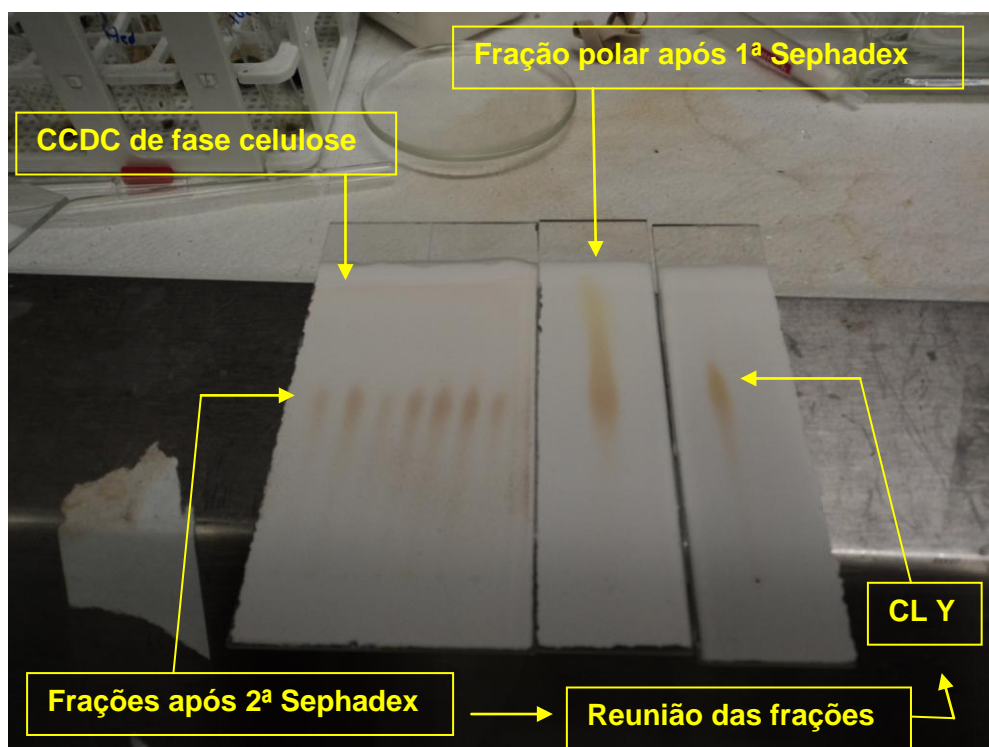


Figura 18: Exemplo representativo do isolamento de CL Y. Fase móvel = butanol:ácido acético:água 40:10:50 %.

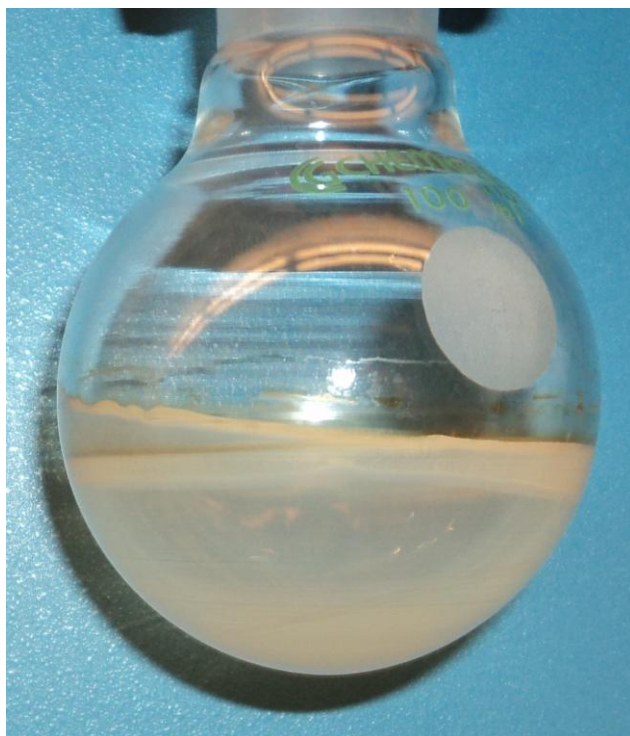


Figura 19: Aspecto físico de **CL Y**.

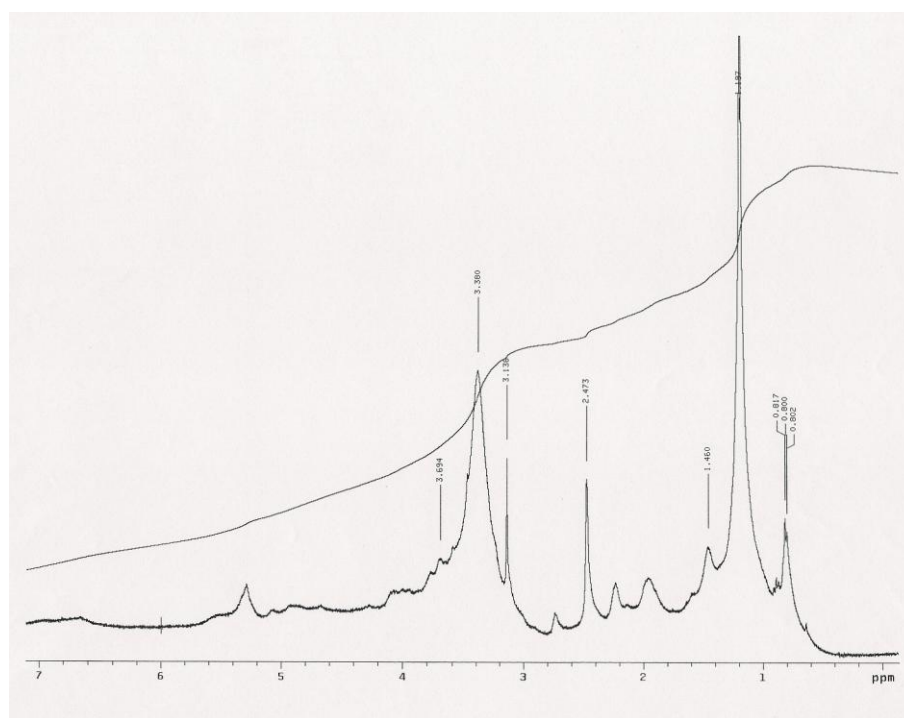


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H obtido de **CL Y** ($\text{DMSO-d}_6/400$ MHz).

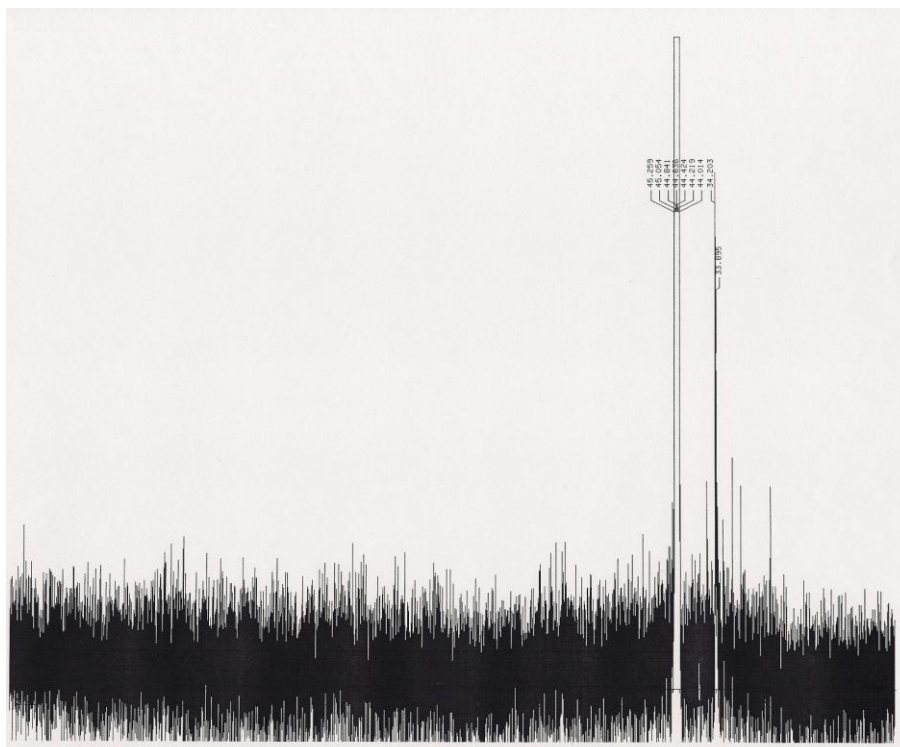


Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C obtido de **CL Y** (DMSO- d_6 /100 MHz).

4.2 Voláteis da *C. langsdorffii*: rendimento, análise e identificação.

Quanto aos estudos sobre rendimento, os óleos essenciais presentes nas folhas de *C. langsdorffii* foram extraídos por hidrodestilação por 6 h. No entanto, após 4 h de destilação foi observado, no coletor graduado do aparelho tipo Clevenger, a formação de camada de óleo correspondente a 0,5 mL. Este procedimento de hidrodestilação foi mantido por mais 2 h e o volume de óleo essencial não mostrou alteração significativa. A partir deste ponto, considerou-se o término deste procedimento. Tendo em vista que o material de partida foram 300 g de folhas frescas, o rendimento do óleo essencial das folhas de *C. langsdorffii* foi correspondente a 0,2%. Por meio deste resultado verificou-se que 4 h de destilação equivalem ao período suficiente para obtenção destes constituintes voláteis. O rendimento da fração volátil obtida a partir do óleorresina da espécie também foi calculado. Após 1 h de hidrodestilação foram obtidos cerca de 2 mL destes voláteis. Este período foi estendido por mais 1 h. Ao término deste, foram medidos aproximadamente 7 mL desta

fração volátil *in natura*. Considerando que a matéria-prima inicial foi correspondente a 23 mL de óleorresina, o rendimento destes voláteis foi equivalente a 30%.

Objetivando-se ao estudo químico comparativo, as frações voláteis a partir das folhas e do óleorresina foram analisadas por cromatografia de fase gasosa com detector de ionização de chama - CG-DIC. O uso de padronização interna nesta modalidade cromatográfica é bastante coerente, pois neste caso as interferências sofridas pelo padrão e amostra serão as mesmas, o que pode minimizar eventuais erros. Assim, para a escolha do padrão interno, foram testados alguns compostos objetivando-se encontrar àquele que atendesse aos requisitos básicos, ou seja, elevado grau de pureza, composição química semelhante à amostra em questão, eluição em tempo de retenção diferente dos componentes da amostra, baixo custo e disponibilidade no mercado. Desse modo o padrão interno mais adequado foi o 1,2,4,5-tetrametilbenzeno - TMB, o qual aparece no cromatograma com o tempo de retenção de 2,7 minutos. Nas figuras 22A-C apresentam-se o perfil dos voláteis das folhas, destacando-se a resolução e a separação dos componentes, o perfil das substâncias que foram avaliadas para a escolha do padrão interno e o perfil destes voláteis com a adição de TMB, respectivamente.

Logo depois de estabelecidas as condições analíticas por CG-DIC e a escolha da padronização interna, alíquotas das frações voláteis foram submetidas à análise de identificação por cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massas CG/EM, usando-se as mesmas condições. A CG/EM é utilizada especialmente para auxiliar à confirmação e ou identificação de componentes que também sejam voláteis e ou termicamente estáveis. Esta técnica permite como a CG-DIC, a separação dos constituintes e ainda fornece um espectro de massas para cada pico. Por meio da análise destes espectros sugere-se o peso molecular dos compostos de interesse. Além disso, há a possibilidade de comparar os dados obtidos da espectrometria de massas em relação àqueles disponíveis nas bibliotecas eletrônicas de compostos, bem como àqueles citados na literatura.

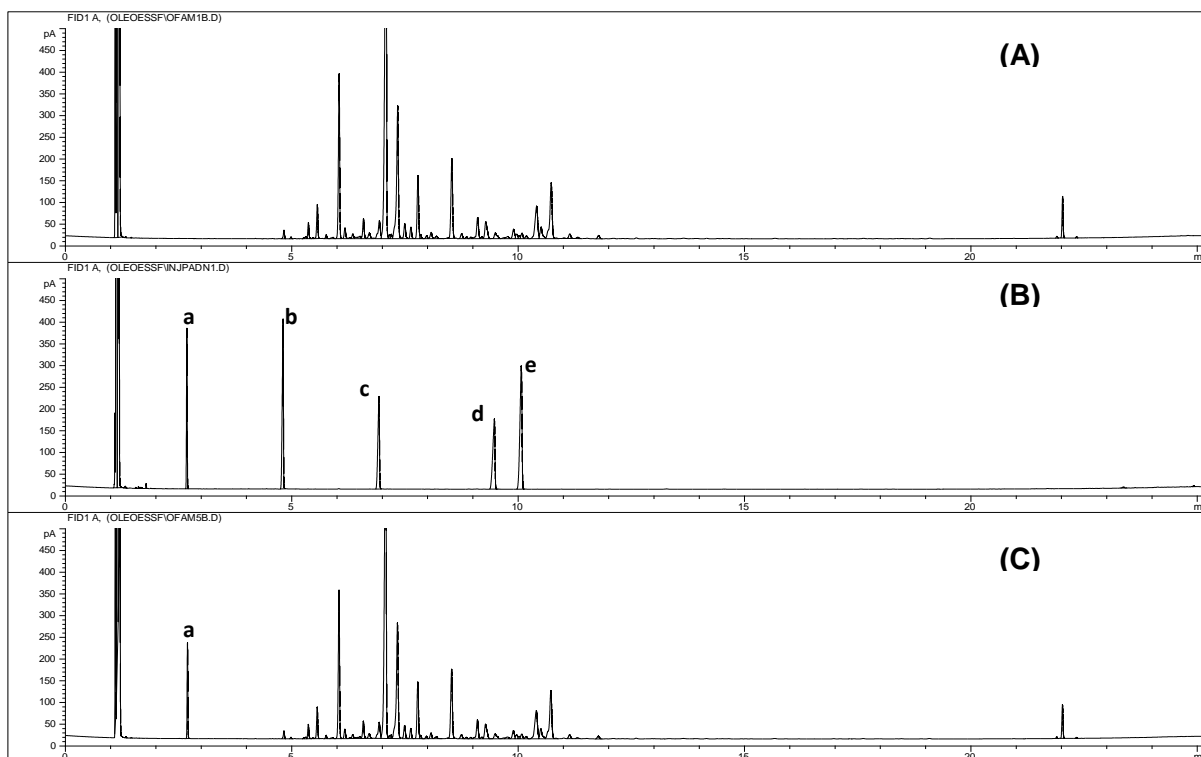


Figura 22: (A) Perfil cromatográfico dos voláteis das folhas de *C. langsdorffii* por CG-DIC; (B) Substâncias avaliadas para escolha do padrão interno: **a:** TMB; **b:** piperonal; **c:** veratraldeído; **d:** trimetóxi-benzeno; **e:** benzofenona. (C) Perfil destes voláteis com adição de **a:** TMB (TR = 2,7 min).

Outro procedimento importante refere-se à determinação dos índices de retenção para cada componente em análise. Estes índices relacionam o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série homóloga de hidrocarbonetos. Tais índices permitem uma melhor avaliação dos dados obtidos, além de possibilitarem também a realização de estudos comparativos entre diferentes laboratórios, com tabelas citadas na literatura e com bibliotecas eletrônicas. A Figura 23A mostra-se o perfil cromatográfico dos padrões de hidrocarbonetos. Logo em seguida analisou-se a amostra (Figura 23B). Por conseguinte obteve-se o perfil resultante da co-injeção, a qual se refere à análise da amostra acrescentada dos padrões (Figura 23C). Estes dados foram obtidos por CG-DIC e CG/EM considerando as mesmas amostras e metodologias.

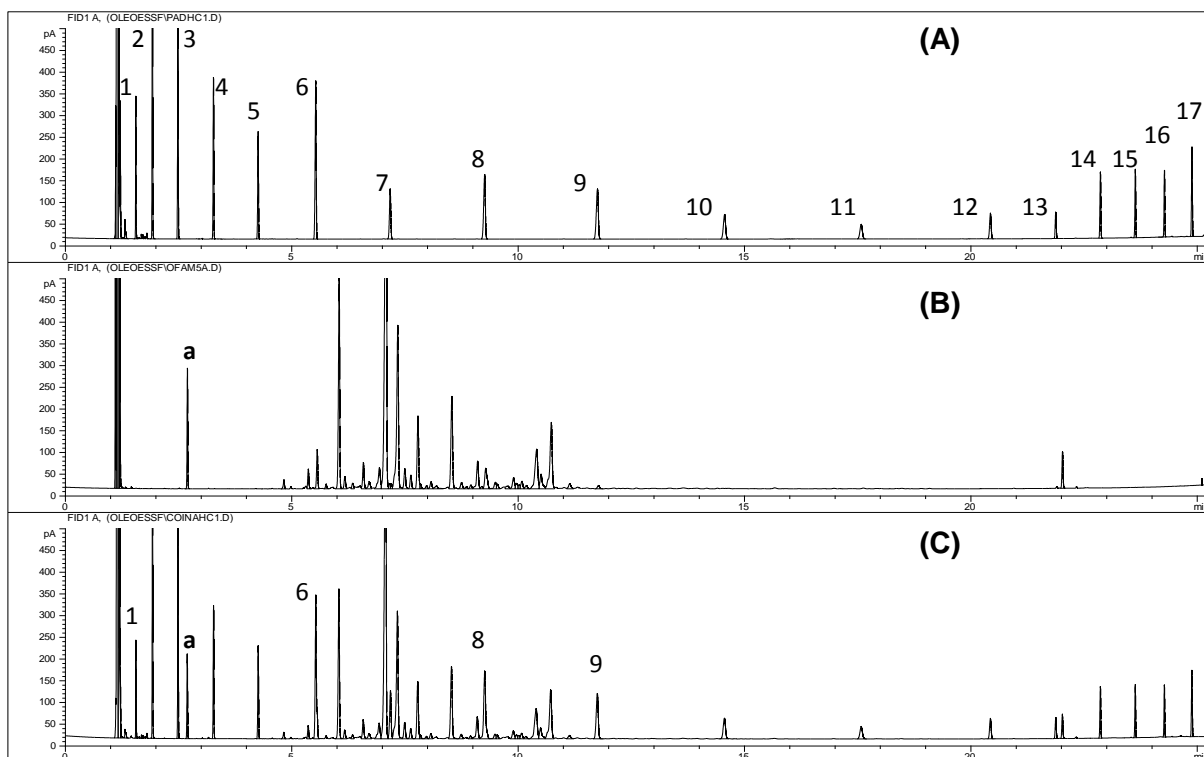


Figura 23: (A) Perfil cromatográfico dos padrões de hidrocarbonetos: a numeração de 1 a 17 representa os padrões de C₉ a C₂₅, respectivamente. (B) Perfil da amostra obtida das folhas de copaíba. (C) Co-injeção, amostra com adição dos padrões de hidrocarbonetos. Os três perfis foram obtidos por CG-DIC. a: padrão interno - TMB.

Por meio dos dados obtidos pelas co-injeções, aplicados à equação descrita por Clement (1990) foi possível a determinação dos índices de retenção utilizando ambas as técnicas CG-DIC e CG/EM. Os espectros de massas forneceram os pesos moleculares e o perfil de fragmentação de cada componente. Desta forma, por meio de estudo comparativo detalhado envolvendo os dados obtidos em relação àqueles disponíveis na biblioteca Wiley e referências bibliográficas (Tabela 6) foi possível identificar um total de 12 constituintes voláteis: α -cubebeno, α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno, α -bergamoteno, α -humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, δ -cadineno, germacreno B, globulol e α -cadinol. Na tabela 6 são apresentados os tempos e índices de retenção calculados por CG-DIC, dados que correspondem aos disponíveis na literatura, índice de retenção calculado por CG/EM e a porcentagem relativa dos voláteis presentes no óleo das folhas de copaíba. Na figura 24 estão as fórmulas estruturais de todos os componentes identificados.

Tabela 6: Dados utilizados para a identificação dos componentes voláteis.

Componente	Tr-DIC*	IR-DIC*	IR; TC; Ref.	IR-EM [#]	IR; TC; Ref.	(%)Rel.
α -Cubebeno	4,978	1356	1351; DB-5; 1	1343	1345; DB-5; 3	0,1
α -Copaeno	5,362	1387	1389; HP-1; 2	1372	1376; DB-5; 1	0,63
β -Elemeno	5,757	1413	1395; DB-5; 3	1386	1391; DB-5; 7	1,63
β -Cariofileno	6,041	1430	1428; DB-5; 3	1416	1418; DB-5; 1	9,77
α -Bergamoteno	6,168	1438	1436; DB-5; 1	1430	1431; EC-1; 8	0,70
α -Humuleno	6,577	1463	1457; DB-5; 4	1450	1454; DB-5; 1	1,20
Germacreno D	7,074	1494	1499; DB-5; 5	1476	1480; DB-5; 1	38,75
Biciclogermacreno	7,332	1507	1516; F-sot; 6	1490	1494; DB-5; 7	8,58
δ -Cadineno	7,781	1529	1530; DB-5; 5	1514	1524; DB-5; 1	4,04
Germacreno B	8,527	1564	1560; DB-5; 5	1553	1556; DB-5; 9	6,03
Globulol	9,095	1590	1583; DB-5; 4	1579	1576; DB-5; 1	1,59
α -Cadinol	10,718	1658	1653; DB-5; 1	1651	1653; DB-5; 1	6,51

* Tempos e índices de retenções utilizando-se detector de ionização de chama e coluna HP-5. [#] Índice de retenção por espectrometria de massas com coluna DB-5. **IR; TC; Ref.** = Índice de retenção, tipo de coluna utilizada e referências encontradas na literatura. **(%)** Relativo obtido por CG/EM. (1 – ADAMS, 2001; 2 – CHUNG; EISERICH; SHIBAMOTO, 1993; 3 – CHOI, 2003; 4 – QUEIROGA et al., 2008; 5 – HOGNADOTTIR; ROUSEFF, 2003; 6 – JIROVETZ et al., 2002; 7 – TELLEZ et al., 1999; 8 – SZAFRANEK et al., 2005 e 9 – PINO et al., 2005).

Visando demonstrar o efeito comparativo da composição química destes constituintes, foi realizada uma análise do óleo-resina *in natura*. Assim, na figura 25A-C são apresentados os perfis cromatográficos do óleo-resina e de seus voláteis e do óleo essencial das folhas, respectivamente. Estes perfis foram apresentados de forma expandida enfatizando a boa separação dos componentes. Além disso, nota-se que o método cromatográfico, embora ainda não tenha sido validado, foi reprodutível e permite analisar amostras obtidas de diferentes matrizes sem nenhuma modificação dos parâmetros cromatográficos estabelecidos.

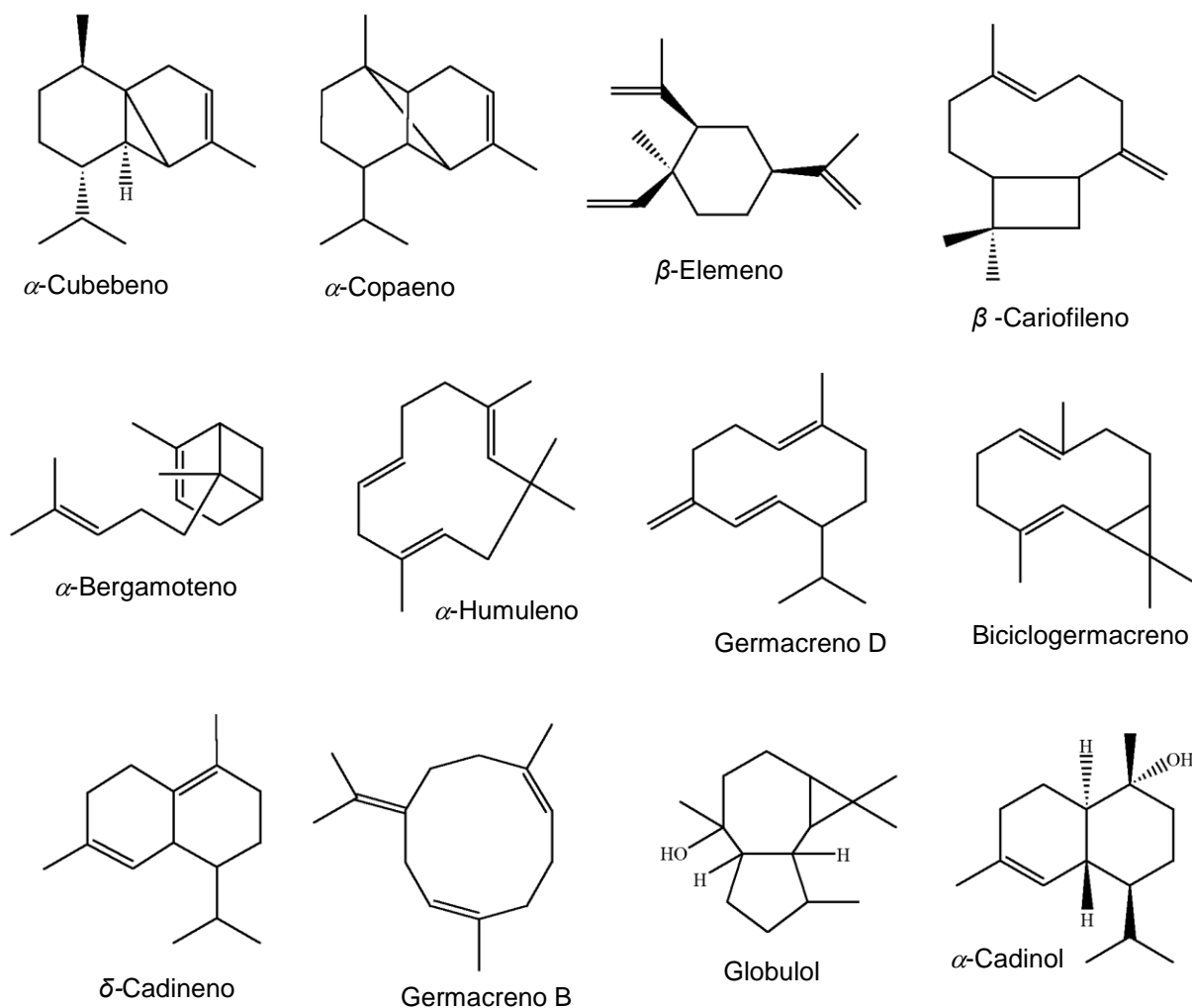


Figura 24: Estruturas químicas dos constituintes identificados por CG/EM.

Quanto à composição química, de um modo geral todos os voláteis identificados são comuns e podem estar presentes em outras amostras de óleos essenciais obtidas de diferentes espécies vegetais. Qualitativamente, avaliando-se os perfis cromatográficos da figura 25 observa-se que a composição química do óleo-resina é bastante semelhante aos seus voláteis, destacando-se o β -cariofileno (Figura 25A-B). O perfil do óleo essencial das folhas (Figura 25C) apresentou similaridade com os outros perfis considerando os componentes de numeração de 2 a 7, porém mostrou ser diferente por também apresentar a presença de no mínimo mais cinco constituintes. Destes, o germacreno D e bicyclgermacreno também se apresentam como majoritários.

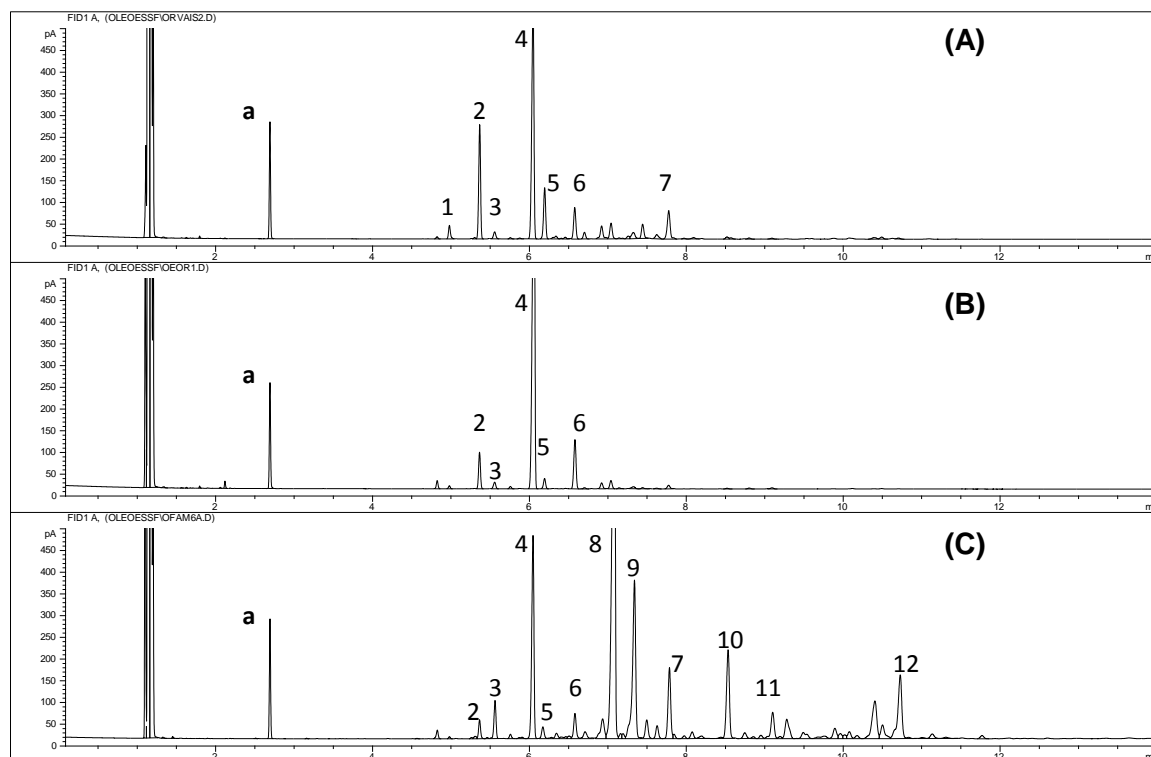


Figura 25: Perfis cromatográficos comparativos de amostras de *C. langsdorffii*. **(A)** óleorresina *in natura*; **(B)** fração volátil do óleorresina; **(C)** óleo essencial das folhas frescas. 1: α -cubebeno; 2: α -copaeno; 3: β -elemeno; 4: β -cariofileno; 5: α -bergamoteno; 6: α -humuleno; 7: δ -cadineno 8: Germacreno D; 9: Bicyclogermacreno; 10: Germacreno B; 11: Globulol; 12: α -cadinol e a: TMB.

Quanto à porcentagem relativa, os compostos identificados na amostra de óleorresina equivalem a aproximadamente 80% do conteúdo desta amostra. O β -cariofileno foi o de maior destaque correspondendo a 42%, seguido por α -copaeno (17%), α -bergamoteno (9%), α -humuleno (6%) e δ -cadineno com cerca de 6%. Já os constituintes voláteis do óleorresina correspondem à cerca de 90% de seu conteúdo, em que β -cariofileno, α -copaeno, α -bergamoteno e α -humuleno apresentaram percentuais relativos de 76,3%, 5,2%, 1,7% e 8,7%, respectivamente. Os constituintes identificados no óleo essencial das folhas são correspondentes a aproximadamente 80% de seu total e o percentual relativo de cada um deles está apresentado na tabela 6. Destes, destaca-se o germacreno D (39%) e, na seqüência, o β -cariofileno (9,8%), bicyclogermacreno (8,6%), α -cadinol (6,5%) e germacreno B (6%). É importante ressaltar que durante os

procedimentos com os voláteis, alíquotas dos respectivos hidrolatos também foram analisadas não apresentando nenhum componente promissor.

Conforme mencionado nas metodologias de caracterização do óleo-resina, a fração 1 foi analisada por CG-DIC e CG/EM. Nota-se que nesta amostra também foram detectados os compostos voláteis comuns à espécie em estudo (Figura 26).

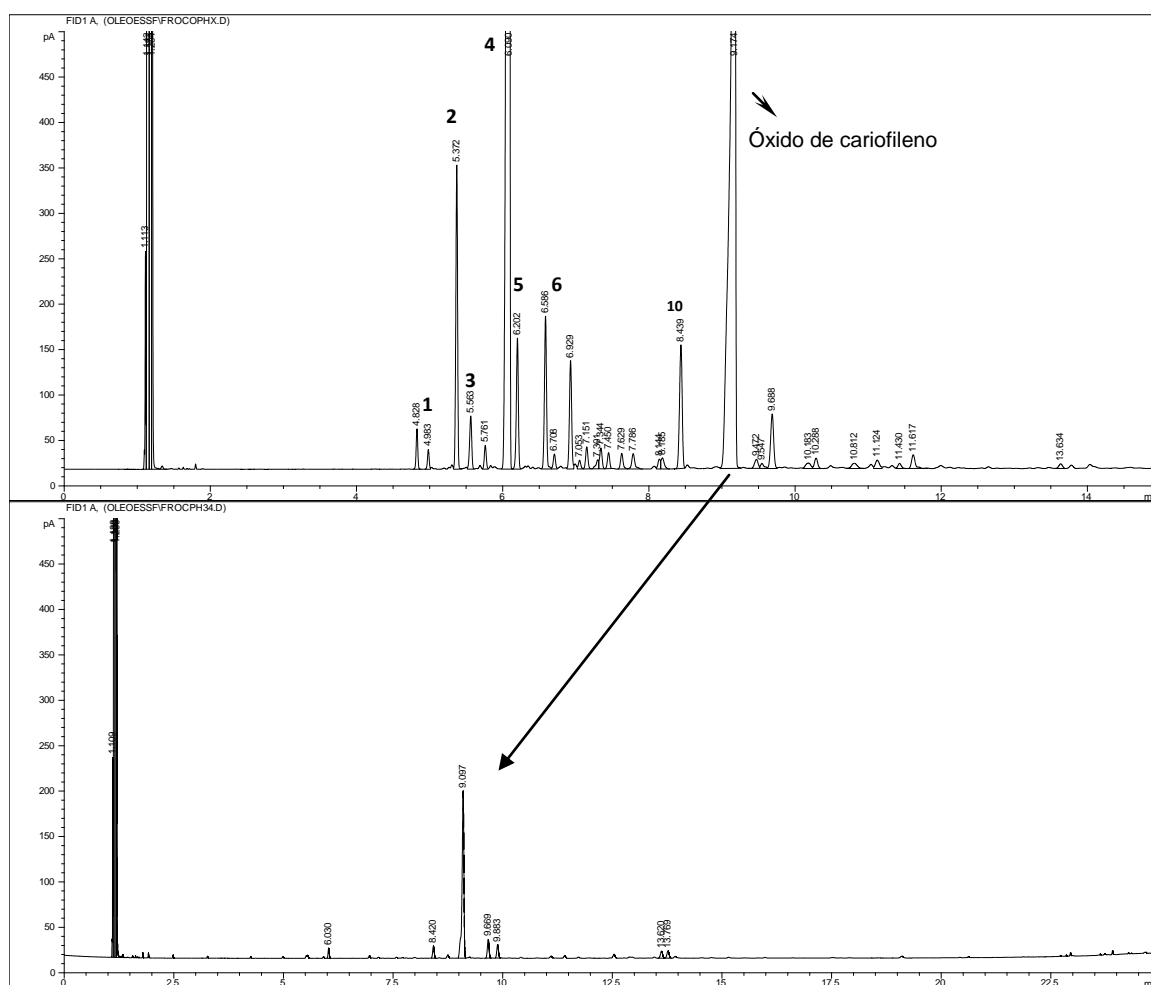


Figura 26: Composição química da fração 1 – CLV. Destaca-se a purificação de óxido de cariofileno ao longo do processo de fracionamento. Os números seguem a figura 25.

4.3 Sesquiterpeno e diterpenos obtidos do óleorresina da *C. langsdorffii*.

A composição química do óleorresina da copaíba esta amplamente divulgada na literatura (ROMERO, 2007; VEIGA JR; PINTO, 2002). Durante o estudo químico comparativo com as frações voláteis foi observado o elevado potencial destes compostos para o desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos. Neste âmbito, de um lado haveria a possibilidade em validar método para garantir a qualidade dos voláteis. Por outro lado, poderia sugerir método para assegurar a quantificação de sesquiterpenos e diterpenos. Para tanto, os principais diterpenos teriam que ser isolados e identificados. Neste contexto, o trabalho em conjunto com o Prof. Dr. Sérgio - UNIFRAN foi efetivamente produtivo. No laboratório da Universidade de Franca foram isolados cerca de 10 diterpenos. Ao longo destes procedimentos, amostras e frações ricas nestes compostos foram fornecidas e monitoradas analiticamente por CG-DIC, CG/EM e RMN. Durante estas análises observou-se que três sesquiterpenos, o α -copaeno, β -cariofileno e α -humuleno se destacavam como majoritários. Por isso, os padrões sintéticos destes três compostos foram adquiridos. Desta forma, considerando diterpenos e sesquiterpenos foi feito trabalho alternativo com relação à atividade antimicrobiana. Neste trabalho, o ácido copálico demonstrou ser o diterpeno mais ativo contra bactérias cariogênicas (SOUZA et al., 2011). Na figura 27 apresentam-se as estruturas químicas representativas deste trabalho.

O diterpeno ácido copálico é considerado um dos marcadores químicos do óleorresina de todas as espécies do gênero *Copaifera* (VEIGA JR et al., 2007). Considerando os dados de próton ^1H para este ácido é possível verificar os deslocamentos em δ 5,66, 4,48 e 4,84 atribuídos aos hidrogênios H-14, H-17a e H-17b respectivamente. Estes hidrogênios são característicos de diterpenos do tipo labdano comumente encontrados no óleorresina de plantas do gênero *Copaifera* (VEIGA JR; PINTO, 2002; TAPPIN et al., 2004; VEIGA JR et al, 2007).

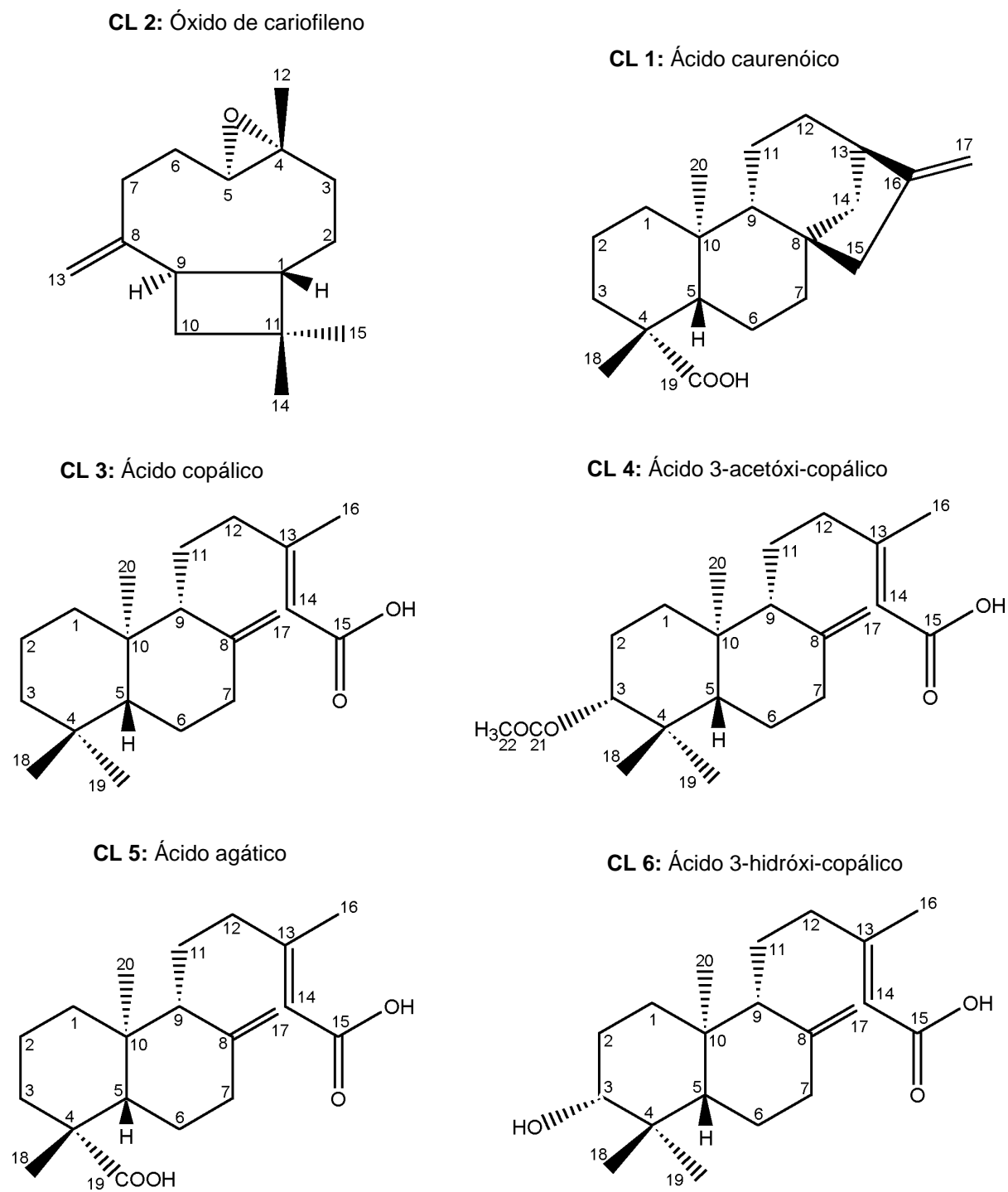


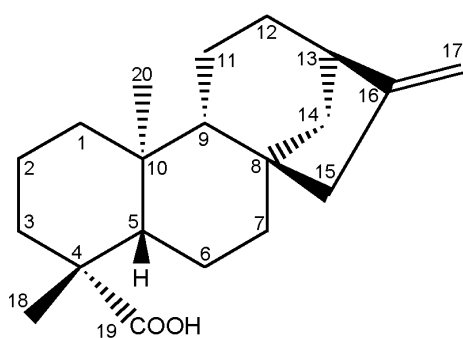
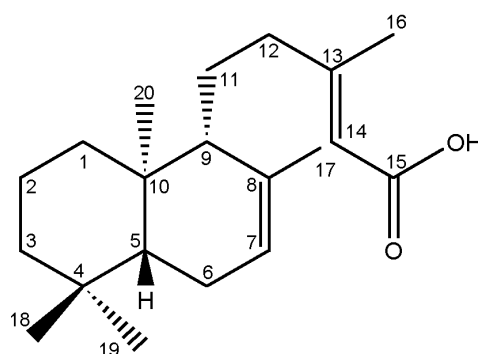
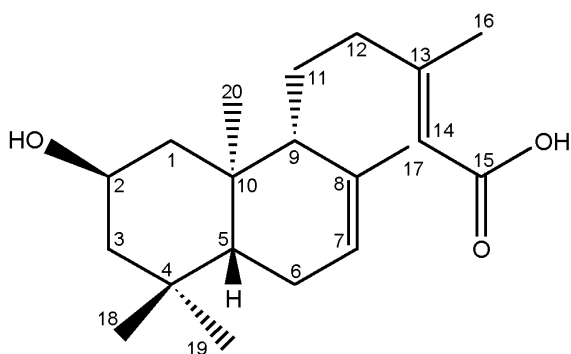
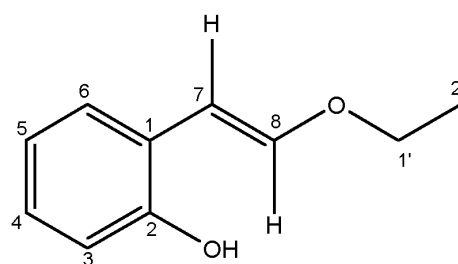
Figura 27: Sesquiterpeno e diterpenos isolados e identificados do óleoresina.

Continuando a avaliação do ácido copálico observam-se também deslocamentos em δ 0,68, 0,79, 0,86 e 2,16, os quais foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios dos grupos metílicos H-20, H-19, H-18 e H-16. Na figura 27 apresentam-se três derivados do ácido copálico: os ácidos 3-acetóxi-copálico, agático e 3-hidróxi-copálico. Por isso, estes três diterpenos apresentam deslocamentos semelhantes considerando os hidrogênios H-14, H-17a e H-17b. Quanto ao ácido 3-acetoxi-copálico pode-se observar a presença do grupamento $-\text{OCOCH}_3$ ligado ao C-3, o qual foi atribuído confiavelmente de acordo com Ohsaki et al., (1994). Já com relação ao ácido agático, a principal diferença pode ser observada pelos dados de carbono apresentando os carbonos carbonílicos com deslocamentos em δ 172,8 e 184,0, os quais foram atribuídos aos carbonos C-15 e C-19 (ZDERO; BOHLMANN; KING, 1991). Considerando-se o ácido 3-hidróxi-copálico, o deslocamento em δ 3,26 atribuído ao hidrogênio H-3 e a presença de um carbono carbinólico C-3 (δ 79,0) contribuem à caracterização deste ácido (ROMERO; BAPTISTELLA; IMAMURA, 2009). As discussões quanto ao óxido de carifileno e ácido caurenóico serão apresentadas no próximo item.

4.4 Caracterizações químicas dos extratos dos frutos, flores e folhas da *C. langsdorffii*

Do fracionamento do extrato dos frutos foram isolados os diterpenos **CL 1**: ácido caurenóico, **CL 7**: ácido *ent*-labda-7,13-dien-15-óico, e o **CL 9**: ácido 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-óico. Neste extrato também foi encontrado o componente **CL 8**: éter 2-hidróxifenilvinil etílico (Figura 28). Durante a purificação desta amostra foi observada a presença de voláteis comuns ao gênero *Copaifera* (Figura 24). Finalizado o trabalho com o extrato dos frutos, o extrato obtido das flores foi analisado por CCDC. Durante estas análises foi observado que a composição química do extrato das flores era bastante semelhante àquela definida para o extrato dos frutos (Figura 29). No entanto, para eliminar maiores dúvidas a purificação do extrato das flores também foi realizada. Na figura 30 são

apresentadas as estruturas químicas dos compostos isolados das flores. Comparando as composições químicas dos extratos obtido de frutos e flores notam-se dois diferenciais: o derivado éter foi isolado somente dos frutos; no extrato das flores foi encontrado o componente **CL 10**: 3-O- α -ramnopiranosil-quercetina (quercitrina).

CL 1: Ácido caurenóico**CL 7:** Ácido *ent*-labda-7,13-dien-15-óico**CL 9:** Ácido 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-óico**CL 8:** Éter 2-hidróxifenilvinil etílico**Figura 28:** Componentes isolados do extrato obtido dos frutos.

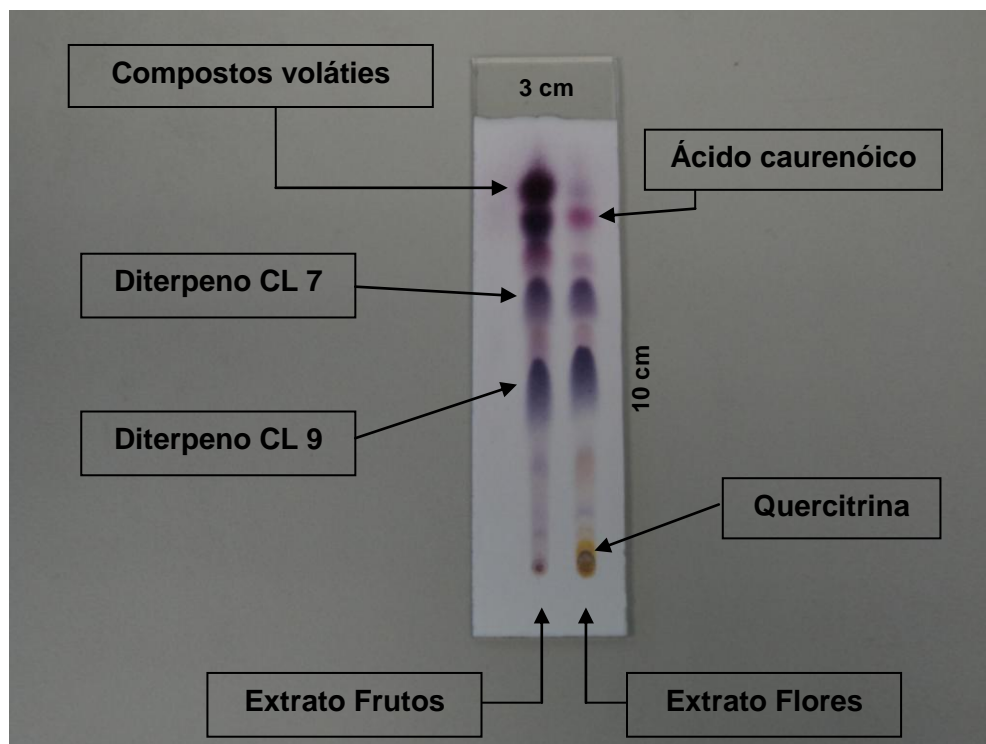
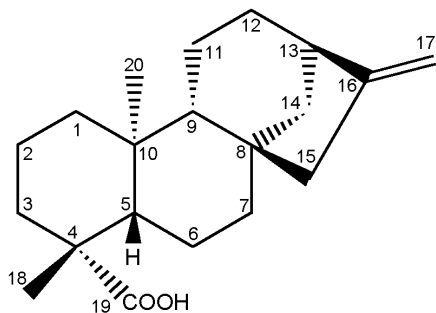
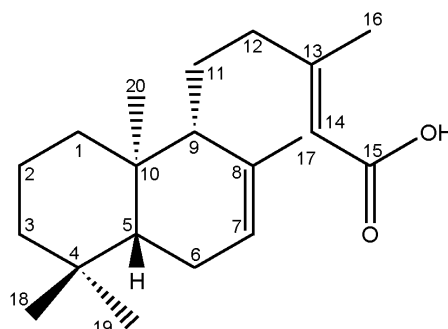


Figura 29: Análise por CCDC dos extratos das flores e frutos Fase móvel = Hx:AcOEt, 85:15 %.

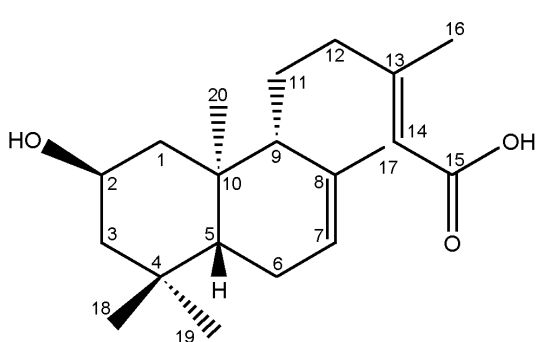
CL 1: Ácido caurenóico



CL 7: Ácido *ent*-labda-7,13-dien-15-óico



CL 9: Ácido 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-óico



CL 10: Quercitrina

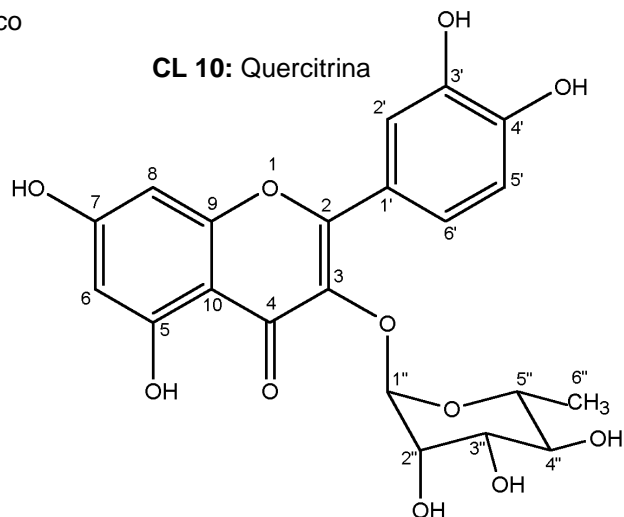


Figura 30: Composição química do extrato obtido das flores.

Quanto à fração obtida em acetato de etila do extrato das folhas, esta foi fracionada duas vezes. O primeiro fracionamento foi realizado no Laboratório de Farmacognosia a partir de folhas coletadas na região de Sorocaba-SP. O segundo foi feito na *University of Mississippi* com folhas coletadas na FFCLRP, Campus da USP. Por meio do segundo fracionamento foram obtidas cinco SFrações (Esquema 3). Estas SFrações foram analisadas por CCDC, possibilitando a sugestão dos grupos de compostos (Figura 31).

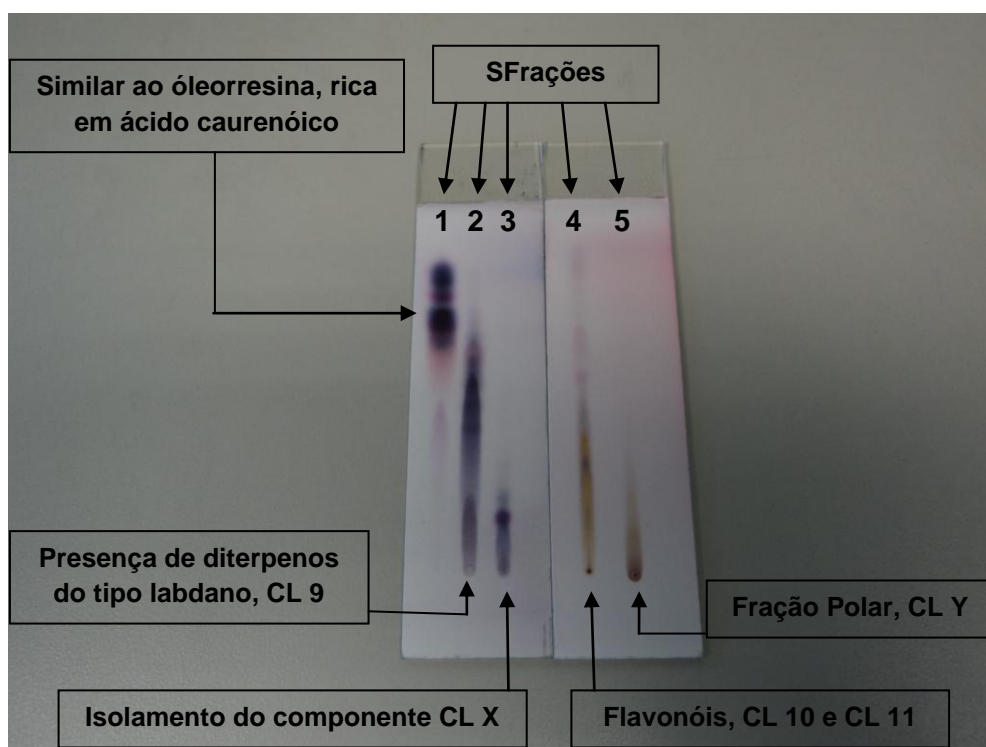


Figura 31: Análise por CCDC das SFrações obtidas do fracionamento descrito no esquema 3. Fase móvel SFrações 1 - 3 = Hx:AcOEt, 85:15 %. Fase móvel SFrações 4 e 5 = AcOEt:MeOH, 95:5 %.

Este segundo fracionamento foi bastante significativo no que diz respeito às seguintes informações: a SFração 1 consiste basicamente de óleo-resina *in natura* com elevados teores de ácido caurenóico; a SFração 2 apresenta diterpeno do tipo labdano, o qual também foi encontrado nos extratos das flores e frutos; nas purificações anteriores somente as SFrações 4 e 5 foram encontradas. Portanto, com base nestas informações pode-se afirmar que nos extratos das folhas, flores e frutos de *C. langsdorffii* é possível detectar sesquiterpenos e diterpenos comuns ao óleo-resina da espécie, além de flavonóis e compostos polares.

A purificação da SFração 1 resultou no isolamento dos compostos **CL 1**: ácido caurenóico, **CL 2**: óxido de cariofileno e **CL 12**: caurenol. A partir da SFração 2 foi obtido o **CL 9**: ácido 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-óico. Já a purificação da SFração 4 resultou na obtenção dos flavonóis **CL 10**: quercitrina e **CL 11**: 3-*O*- α -ramnopiranosil-canferol (Figura 32).

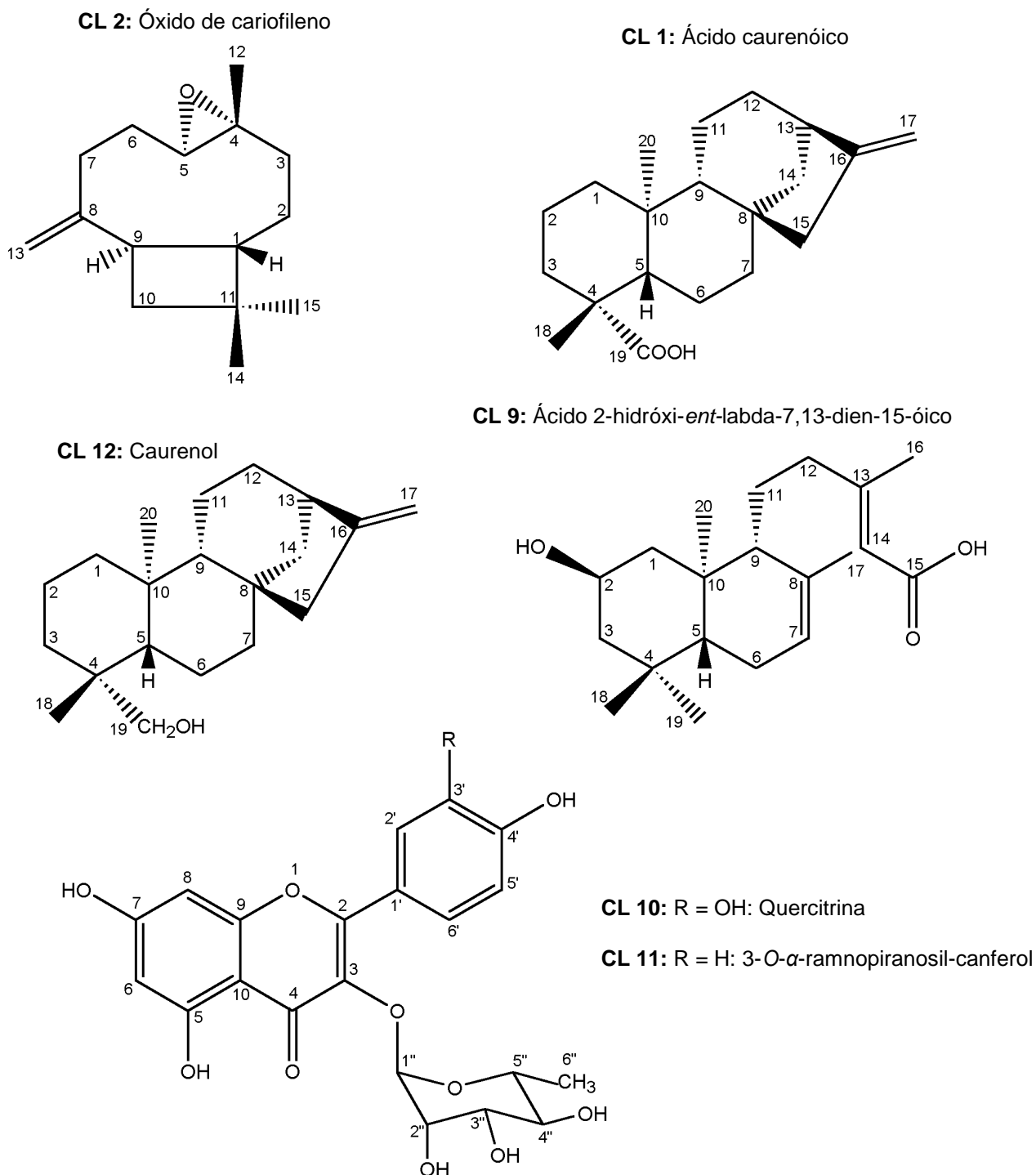


Figura 32: Compostos isolados da fração em acetato de etila obtida das folhas.

Destaca-se que o ácido caurenóico já foi obtido de diferentes espécies de copaíba levando em conta o fracionamento do óleo-resina (VEIGA JR; PINTO, 2002). O isolamento deste diterpeno também já foi descrito a partir de outras plantas, como por exemplo, *Viguiera* (DA COSTA; VICHNEWSKI; HERZ, 1996). Por isso, este derivado caurano é composto alvo em diferentes estudos, nos quais demonstram seu potencial anti-inflamatório, antiespasmódico, dentre outros (AMBRÓSIO et. al., 2004 e 2006). No presente trabalho este ácido foi encontrado em todas as amostras estudadas. A partir do fracionamento das folhas (Esquema 3) foi possível isolar 680 mg deste diterpeno na forma de cristais, indicando um grau de pureza bastante elevado. Portanto, em estudos futuros, relacionado a alguma atividade biológica a partir de amostras de *C. langsdorffii*, certamente este ácido deverá ser considerado substância fundamental a ser avaliada. A figura 33 apresenta-se este componente obtido das amostras em estudo.

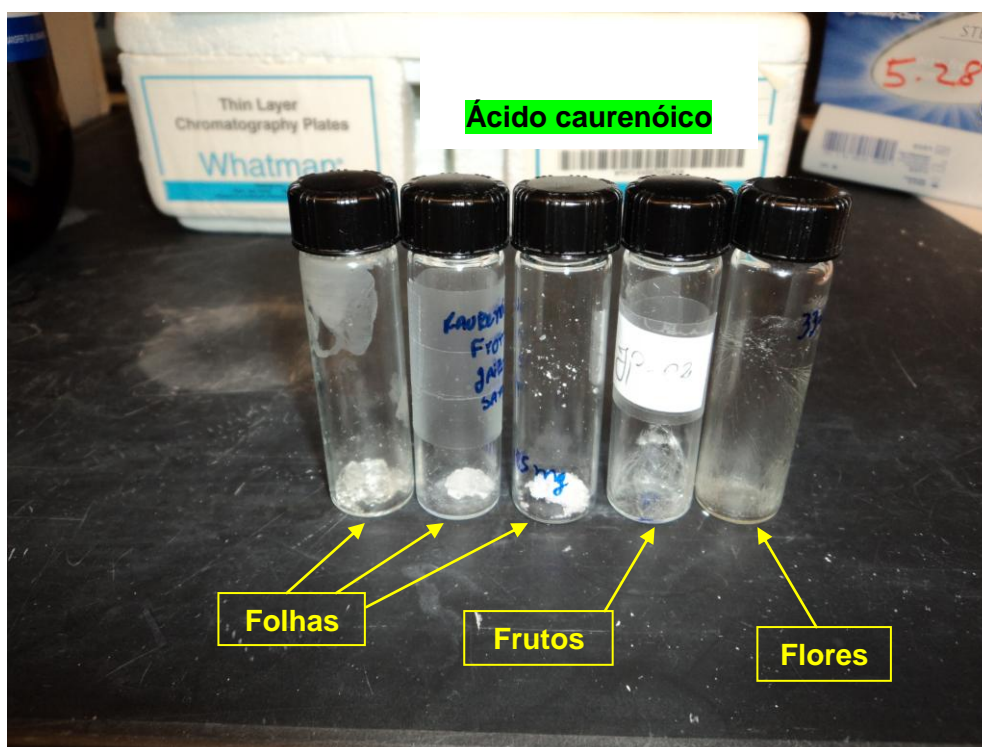


Figura 33: Ácido caurenóico obtido da *C. langsdorffii*.

Quanto ao componente **CL X**, este não apresentava absorção na luz UV_{254/366}, porém consistia de média polaridade, já que o mesmo era bem solúvel em acetato de etila. Por isso, a SFração 3 (Figura 31) foi submetida à purificação conforme descrito no esquema 3. Depois do procedimento em coluna clássica, foi possível obter este componente aparentemente com pureza adequada considerando a reunião entre as frações 79 a 85 (Figura 34).

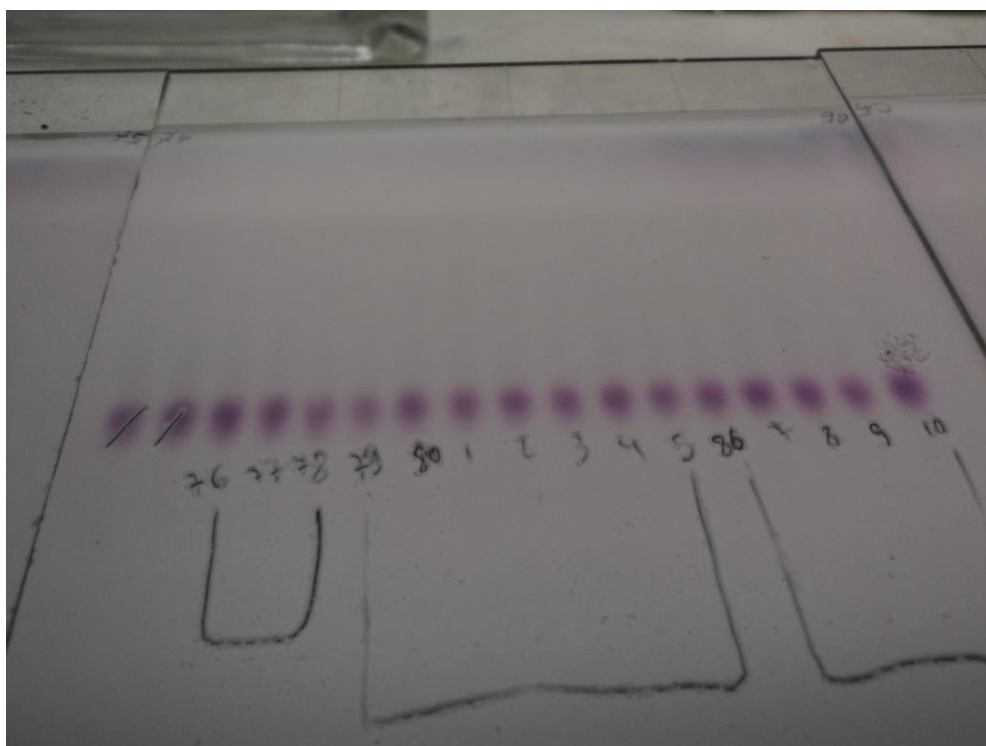


Figura 34: Análise por CCDC visando obtenção de **CL X**. Fase móvel = AcOEt:Hx, 95:5 %.

Logo depois da reunião destas frações e após secagem efetiva da amostra foi efetuada as análises por RMN do próton ^1H e ^{13}C . Intrigantemente, na análise de RMN de ^{13}C foi observada a presença de dois compostos bastante similares. Por isso, novas separações por meio de CCDC foram realizadas a partir desta amostra já purificada. Novamente, na análise de ^{13}C foram observados pelo menos 40 sinais considerando a presença de dois compostos. Durante estas análises surgiu a possibilidade de **CL X** ser parecido com o esteróide sitosterol. Estudo comparativo por CCDC envolvendo estes dois

compostos foi realizado resultando em tempos de retenção bastante diferentes. Portanto, não foi possível sugerir esta estrutura.

Na tentativa de isolar compostos diferentes e/ou melhorar o perfil de separação de alguns componentes, amostras obtidas dos fracionamentos dos extratos dos frutos, flores e folhas juntamente com o ácido caurenóico foram metiladas por meio de reação de derivatização utilizando-se reagente diazometano (Figura 35).

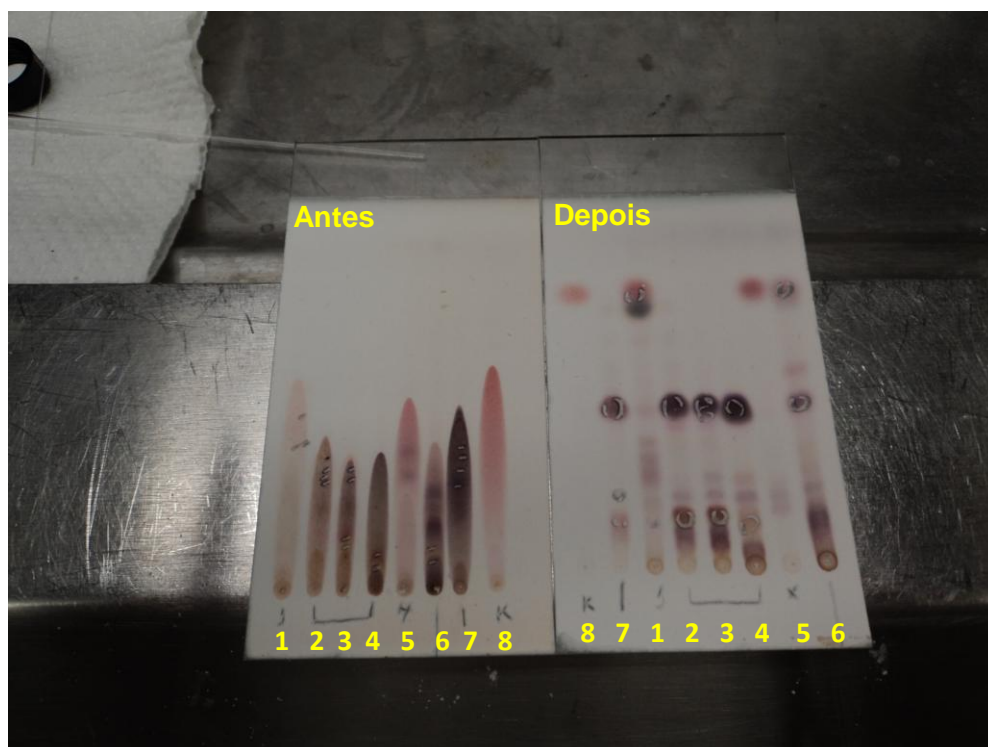


Figura 35: Perfis por CCDC, demonstrando o antes e depois da derivatização. Nº 1 e 7: frações obtidas dos frutos; Nº 2, 3 e 4: amostras proveniente das flores; Nº 5 e 6: frações resultante das folhas e Nº 8: ácido caurenóico. Fase móvel = Hx:AcOEt, 90:10 %.

Logo após a derivatização (Figura 35), observou-se que nas frações 2 a 4, 6 e 7 foi possível detectar um componente em comum. Optou-se por reunir estas frações excluindo-se a fração 6, já que nesta também foi detectado outros compostos menos polares, os quais poderiam dificultar a purificação do composto de interesse. Após esta reunião a amostra resultante foi purificada (Figura 36).

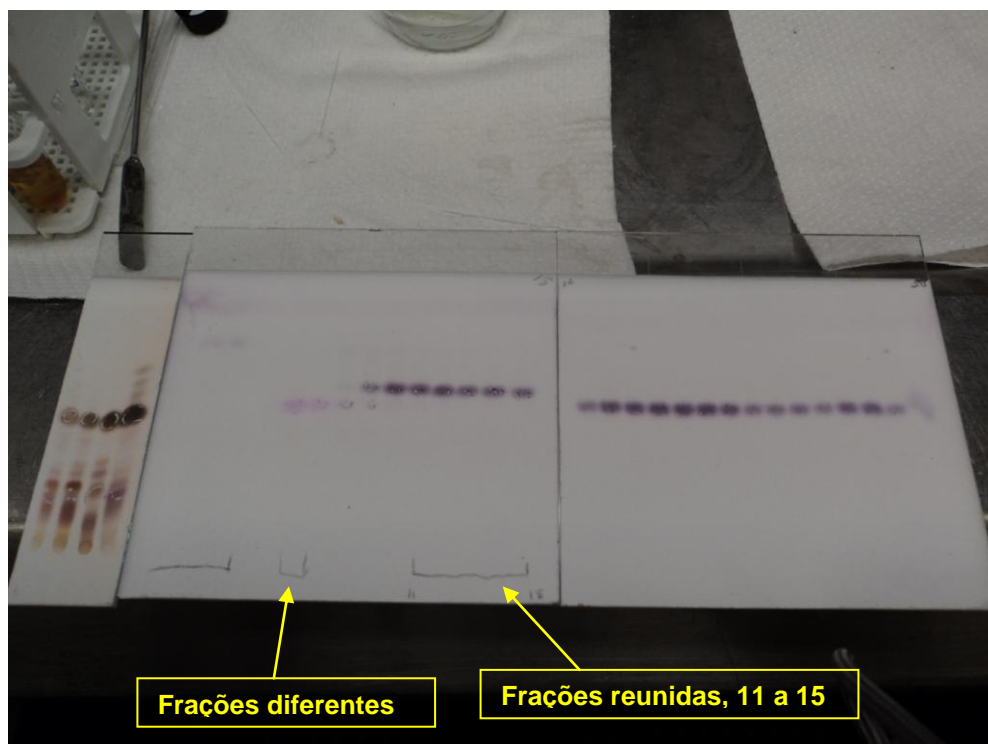


Figura 36: Análise por CCDC das frações obtidas durante o processo de purificação da amostra derivatizada. Fase móvel = Hx:AcOEt, 90:10 %.

Conforme pode ser visto na figura 36, a reunião das frações 11 a 15 resultou na obtenção de **CLM 9**: 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-oato de metila com bom teor de pureza. Além disso, nesta figura também podem ser observadas duas frações que apresentavam perfis cromatográficos com tempos de retenção diferentes do composto de interesse. Estas duas frações foram reunidas obtendo-se então o componente **CL 13**: 4-metóxi-cinamoato de etila. A derivatização do ácido caurenóico resultou na obtenção de seu derivado metilado **CL 1M**: caurenóico de metila. Na figura 37 são apresentadas estas três estruturas químicas.

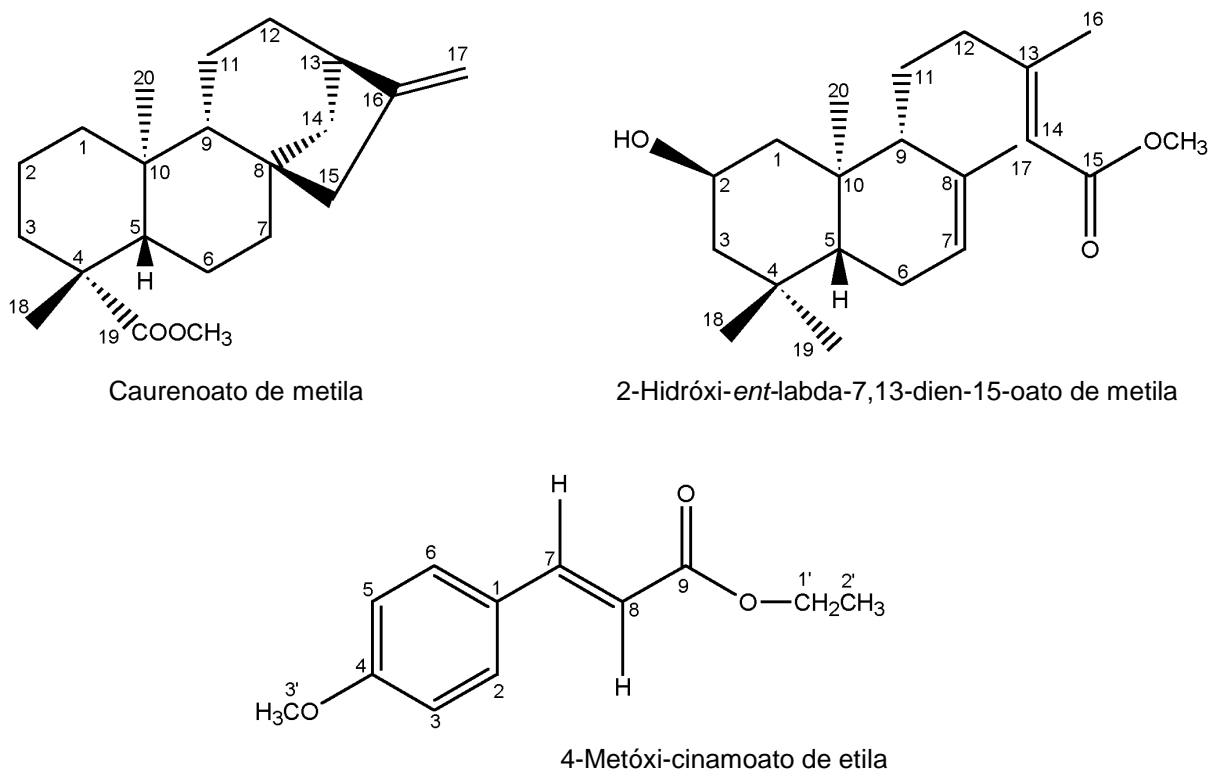
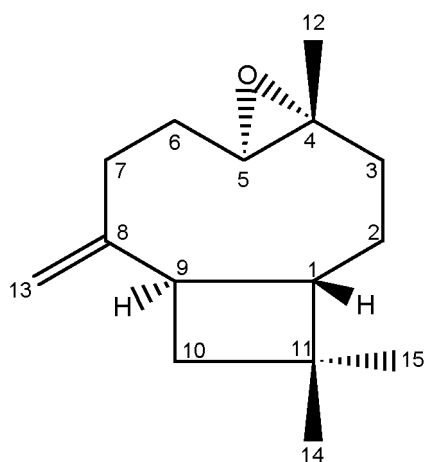


Figura 37: Derivados metilados obtidos das partes aéreas da *C. langsdorffii*.

4.4.1 Elucidação estrutural dos compostos purificados.



Óxido de cariofileno

RMN de ^1H (**Apêndice 1**)

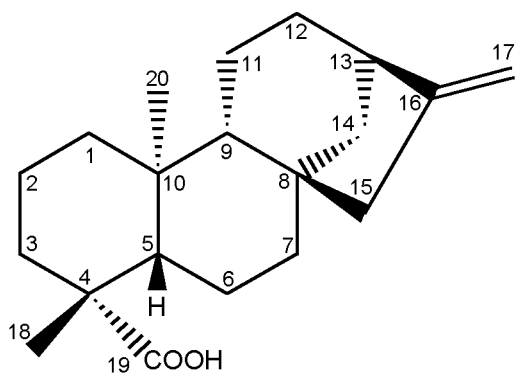
RMN de ^{13}C (**Apêndice 2**)

Tabela 7: Atribuições de ^{13}C

Dados em concordância com Moreira et al., (2007).

O espectro de RMN de ^1H obtido para o sesquiterpeno óxido de cariofileno apresenta dois sinais em δ 4,82 e 4,94, integrados para 1H cada, os quais são referentes aos hidrogênios da ligação dupla exocíclica, localizada entre os carbonos C-8 e C-13. Verifica-se

também nesse espectro a presença de três sinais (s, 3 H cada) em δ 1,17, 0,97 e 0,95 que foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios dos grupos metílicos H-12, H-15 e H-14. No espectro de RMN de ^{13}C destaca-se a presença dos carbonos olefínicos C-8 e C-13 em δ 151,72 e 112,84, além dos carbonos C-5 e C-4 em δ 63,63 e 59,69 atribuídos aos carbonos ligados ao grupamento epóxido.



Ácido *ent*-caur-16-en-19-óico (caurenóico)

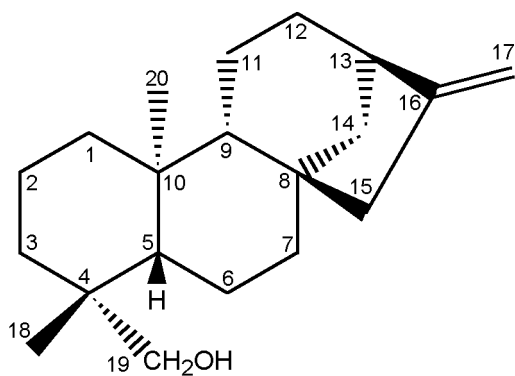
RMN de ^1H (Apêndice 3)

RMN de ^{13}C (Apêndices 4 e 5)

Tabela 7: Atribuições de ^{13}C

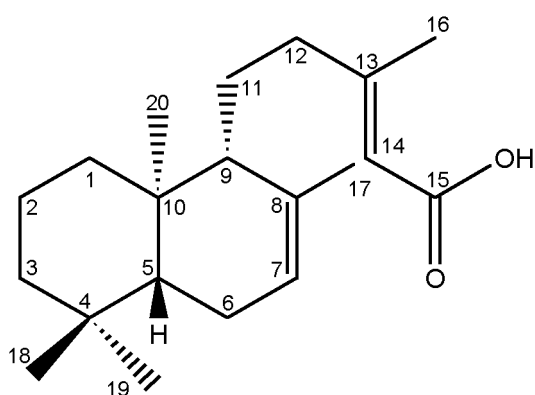
Dados em concordância com Batista et al., (2007).

Quanto ao espectro do próton ^1H para o ácido caurenóico, este apresenta diferentes sinais na região de δ 0,97 a δ 2,20, indicando pouca oxigenação e/ou insaturação. Pode-se observar nesse espectro a presença de dois s em δ 4,82 e 4,76, integrados para 1H cada, os quais foram atribuídos aos dois hidrogênios da ligação dupla exocíclica localizada entre os carbonos C-16 e C-17. Neste espectro há presença de um s em δ 2,65 (1H) referente ao hidrogênio H-13. Além destes sinais, observam-se dois singletos em δ 1,26 e 0,97, integrados para 3H cada, se referindo aos grupos metílicos H-18 e H-20. Já com relação aos dados de RMN ^{13}C pode-se observar a presença de 20 sinais, destacando-se o carbono da carboxila em δ 185,47, o carbono quaternário C-16 do tipo sp^2 em δ 156,34 e o carbono metilênico C-17 em δ 103,55.

*ent*-Caur-16-en-19-ol (caurenol)RMN de ^1H (Apêndice 6)RMN de ^{13}C (Apêndices 7)Tabela 7: Atribuições de ^{13}C

Dados em concordância com Batista et al., (2007).

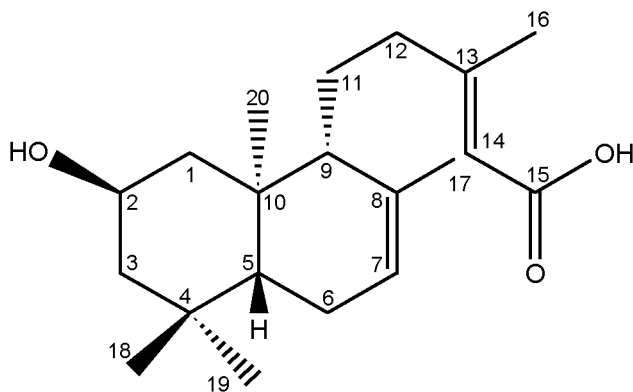
Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C com relação ao diterpeno caurenol são bastante semelhantes aos espectros do ácido caurenóico. Quanto ao espectro de ^1H , as principais diferenças são as presenças de dois sinais *d* em δ 3,77 e 3,47 e $J = 12,0$ Hz, os quais foram atribuídos aos prótons hidrometilênicos H-19. Considerando os dados de ^{13}C , verifica-se a presença de C-19 carbinólico em δ 65,56 ao invés da presença do grupamento ácido.

Ácido *ent*-labda-7,13-dien-15-óico (CL 7)RMN de ^1H (Apêndice 8)RMN de ^{13}C (Apêndices 9)Tabela 7: Atribuições de ^{13}C

Dados em concordância com Xiang et al., (2004).

Na análise do diterpeno ácido *ent*-labda-7,13-dien-15-óico observaram-se os sinais (s, 3 H cada) em δ 2,20, 1,70, 0,88, 0,86 e 0,76 correspondentes aos grupos metílicos H-16, H-17, H-19, H-18 e H-20, respectivamente. Na região de hidrogênios olefínicos observaram-se dois singletos em δ 5,71 atribuído ao H-14 e δ 5,42 referindo-se ao H-7 da ligação dupla endocíclica. A caracterização desta ligação dupla endocíclica pode ser reforçada pela presença dos carbonos quaternário C-8 do tipo sp^2 em δ 135,08 e metilênico C-7 em δ 123,31. No espectro de ^{13}C há também outro carbono quaternário sp^2 o C-13 em δ 164,06 e

outro metilênico C-14 em δ 115,65, referindo-se à ligação dupla entre C-13 e C-14. A presença do grupo carboxílico pode ser visualizada em δ 172,63 referente ao C-15.



Ácido 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-óico (**CL 9**)

RMN de ^1H (**Apêndice 10**)

RMN de ^{13}C (**Apêndices 11**)

HMQC (**Apêndice 12**)

HMBC (**Apêndice 13**)

Tabela 7: Atribuições de ^{13}C

Dados em concordância com Jefferies, Knox e Scaf (1974).

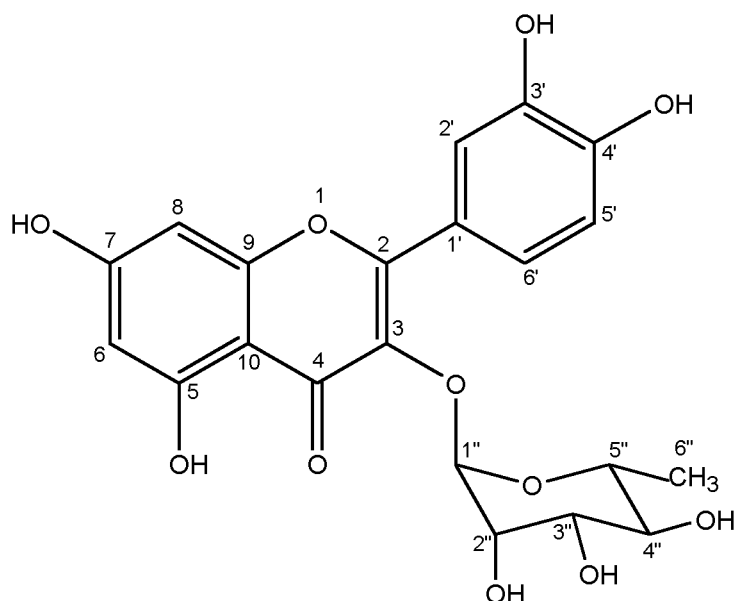
Considerando estudo comparativo entre as estruturas químicas dos ácidos 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-óico e **CL 7** nota-se que a principal diferença pode ser visualizada presença do grupo hidroxílico ligado ao carbono C-2. Por isso, no espectro de RMN de ^1H obtido para o 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-óico observa-se um sinal s δ 4,23 referindo-se hidrogênio carbinólico H-2. No espectro de ^{13}C verifica-se a presença de C-2 carbinólico em δ 68,37. Na análise do espectro *HMQC* verifica-se a correlação de H-2 com C-2. Já considerando o espectro *HMBC* nota-se a correlação entre os hidrogênios da metila H-20 e o C-2 carbinólico. Estes dados em conjunto sugerem o grupamento OH ligado ao C-2.

Os diterpenos **CL 7** e **CL 9** são semelhantes ao ácido eperúico, o qual foi relatado por Djerassi e Marshall (1957). Por isso, em alguns casos estes compostos são dados como derivados eperuanos (ROMERO 2007). Os dados de ^{13}C para o diterpeno **CL 7**: ácido *ent*-labda-7,13-dien-15-óico foram divulgados por Xiang, et al., (2004) a partir da espécie *Isodon scoparius*, mencionada por estes autores como erva rara da China. Quanto ao diterpeno **CL9**: ácido 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-óico, este foi identificado por espectrometria de massas, com ionização entre 10 e 70 eV, a partir de amostras de *Dodonaea* spp. (JEFFERIES; KNOX; SCAF, 1974). Considerando amostras de *C. langsdorffii*, ainda não foram encontrados dados sobre elucidação estrutural para estes dois diterpenos.

Tabela 7: Dados de ^{13}C para o sesquiterpeno e diterpenos.

^{13}C	CL 2	CL 1	CL 12	CL 7	CL 9
C-1	50,72	41,22	40,49	39,67	43,80
C-2	27,18	19,61	18,31	19,28	68,37
C-3	39,12	38,28	35,64	42,74	44,74
C-4	59,69	44,28	39,67	33,48	32,55
C-5	63,63	57,59	56,85	50,59	49,59
C-6	29,77	22,34	20,49	24,30	24,72
C-7	29,97	41,80	41,65	123,31	123,25
C-8	151,72	44,74	44,19	135,08	134,56
C-9	48,69	55,63	56,22	54,89	55,16
C-10	39,72	40,22	39,24	37,34	36,57
C-11	33,95	18,95	18,22	25,80	25,77
C-12	16,97	33,62	33,19	44,15	47,02
C-13	112,84	44,36	43,99	164,06	163,18
C-14	21,60	40,18	38,68	115,65	115,60
C-15	30,16	49,48	49,08	172,63	171,74
C-16	-----	156,34	155,91	19,83	19,55
C-17	-----	103,55	102,97	22,70	23,98
C-18	-----	29,49	27,09	33,66	34,14
C-19	-----	185,47	65,56	22,37	22,45
C-20	-----	16,10	18,12	14,07	16,10

CL 2: óxido de cariofileno; CL 1: ácido caurenóico; CL 12: caurenol; CL 7: *ent*-labda-7,13-dien-15-óico; CL 9: 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-óico. (100 MHz, CDCl_3).



3-O- α -ramnopiranosil-quercetina

RMN de ^1H (Apêndice 14)

RMN de ^{13}C (Apêndices 15)

HMQC (Apêndice 16)

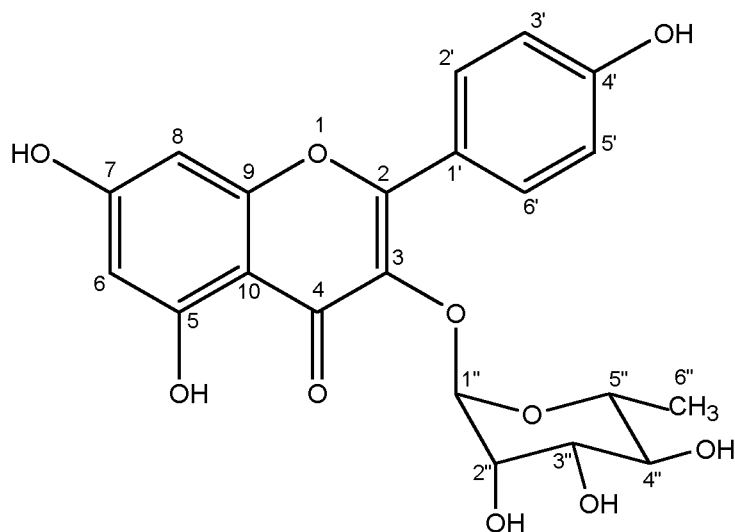
EM (Apêndice 17)

Tabela 8: Atribuições de ^{13}C

Referências citadas no texto.

Considerando os estudos sobre a 3-O- α -ramnopiranosil-quercetina (quercitrina), no espectro de ^1H foram visualizados sinais entre 6 e 8 ppm correspondentes à presença de pelo menos dois anéis aromáticos. Segundo resultados divulgados na literatura (ASEN; HOROWITZ, 1977; MARKHAM et al., 1978; AGRAWAL, 1989), levando-se em conta a classe dos flavonóides, os dois dubletos em δ 6,2 (d, $J = 2,0$, 1H) e 6,4 (d, $J = 2,0$, 1H) sugerem hidrogênios aromáticos, H-6 e H-8, do anel A, considerando hidroxilas em C-5 e C-7. Já os sinais em δ 6,9 (d, $J = 8,4$ Hz), δ 7,3 (dd, $J = 1,9$ e 8,4 Hz) e δ 7,34 (d, $J = 1,9$ Hz) são relativos ao anel B. Estes valores de J são condizentes com acoplamento entre hidrogênios em *meta* e *orto*. Por isso, a substituição do anel B poderia ser 3'/4' ou 2'/4'. No entanto, os valores dos deslocamentos químicos destes hidrogênios, associados aos sinais de carbonos em δ 146,7 (C-3') e 158,9 (C-4'), indicam a substituição do tipo catecol no anel B. No espectro de RMN ^{13}C foi possível observar os sinais em δ 150,2 (C-2), 136,6 (C-3) e 180 (C-4). Estes deslocamentos químicos são importantes, pois os mesmos, quando comparados com a literatura (δ 140 – 151; 134 – 140; 166 – 180 para C-2, C-3 e C-4, respectivamente, AGRAWAL, 1989), são condizentes com o anel C de flavonóis. Estes dados em conjunto, indicam as presenças de anel A substituído em C-5 e C-7, grupo catecol como anel B e deslocamentos químicos típicos de flavonóis referentes ao anel C. No

espectro de RMN ^{13}C notam-se 21 sinais de carbonos. Além disso, ainda há outros sinais a serem atribuídos com relação ao espectro ^1H . Assim, o sinal em δ 5,35, referente ao H-1", foi correlacionado com o carbono em δ 103,9, na análise espectroscópica por *HMQC*, informação que sugere a presença de um O-glicosídeo. Somando-se este dado aos seis carbonos observados para o açúcar, propõe-se que este seja um pirano (hexose). O duplete em δ 0,94 com *J* de 4 Hz, integrando para três hidrogênios e correlacionado com o carbono em δ 18 no *HMQC*, contribui para afirmar a presença um grupo metílico, H-6". Já os sinais em δ 3,7 para H-3" e 4,2 referindo-se ao H-2", contribuem à unidade glicosídica. Devido ao solvente utilizado, CD_3OD , os sinais com relação ao H-4" e H-5" podem ser correlacionados na análise do mapa de contornos *HMQC*. Geralmente, para esta unidade glicosídica, o sinal para H-4" apresenta-se como um tripleto com *J* em torno de 9 Hz, o qual é característico de acoplamento *trans-diaxial* e confirma H-5" e H-3" em *axial*. Já o duplo duplete em δ 3,7 (*J* = 4 e 8 Hz), relativo ao H-3", demonstra acoplamentos entre hidrogênios em *axial* e *equatorial* (NAKABAYASHY et al., 2009; HIROSE et al., 2010; RAWAT et al., 2010). Adicionalmente, na análise por espectrometria de massas, a quercitrina apresentou íon molecular desprotonado de m/z 447,0957 $[\text{M-H}]^-$ com erro em aproximadamente 2 ppm, para a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}^-$. Na fragmentação desse íon foi possível a observação do pico em m/z 301, o qual corresponde ao íon molecular, quando se analisa somente o flavonol quercetina.



3-O- α -ramnopyranosil-caffeoyl

RMN de ^1H (**Apêndice 18**)

RMN de ^{13}C (**Apêndices 19**)

EM (**Apêndice 20**)

Tabela 8: Atribuições de ^{13}C

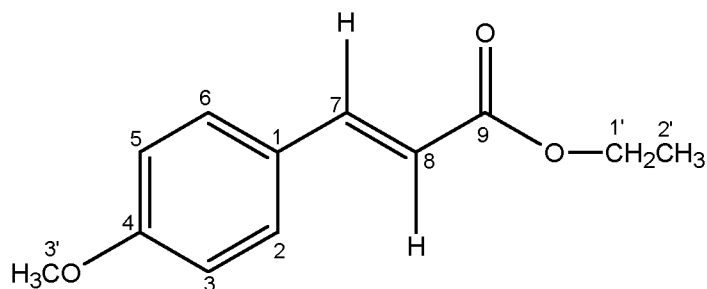
Referências citadas no texto

Quanto ao 3-O- α -ramnopyranosil-caffeoyl, este se diferencia da quercitrina por não existir o grupamento OH ligado ao C-3'. Assim, no espectro de RMN de ^1H podem ser observados sinais que compõem ao anel A (δ 5,4 e 5,6), ambos representados por dubletos e constante em 2 Hz, o que sugere acoplamento em *meta* envolvendo o H-6 e H-8, existindo a substituição em C-5 e C-7. Os dubletos em δ 6 e 6,9 com *J* de 8,8 são pertencentes aos hidrogênios do anel B e indicam a substituição *para*, já que esses sinais integraram para dois hidrogênios cada e apresentaram *J* característico de acoplamento *orto*. Assim, atribuiu-se o sinal em δ 6,9 para H-2'/H-6' e os outros sinais, mais blindados, para H-3'/H-5', já que o grupo hidroxílico em C-4' configura um efeito mesomérico doador de elétrons, causando proteção em *orto*. Os carbonos visualizados em δ 156 e 133 foram importantes, pois estes são condizentes com os deslocamentos de C-2 e C-3, típicos de flavonóis (AGRAWAL, 1989). Já os deslocamentos químicos dos carbonos em δ 93 e 98 são peculiares de C-8 e C-6 quando há oxigenação em C-5 e C-7. Dentre os outros sinais que podem ser observados no espectro de RMN de ^1H destacam-se o singlete em δ 4,4 referindo-se ao H-1'' indicando a presença de um O-glicosídeo e o dubleto com deslocamento próximo de 0,1 integrando para três hidrogênios demonstrando a presença de um grupo metílico H-6''. No espectro de carbono há o deslocamento em δ 17, o qual certamente está correlacionado aos hidrogênios deste grupo metílico, além dos outros seis carbonos referentes ao açúcar (AGRAWAL, 1989; HIROSE et al., 2010; RAWAT et al., 2010). Já o espectro de massas

para o 3-*O*- α -ramnopiranosil-canferol, apresentou íon molecular desprotonado de m/z 431,0968 [M-H]⁻ com erro próximo de 4 ppm, para a fórmula molecular C₂₁H₁₉O₁₀⁻. Na fragmentação desse íon foi possível a observação do pico em m/z 285, o qual corresponde ao íon molecular, quando se analisa somente o canferol. Todos os espectros de massas considerando os compostos de interesse estão em fase de obtenção.

Tabela 8: Dados de ¹³C para flavonóis.

¹³ C	3- <i>O</i> - α -ramnopiranosil-quercetina 100 MHz, CD ₃ OD	3- <i>O</i> - α -ramnopiranosil-canferol 100 MHz, DMSO-d ₆
C-2	158,90	157,06
C-3	136,59	134,79
C-4	179,97	178,32
C-5	163,64	161,85
C-6	100,13	99,28
C-7	166,22	164,78
C-8	95,03	94,31
C-9	159,63	157,82
C-10	106,22	104,69
C-1'	123,17	121,06
C-2'	116,70	131,18
C-3'	146,73	115,95
C-4'	150,18	160,56
C-5'	117,25	115,95
C-6'	123,29	131,18
C-1''	103,88	102,34
C-2''	72,36	70,87
C-3''	72,44	71,20
C-4''	73,57	71,65
C-5''	72,23	70,63
C-6''	17,98	18,03



4-Metóxi-cinamoato de etila

RMN de ¹H (**Apêndice 21**)

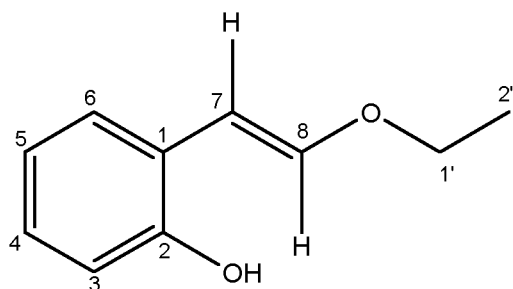
RMN de ¹³C (**Apêndices 22**)

Tabela 9: Atribuições de ¹³C

Dados em concordância com Huang,
Chen e Tsai (2010).

O espectro de RMN de ¹H considerando o 4-metóxi-cinamoato de etila apresenta dois sinais dubletos, integrados para dois hidrogênios cada, em δ 7,49 e 6,91 ($J = 8$), relacionando respectivamente os hidrogênios H-2/6 e H-3/5. Estes dados evidenciam a presença de anel aromático dissubstituído. Neste espectro há também dois dubletos, integrados para um hidrogênio cada, em δ 7,67, H-7 e 6,33, H-8 ($J = 16$). Além destes, existe um sinal em δ 4,25 relativo ao H-1' e os sinais em δ 3,83 H-3' e δ 1,35 H-2', os quais demonstram a presença grupos metoxílico e metílico, respectivamente. No espectro de RMN ¹³C verifica-se a existência de 10 sinais, dos quais o sinal em δ 114,80 refere-se ao C-3 e ao C-5 e àquele em δ 130,17 atribuí-se aos C-2 e ao C-6.

Destaca-se que o 4-metóxi-cinamoato de etila foi obtido pela reação de derivatização com agente diazometano. Por isso, na amostra *in natura* certamente deverá existir o 4-hidróxi-cinamoato de etila. O caurenoato de metila e o 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-oato de metila também foram obtidos pela mesma metodologia de derivatização. Para estes dois diterpenos metilados foram observados os sinais intensos do grupo metoxílico em torno de δ 3,65, considerando o espectro de RMN de ¹H.



Éter 2-hidróxifenilvinil etílico

RMN de ^1H (Apêndices 23 e 24)

RMN de ^{13}C (Apêndices 25)

Tabela 9: Atribuições de ^{13}C

Referência citada no texto.

Considerando a proposta para este derivado éter, é possível observar no espectro de RMN de ^1H o sinal do grupo metílico H-2' em δ 1,26 e um duplo dubleto em δ 3,51 ($J = 4$ e 8) integrando para dois hidrogênios relativos ao H-1'. Neste espectro verificam-se também dois dubletos, integrados para um hidrogênio cada, em δ 7,73, H-8 e 6,45, H-7 ($J = 8$). Quanto aos sinais do anel aromático, estes parecem com dubletos. Na região entre δ 7,27 e 7,36 sugere-se a presença de H-4 e H-5. Já naquela entre δ 7,49 e 7,57 propõe-se os hidrogênios H-3 e H-6. Avaliando o espectro de ^{13}C notam-se 10 sinais destacando-se àqueles em δ 154,26, 66,07 e 15,46 relativos aos carbonos C-2, C-1' e C-2', respectivamente. Na comparação com a literatura, levando-se em conta estruturas semelhantes, estes dados estão em concordância (CANUTO, 2007).

Tabela 9: Dados de ^{13}C para 4-metóxi-cinamoato de etila e éter 2-hidróxifenilvinil etílico.

^{13}C	4-Metóxi-cinamoato de etila 100 MHz, CDCl_3	Éter 2-hidróxifenilvinil etílico 100 MHz, CDCl_3
C-1	127,70	119,03
C-2	130,17	154,26
C-3	114,80	117,13
C-4	161,91	132,05
C-5	114,80	124,59
C-6	130,17	128,06
C-7	114,82	116,93
C-8	116,19	143,65
C-9	167,81	-----
C-1'	60,74	66,07
C-2'	14,85	15,46
C-3'	55,84	-----

II – VALIDAÇÃO POR CLAE

4.5 Validação do método por CLAE/UV-DAD

Quanto à preparação da amostra, o estudo comparativo envolvendo o tempo de extração e a proporção do solvente extrator foi conduzido utilizando agitador mecânico tipo shaker. Neste estudo foi utilizada solução hidroalcoólica como solvente extrator nas proporções de 50%, 70% e 95% com o tempo de extração de 60 minutos. Este procedimento também foi realizado com solução hidroalcoólica 50% durante 90 minutos de extração. A melhor condição de extração, para quantificar os principais flavonóis presentes nas folhas de *C. langsdorffii*, foi atingida com o uso da solução hidroalcoólica 70% por um período de extração de 60 minutos. Esta solução, etanol-água, funcionou muito bem para extrair os compostos de interesse, é amplamente utilizada na indústria farmacêutica e bastante segura, considerando o trabalho em rotina e o meio-ambiente. Por estes motivos, o etanol foi selecionado. Visando facilitar a manipulação, diminuir eventuais erros de pesagens durante o uso rotineiro, bem como definir uma alíquota representativa do material vegetal, a quantidade da amostra foi estabelecida em 500 mg. A extração do material vegetal foi realizada sob temperatura de 40°C. Esta temperatura demonstrou ser suficiente para extração dos principais flavonóis em estudo. Todavia, temperatura igual ou menor que 30°C consistiram em resultados inadequados. Adicionalmente, utilizando equipamento tipo shaker sob as condições descritas para a preparação da amostra, é possível obter pelo menos 20 amostras por hora, fator bastante interessante durante os procedimentos de controle de qualidade.

Ao longo do desenvolvimento do método cromatográfico, foram avaliadas diferentes fases móveis envolvendo distintos percentuais de metanol, acetonitrila, água, ácido acético e ácido trifluoroacético sob diferentes gradientes ou na forma isocrática. Colunas cromatográficas fabricadas por distintas empresas e com fases estacionárias diferenciadas

também foram avaliadas. As principais fases estacionárias envolvidas nestes testes foram: fases reversas C₁₈, C₁₈ monolítica, CN, C₁₂ e Taxsil[®]. Considerando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV/Vis, parâmetros como vazão da fase móvel, comprimento de onda, volume de amostra injetada e variações entre o modo automático e manual, foram estudados. Todos estes fatores foram avaliados e otimizados em conjunto para se obter a separação dos principais compostos com boa eficiência. Desta forma, a melhor separação e resolução dos picos capaz de quantificar os principais componentes presentes nas folhas de *C. langsdorffii* foram obtidas com as condições descritas no item 3.4.1 com o tempo de análise de 60 minutos. O perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico, *in natura*, da amostra em estudo é apresentado na figura 38.

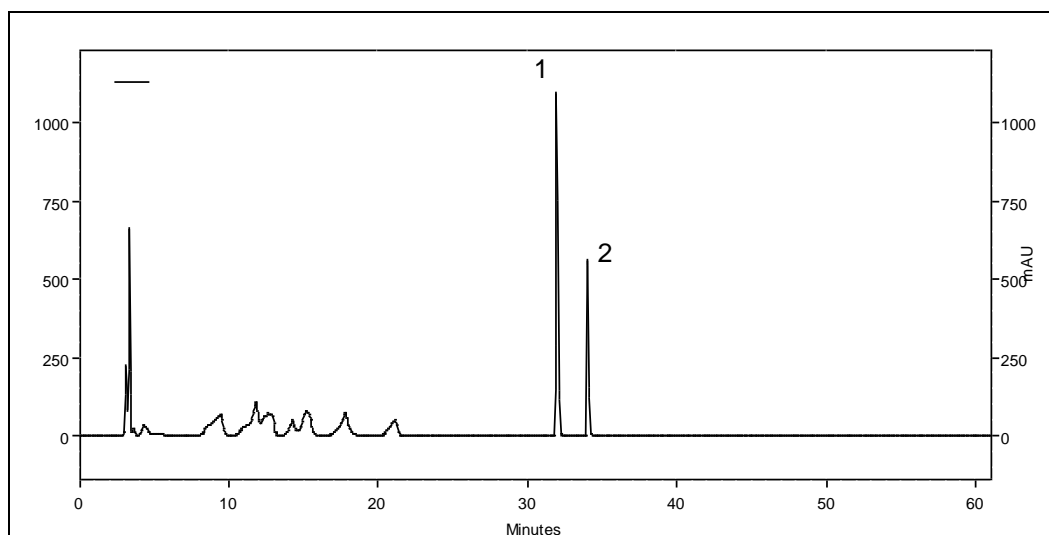


Figura 38: Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico obtidos das folhas de *C. langsdorffii* em 257 nm, coletada na FCFRP no Campus da USP. 1: quercitrina (Q-ram) e 2: 3-O- α -ramnopiranosil-canferol (C-ram).

Neste perfil (Figura 38) nota-se que logo depois da eluição do último derivado flavonóides com tempo de retenção em aproximadamente 34 minutos há um período de tempo relativamente elevado até atingir o fim da análise em 60 min. Seguindo uma escala de prioridades, este período foi mantido pelos seguintes motivos: 1^o elevar-se o percentual de acetonitrila na fase móvel até que este atingisse 100%, visando à limpeza e a preservação da fase estacionária; 2^o acomodação do padrão interno selecionado e 3^o

separação dos flavonóides adicionados ao método. Importante ressaltar que outras possibilidades com relação à composição da fase móvel visando diminuir o tempo de análise foram colocadas em teste. Nestes, mesmo não considerando exatamente as três prioridades mencionadas, o tempo mínimo de análise ficou em torno de 47 minutos. Portando, tendo em vista a ótima separação dos flavonóides em questão e o aumento da qualidade do método assegurando as prioridades descritas, o tempo de eluição em 60 minutos foi mantido.

A escolha dos padrões interno e secundário foi realizada aleatoriamente com a análise dos padrões disponíveis no Laboratório de Farmacognosia - USP. Para isso, foram levados em conta padrões com estruturas químicas semelhantes aos compostos da amostra em estudo, com tempos de retenção adequados ao método, disponíveis comercialmente no mercado, com estabilidade reconhecida e de baixo custo. Assim, os padrões avaliados foram: os ácidos cafeico, cumárico, ferulico, cinâmico e salicílico, 7-hidróxicumarina, cumarina, veratraldeído, diaminobenzaldeído, piperonal, benzofenona, galangina e naringina. Por meio da análise destes, considerando as características descritas, os padrões benzofenona e piperonal foram selecionados como interno (pi) e secundário (ps), respectivamente. Na figura 39 apresentam-se os perfis cromatográficos da maioria destes padrões, destacando a benzofenona e o piperonal. Na figura 40 destacam-se as estruturas químicas do pi e ps.

Um fato relevante foi que o veratraldeído apresentou características bastante aceitáveis para ser escolhido como padrão interno. De forma geral, este padrão atendeu aos parâmetros considerados para a escolha da padronização interna, além de existir um intervalo de tempo adequado durante a análise, o qual reforçaria o uso deste. No entanto, em análise do perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico das flores da *C. langsdorffii*, utilizando-se a mesma metodologia de análise e extração, foi detectado um componente, o qual apresentava o mesmo tempo de retenção deste aldeído. Como o método deve ser capaz de avaliar inequivocadamente o extrato hidroalcoólico e seus derivados, optou-se pelo uso da benzofenona. Similarmente ao veratraldeído, a galangina também poderia ser

utilizada na padronização interna, porém comercialmente, cada 25 mg deste flavonóide equivale a aproximadamente R\$ 400,00, o que inviabilizou a sua escolha.

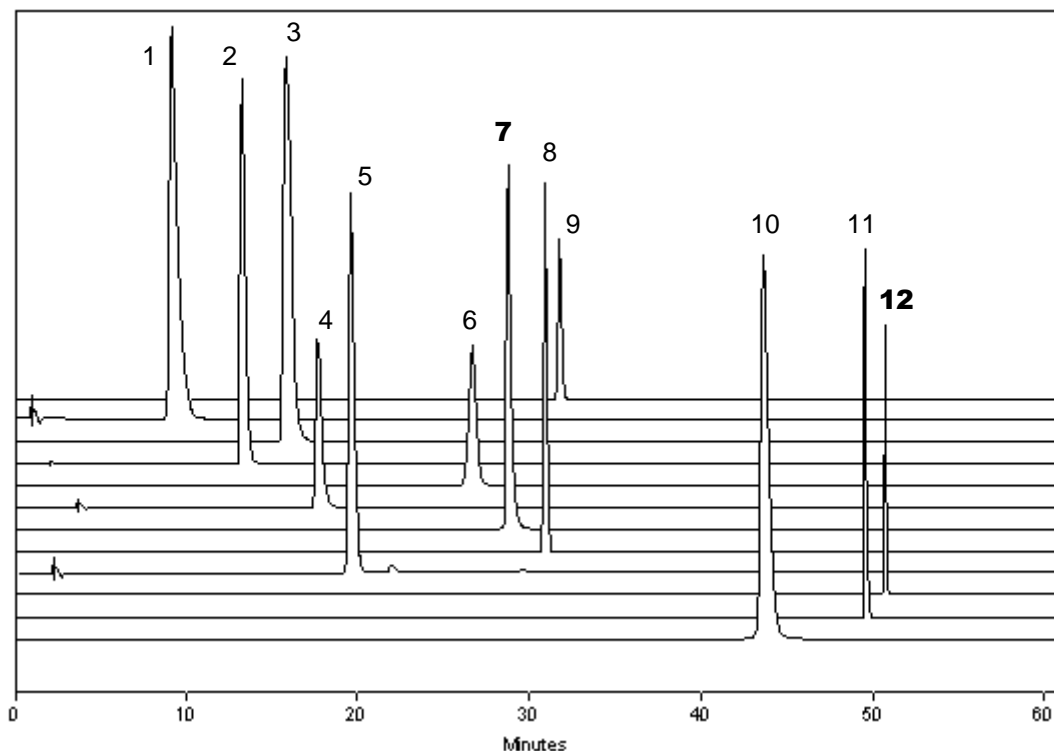


Figura 39: Perfis cromatográficos dos compostos avaliados para a escolha dos padrões interno e secundário. 1: ácido salicílico, 2: ácido cafeico, 3: ácido cumárico, 4: ácido ferulico, 5: 7-hidróxicumarina, 6: veratraldeído, **7:** piperonal (selecionado como padrão secundário), 8: naringina, 9: cumarina, 10: diaminobenzaldeído, 11: galangina e **12:** benzofenona (escolhida como padrão interno). O ácido cinâmico apresentou tempo de retenção praticamente igual ao da cumarina.

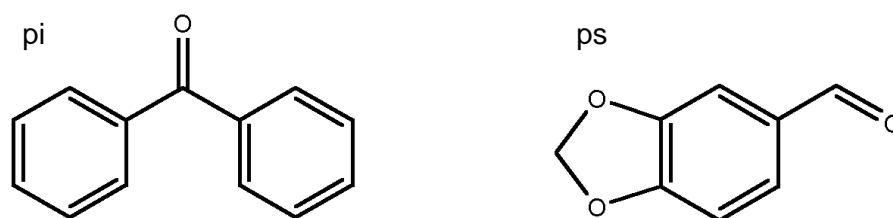
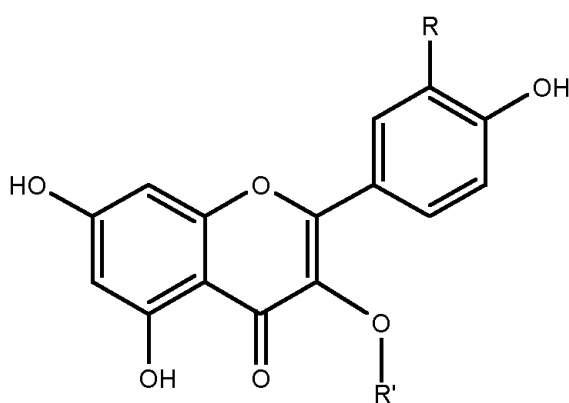


Figura 40: Estruturas químicas: benzofenona (pi) e piperonal (ps). A numeração segue a figura 39.

Neste método cromatográfico foram adicionados seguintes padrões: rutina, quercetina e canferol (todos da marca Sigma-Aldrich com pureza > 98 %). Estes três flavonóides juntamente com os outros dois majoritários, quercitrina e 3-O- α -ramnopiranosil-

canferol, isolados das folhas de *C. langsdorffii* fazem parte da classe dos flavonóis. Por estarem agrupados nesta classe, estes fenólicos são originários da mesma via biossintética e, por isso, eles possuem estruturas químicas similares e uma base teórica comum. Rutina, quercetina, quercitrina, 3-O- α -ramnopiranosil-canferol e canferol são amplamente distribuídos no reino vegetal e reconhecidos mundialmente pelos efeitos benéficos à saúde tais como antioxidante, anti-inflamatório, dentre outros (PYRZYNSKA; BIESAGA, 2009). Na literatura atual é bastante comum encontrar métodos validados para quantificação destes flavonóis a partir de diferentes fontes vegetais (LEUCUTA et al., 2005; GAO et al., 2008). No entanto, ainda não conseguimos encontrar método validado a partir das folhas de *C. langsdorffii*. O gênero *Copaifera* possui 72 espécies distribuídas em regiões tropicais da América Latina, sendo que 16 destas, são somente encontradas no Brasil. Entre as espécies mais abundantes, destacam-se: *C. officinalis* L., *C. guianensis* Desf., *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. confertiflora* Bth, *C. langsdorffii* Desf., *C. coriacea* Mart. e *C. cearensis* Huber ex Ducke. De modo geral, o conhecimento da composição química das partes aéreas do gênero *Copaifera* ainda é insipiente. Por isso, a chance em detectar constituintes comuns à classe dos flavonóis é aumentada, tendo em vista os flavonóis isolados das folhas de *C. langsdorffii*. Assim, no método cromatográfico apresentado no presente trabalho constam a rutina, quercetina, canferol, quercitrina e 3-O- α -ramnopiranosil-canferol (Figura 41).



Em que:

- 1 - R = OH; R' = rutinosídeos: Rutina
- 2 - R = OH; R' = ramnosídeo: Q-ram
- 3 - R = H; R' = ramnosídeo: C-ram
- 4 - R = OH; R' = OH: Quercetina
- 5 - R = H; R' = H: Canferol

Figura 41: Estruturas químicas dos flavonóis envolvidos na validação do método. Q-ram = quercitrina e C-ram = 3-O- α -ramnopiranosil-canferol.

A **seletividade** foi determinada pela comparação do perfil cromatográfico dos padrões em relação ao perfil obtido das amostras. Além disso, foi realizado estudo comparativo entre os tempos de retenção e espectros de UV, considerando estes dois perfis. Visando ampliar os estudos de seletividade, o perfil cromatográfico dos padrões (Figura 42) foi analisado em triplicata e parâmetros como o fator de separação α , largura de base do pico (*width*) e número de pratos teóricos (N) foram determinados e avaliados conforme seus respectivos coeficientes de variação (CV %). Estes parâmetros fornecem uma medida da seletividade da fase líquida com relação aos compostos em estudo, bem como determina a eficiência da coluna cromatográfica. De modo geral, fator de separação α variando entre 1,1 a 1,5 denota ótima separação entre os componentes e número de pratos teóricos (N) acima de 2000 para cromatografia de fase líquida indicam excelente eficiência da coluna. Quanto ao coeficiente de variação, considerando determinações na escala macro, com amostras de baixa para média complexidade, valores até 5 % são aceitáveis. Já para amostras de alta complexidade, determinadas na escala micro ou traços estes valores podem atingir até 20 %. Adicionalmente, em amostras que envolvem a quantificação de componentes em fluidos biológicos valores de coeficientes de variação podem ser adequados até próximos de 50 % (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

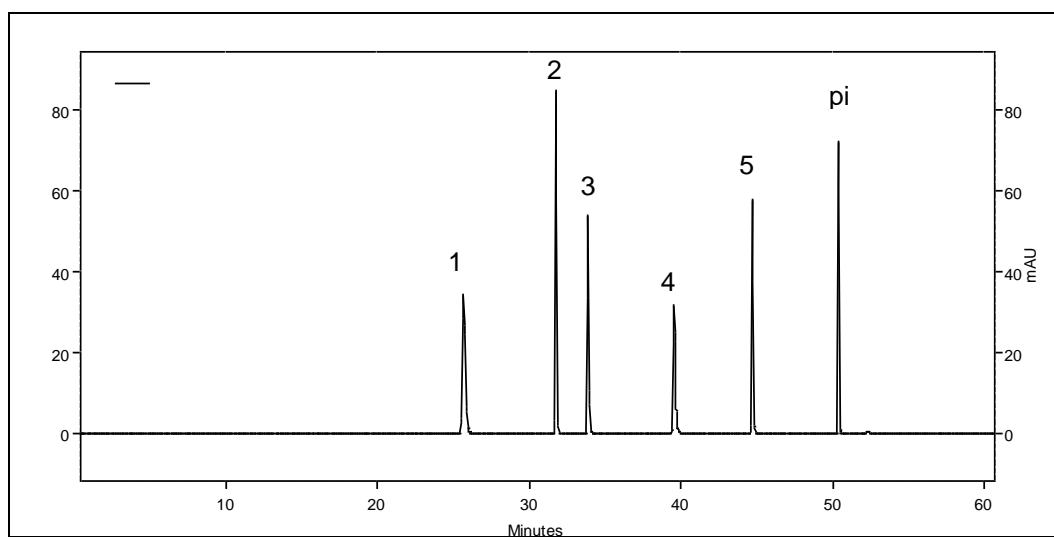


Figura 42: Perfil cromatográfico dos flavonóis estudados neste método (257 nm). 1: rutina, 2: quercitrina, 3: 3-O- α -ramnopiranosil-canferol, 4: quercetina, 5: canferol e pi = padrão interno: benzofenona.

Na tabela 10 apresentam-se os valores que compõem a seletividade deste método. Considerando todos os flavonóis juntamente com o padrão interno, nota-se que os resultados são aceitáveis, já que os coeficientes de variações foram menores que 10%. Estes dados em conjunto com todos os aspectos envolvidos na seletividade indicam que a adição de rutina, quercetina e canferol ao método foi adequada não interferindo com a quantificação da quercitrina e do 3-O- α -ramnopiranosil-canferol. Por outro lado, a adição destes padrões permitiu a realização das características de desempenho com melhores níveis de segurança, já que estes também poderiam ser considerados padrões de referência, o que aumentou a qualidade das análises no desenvolvimento do método.

Tabela 10: Respostas que compõem a seletividade do método.

	α	CV (%)	N	CV (%)	Wb	CV (%)
Rutina	1,24 \pm 0,009	0,72	7837 \pm 1170	7,47	1,16 \pm 0,08	7,21
Q-ram	1,24 \pm 0,009	0,72	54334 \pm 5647	5,20	0,55 \pm 0,03	5,28
C-ram	1,10 \pm 0,0007	0,07	53951 \pm 3707	6,87	0,59 \pm 0,04	6,89
Quercetina	1,17 \pm 0,003	0,21	20536 \pm 2840	6,91	1,11 \pm 0,08	7,04
Canferol	1,13 \pm 0,003	0,26	100045 \pm 9924	4,96	0,57 \pm 0,03	5,09
Benzofenona	1,13 \pm 0,0009	0,08	228971 \pm 32828	7,17	0,42 \pm 0,03	7,59

α = fator de separação (α), **Wb** = largura de base do pico (*width*) e **N** = número de pratos teóricos. Q-ram = quercitrina e C-ram = 3-O- α -ramnopiranosil-canferol.

Finalizando o estudo de seletividade, amostras de diferentes localidades foram avaliadas com a adição do padrão interno (Figura 43). Considerando que estas foram analisadas no mínimo em triplicata, qualitativamente observa-se que há a presença de diferentes compostos polares minoritários nos 20 minutos iniciais. Em seguida, a linha de base estabiliza-se e, a partir de 30 minutos são detectados os flavonóis majoritários. Este padrão de separação foi observado na obtenção de todas as análises realizadas durante o processo de validação.

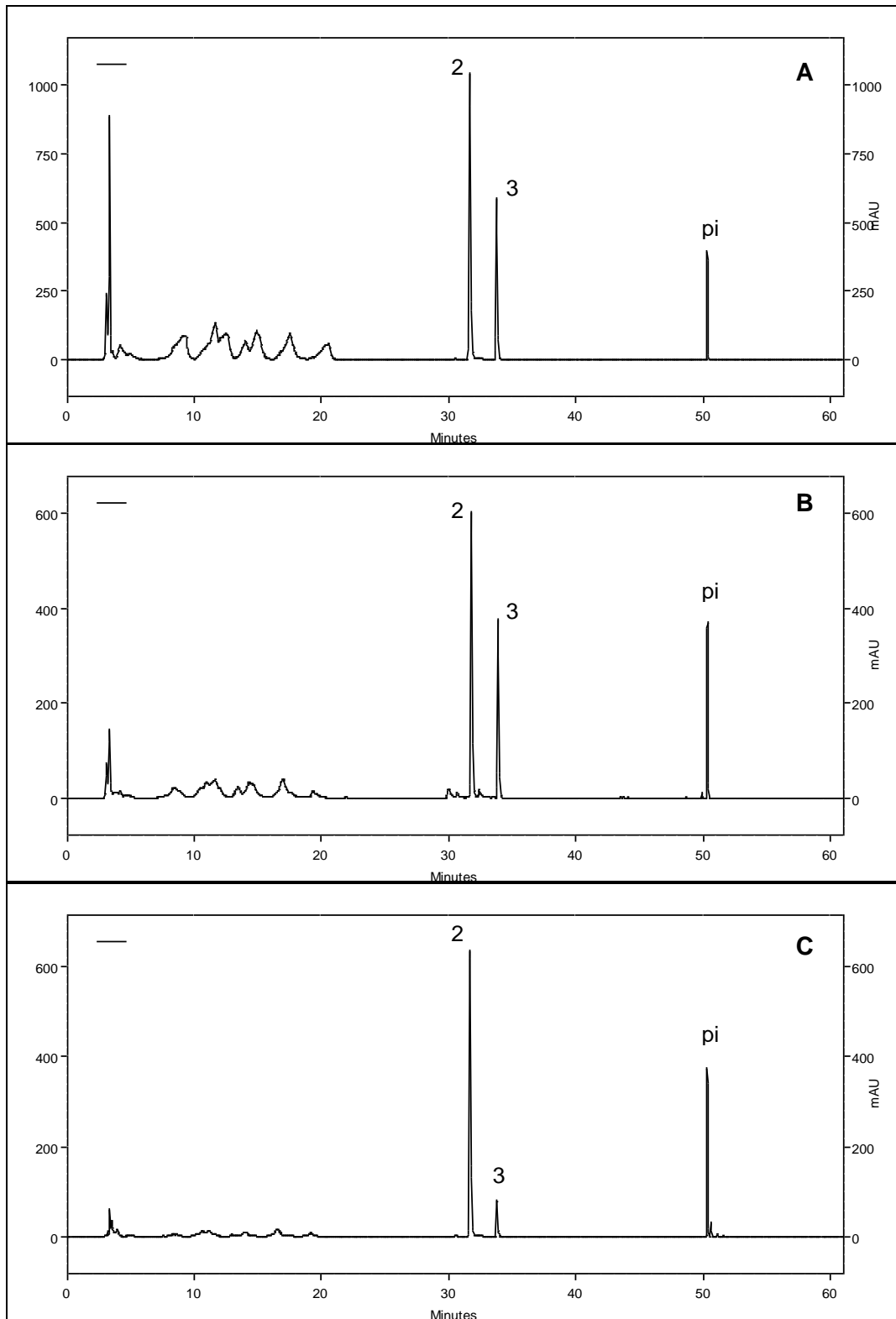


Figura 43: Perfis cromatográficos das amostras em 257 nm. **A** – FCFRP-USP; **B** – FFCLRP-USP; **C** – Região de Sorocaba – SP. 2: quercitrina, 3: 3-O- α -ramnopiranosil-canferol e pi: benzofenona.

A **linearidade**, considerando todos os flavonóis e padrões interno e secundário foi determinada pela elaboração de curvas analíticas. Inicialmente, a partir de diluições seriadas com alíquotas de cada componente, foram plotadas curvas obedecendo à relação área do pico versus concentração. Nestas curvas todos os pontos referentes às diferentes concentrações foram considerados, pois o objetivo foi utilizá-las para verificar quais concentrações estavam dentro da faixa linear de trabalho. Os cálculos das faixas lineares, utilizando as curvas analíticas com todos os pontos foram dados pela elaboração de gráficos atendendo a relação resposta relativa (área do pico pela respectiva concentração) versus a escala logarítmica de cada concentração. Por meio da análise destes gráficos determinaram-se as faixas lineares de cada componente. Depois de definidas tais faixas, novas curvas analíticas foram plotadas excluindo-se as concentrações que estavam acima e abaixo do erro relativo de $\pm 10\%$. Nas figuras 44 a 50 são apresentadas todas as curvas analíticas que fazem parte da linearidade do método.

Na tabela 11 apresentam-se as faixas calculadas e lineares de trabalho, bem como o coeficiente de correlação r com respectivos coeficientes de variação para cada um dos compostos em questão. Todos os coeficientes de correlação apresentaram valores acima de 0,99 e CV (%) abaixo de 1. Além disso, as faixas lineares atendem à variação aceitável entre 80 e 120 %.

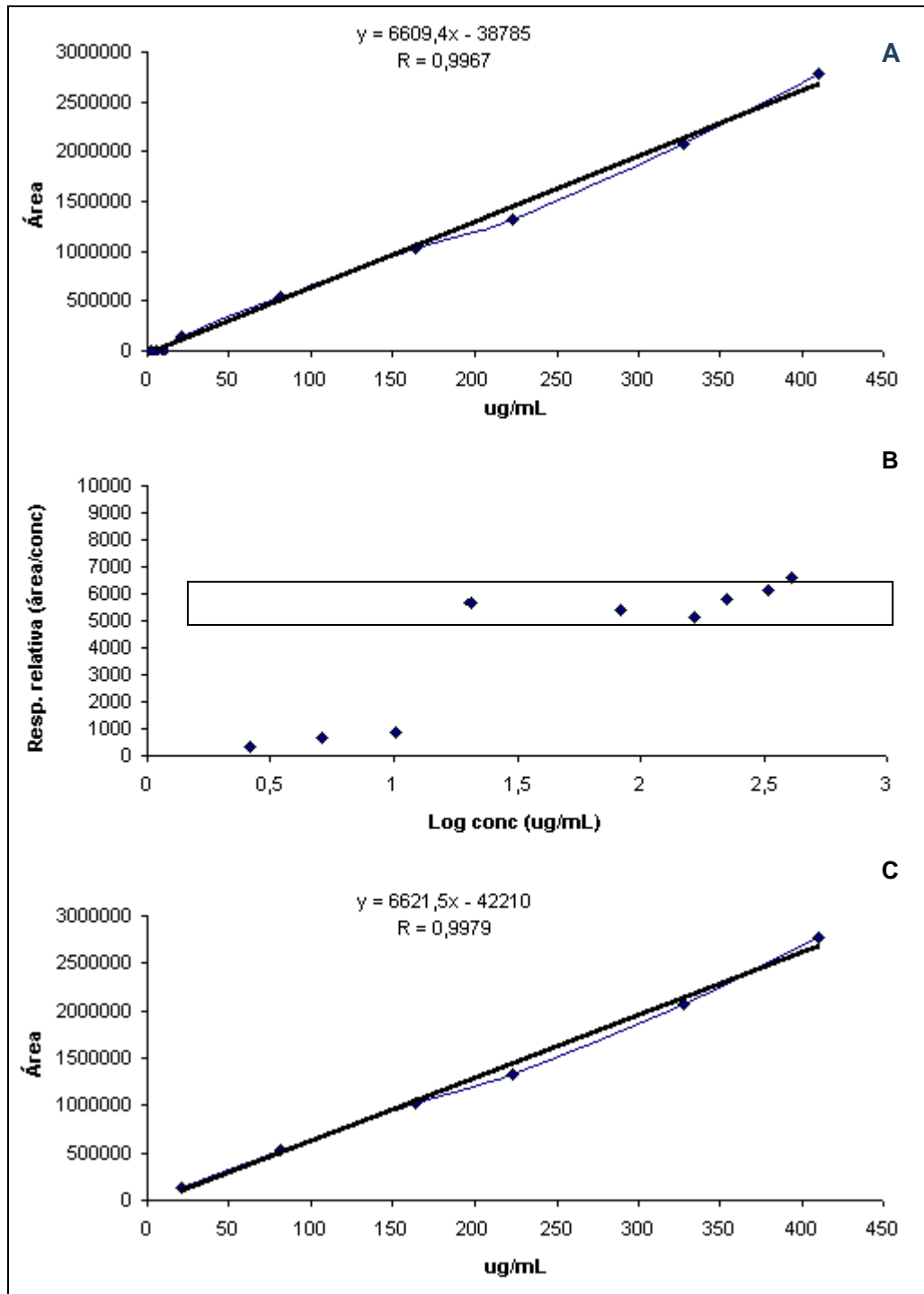


Figura 44: Estudo de linearidade para rutina. **A** – curva com todos os pontos; **B** – determinação da faixa linear de trabalho; **C** – curva analítica obedecendo à faixa de trabalho.

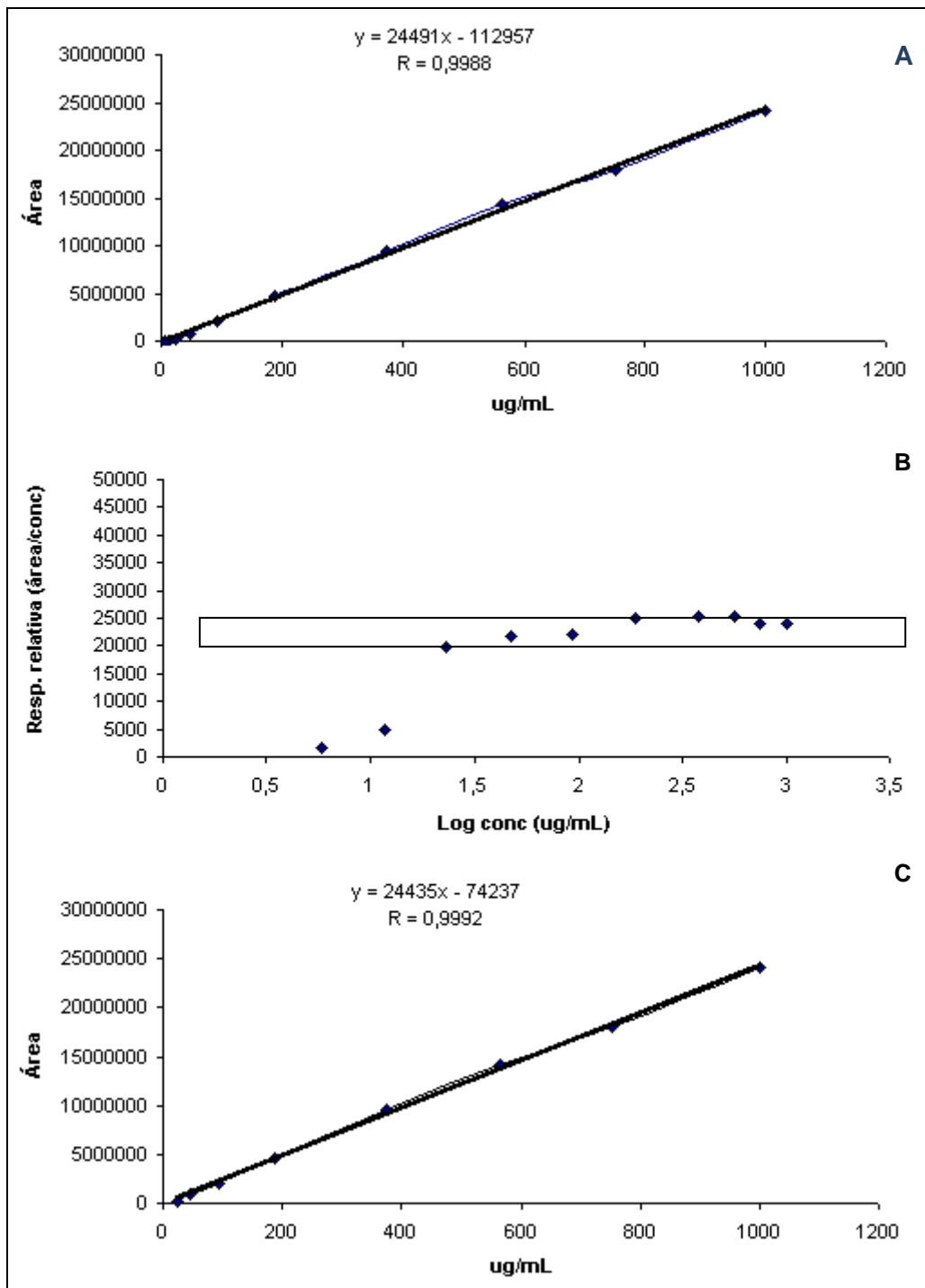


Figura 45: Estudo de linearidade para quercitrina. **A** – curva com todos os pontos; **B** – determinação da faixa linear de trabalho; **C** – curva analítica obedecendo à faixa de trabalho.

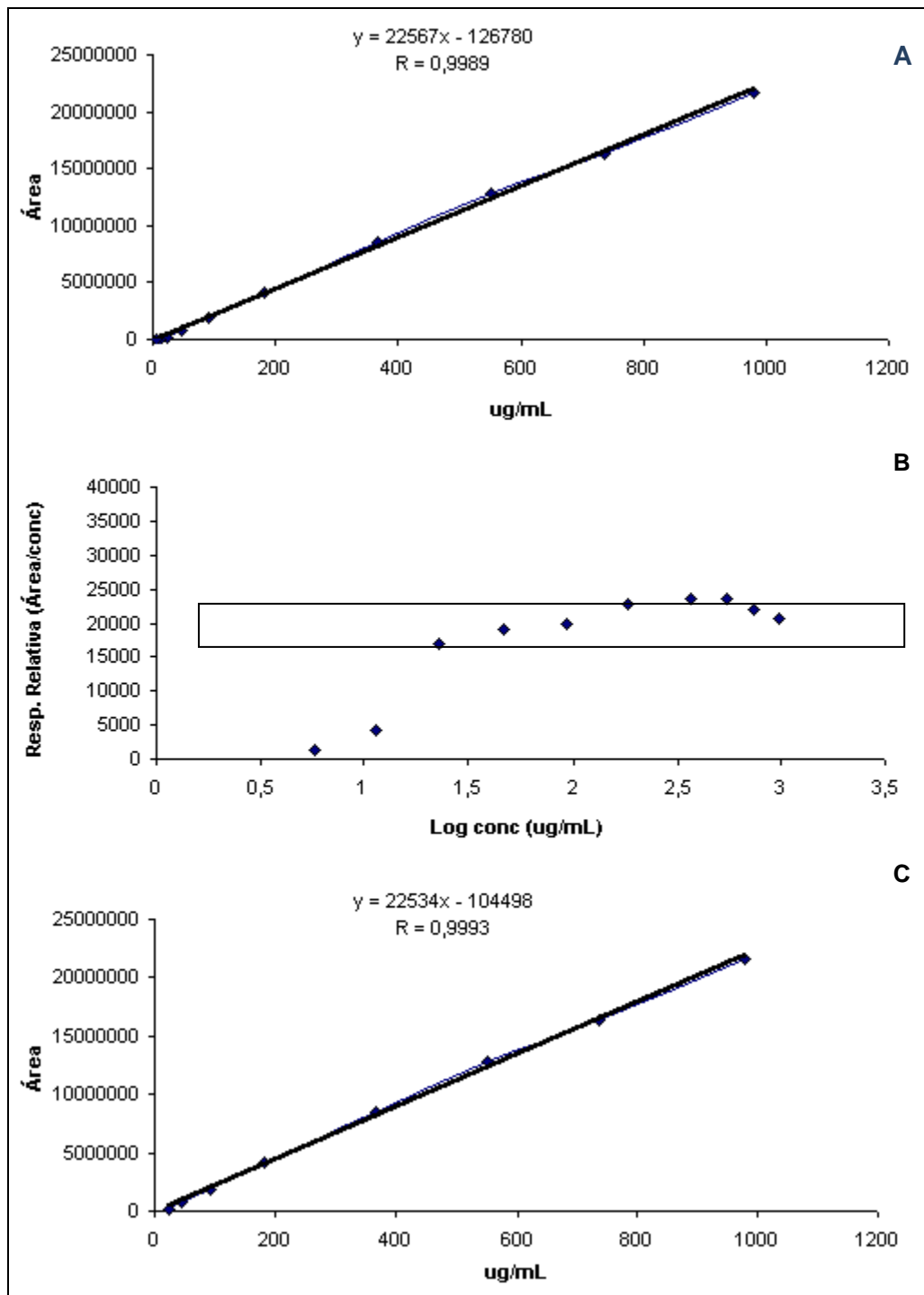


Figura 46: Estudo de linearidade para 3-O- α -ramnopiranosil-canferol. **A** – curva com todos os pontos; **B** – determinação da faixa linear de trabalho; **C** – curva analítica obedecendo à faixa de trabalho.

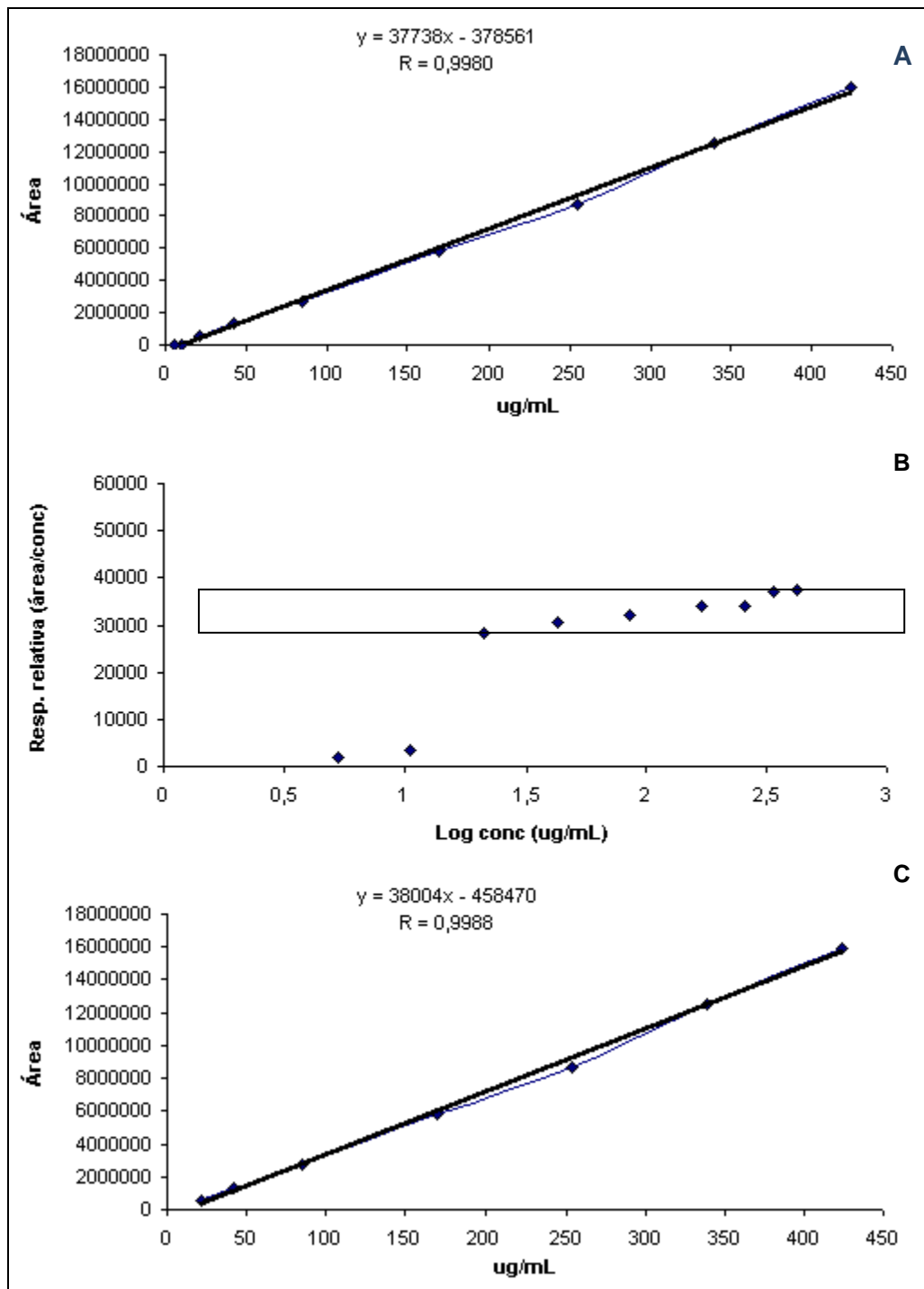


Figura 47: Estudo de linearidade para quercetina **A** – curva com todos os pontos; **B** – determinação da faixa linear de trabalho; **C** – curva analítica obedecendo à faixa de trabalho.

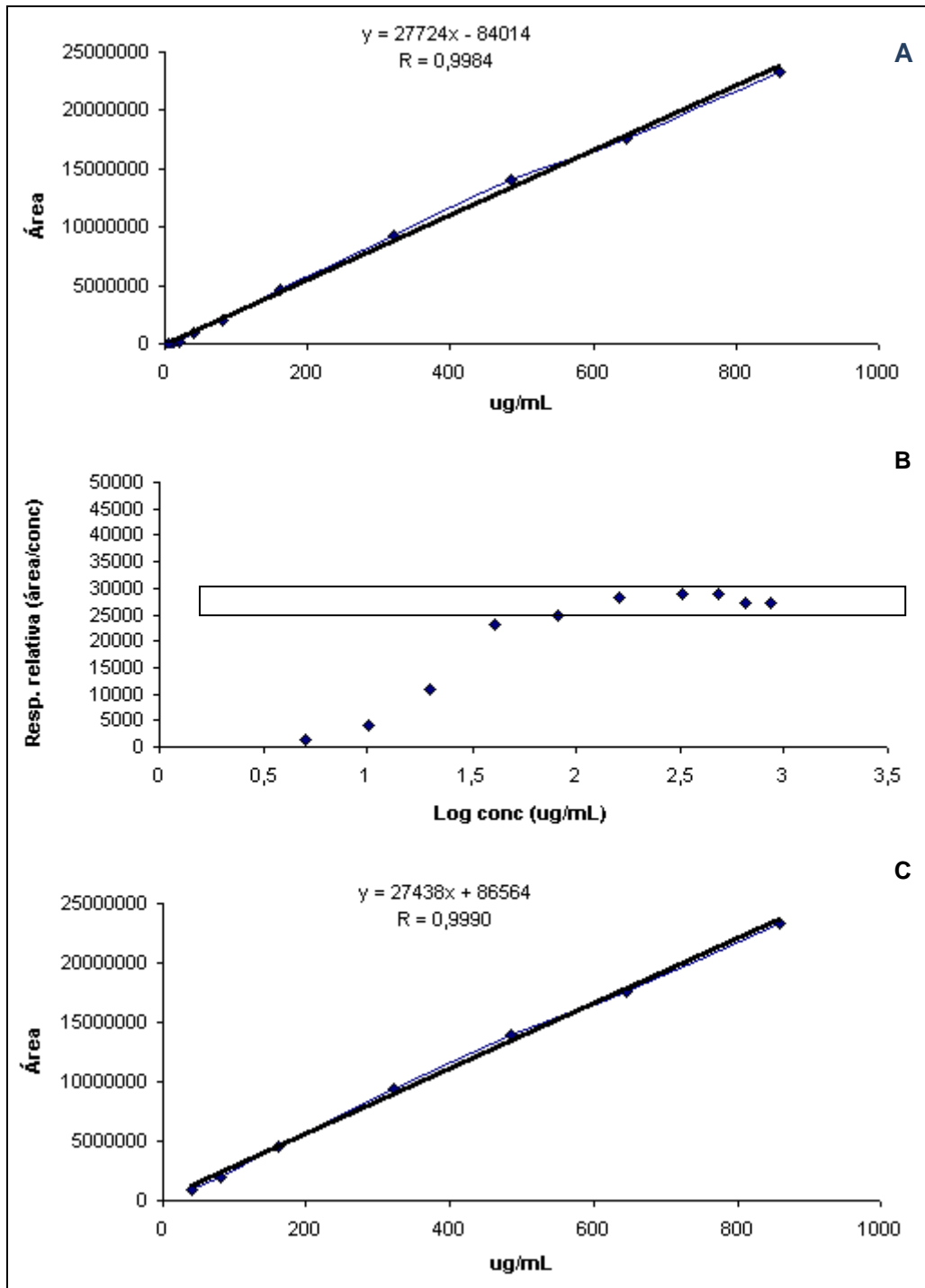


Figura 48: Estudo de linearidade para canferol. **A** – curva com todos os pontos; **B** – determinação da faixa linear de trabalho; **C** – curva analítica obedecendo à faixa de trabalho.

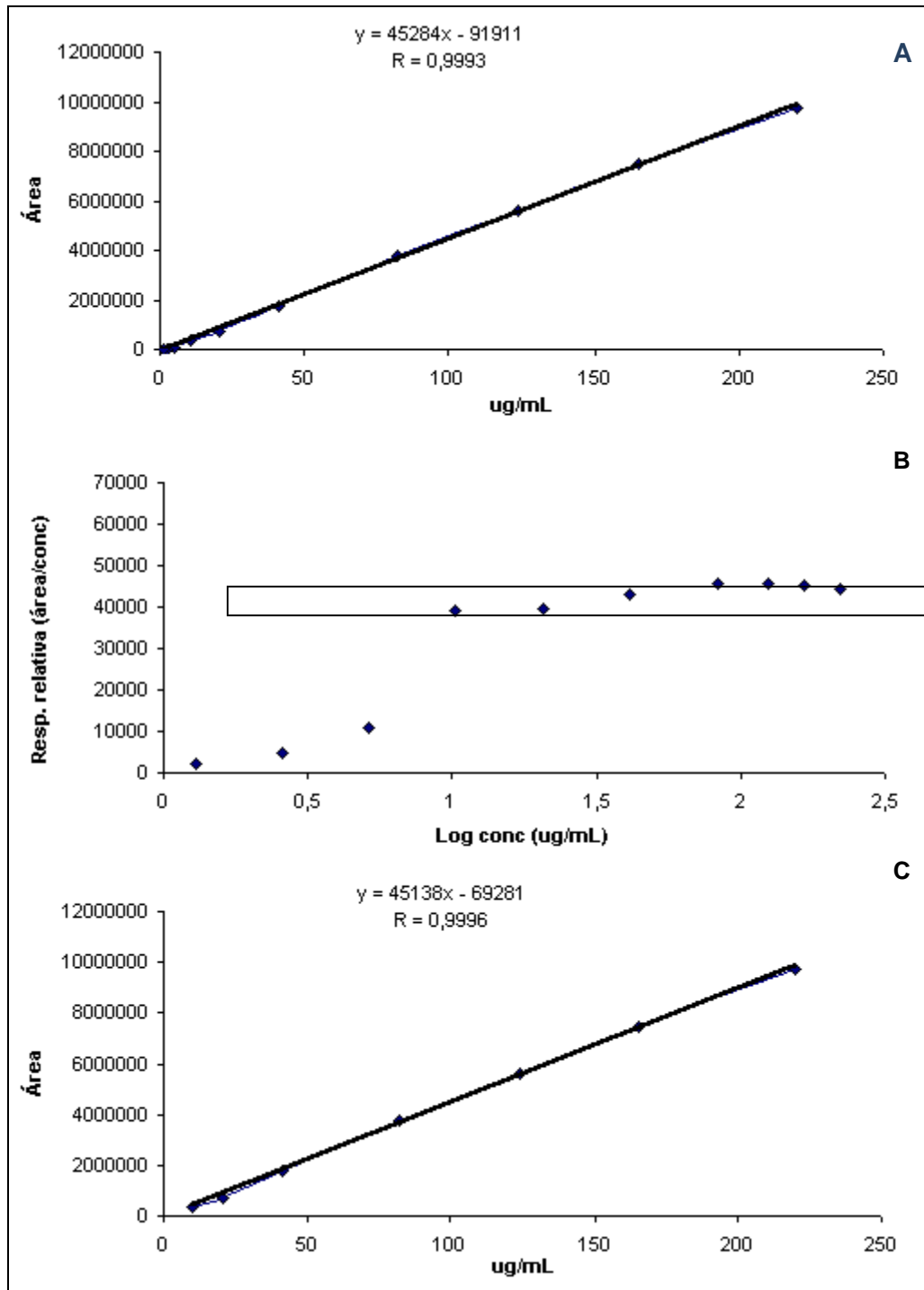


Figura 49: Estudo de linearidade para benzofenona (pi). **A** – curva com todos os pontos; **B** – determinação da faixa linear de trabalho; **C** – curva analítica obedecendo à faixa de trabalho.

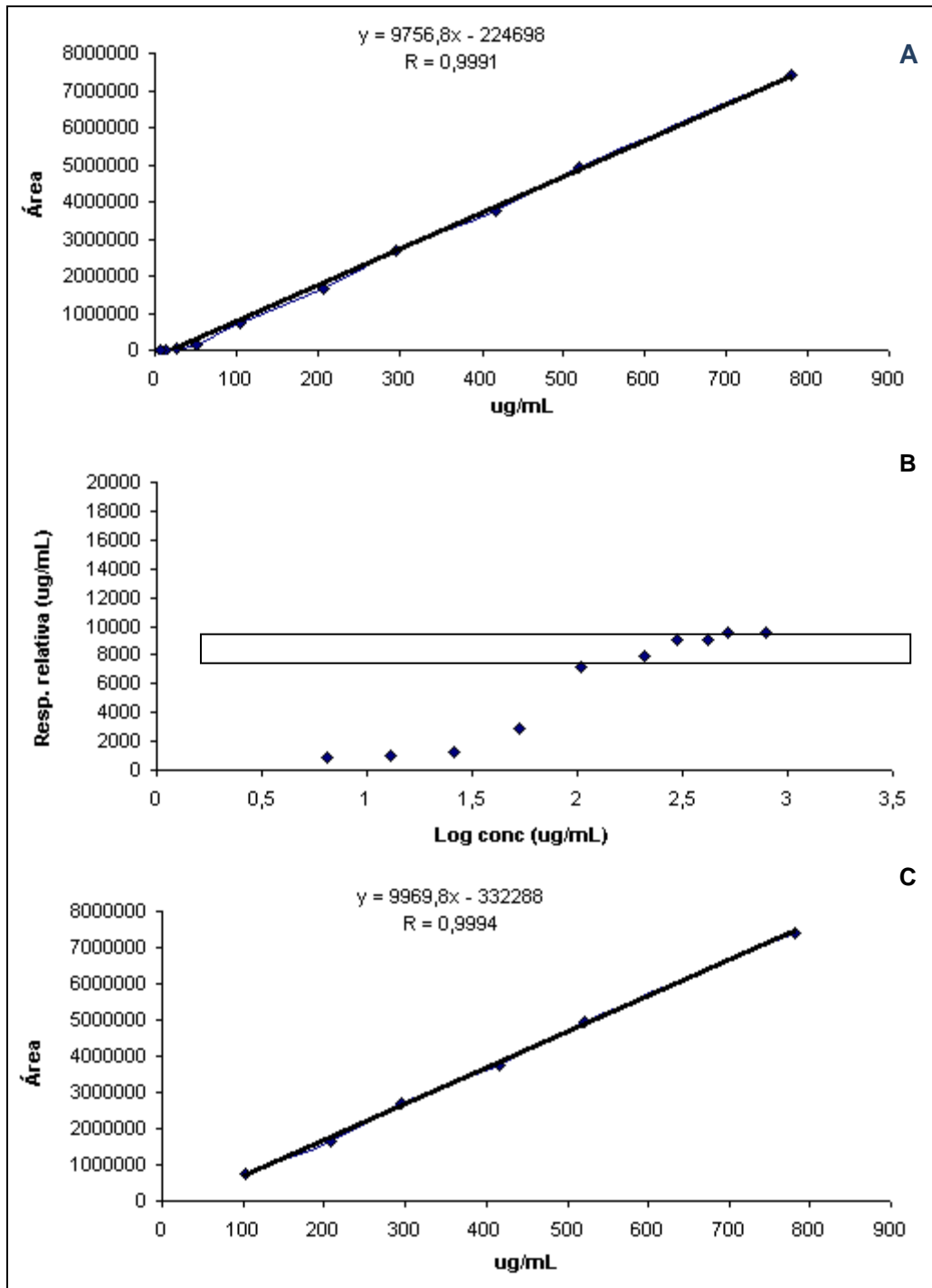


Figura 50: Estudo de linearidade para piperonal (ps). **A** – curva com todos os pontos; **B** – determinação da faixa linear de trabalho; **C** – curva analítica obedecendo à faixa de trabalho.

Tabela 11: Parâmetros das curvas analíticas.

Componente	FCT \pm 10 %	FLD ($\mu\text{g/mL}$)	$r \pm$ DP	CV (%)
Rutina	5676	20,5 – 410	0,9979 \pm 0,0015	0,16
Q-ram	23105	23,44 – 1000	0,9992 \pm 0,0009	0,09
C-ram	20195	22,97 – 980	0,9993 \pm 0,0017	0,17
Quercetina	33037	21,2 – 424	0,9988 \pm 0,0001	0,01
Canferol	27232	40,32 – 860	0,9990 \pm 0,0019	0,19
Benzofenona	43590	10,32 – 220	0,9996 \pm 0,0002	0,02
Piperonal	8460	104 – 780	0,9994 \pm 0,0002	0,02

FCT = faixa calculada de trabalho, **FLD** = faixa linear dinâmica, **r** = coeficiente de correlação, **DP** = desvio padrão, **CV** = coeficiente de variação. Q-ram = quercitrina e C-ram = 3-O- α -ramnopiranosil-canferol

Os limites operacionais de detecção (**LOD**) e quantificação (**LOQ**) foram calculados por meio da elaboração de curvas analíticas (Figuras 51 - 53) semelhantemente ao processo de linearidade. Dentre as distintas maneiras para a determinação destes parâmetros, o método com base em parâmetros da curva analítica é o mais adequado por permitir a aplicação de análises estatísticas. Por isso, o mesmo apresenta resultados mais confiáveis. Os parâmetros das curvas analíticas resultaram na estimativa do tamanho da amostra que pode ser detectada e quantificada. Assim, na tabela 12 apresentam-se estes resultados considerando todos os padrões. Nota-se que os valores de detecção (0,02 – 1,70 $\mu\text{g/mL}$) e quantificação (0,07 – 5,11 $\mu\text{g/mL}$) foram baixos. Os coeficientes de correlação **r** variaram entre 0,9961 a 0,9990. Os coeficientes de variação, calculados a partir dos limites de quantificação, oscilaram entre 0,10 a 5,24%. Por uma questão de melhor formatação, as curvas do padrão secundário não foram apresentadas.

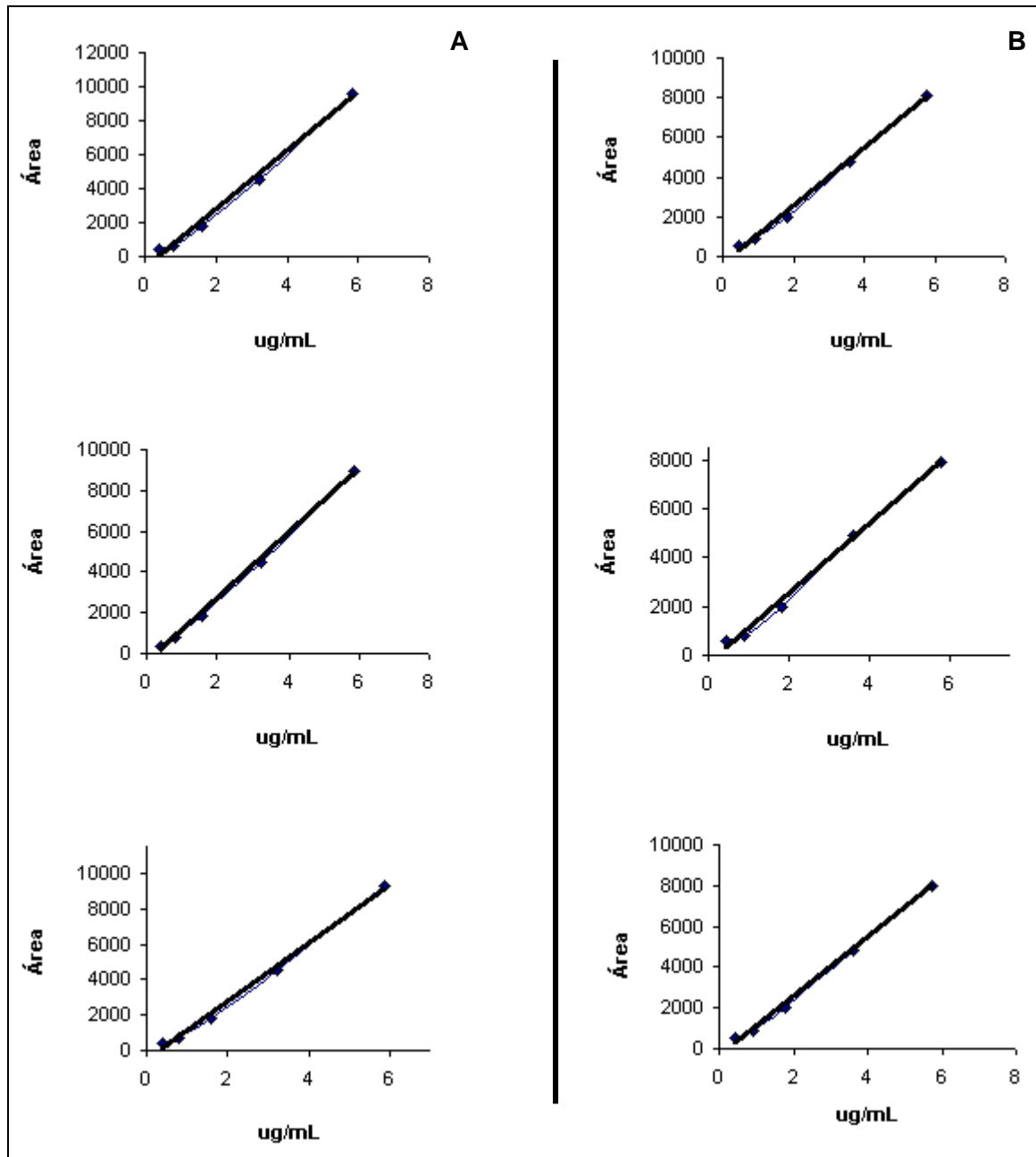


Figura 51: Curvas analíticas em triplicatas para estimativa dos limites de detecção e quantificação. **A:** quercitrina e **B:** 3-O- α -ramnopiranosil-canferol.

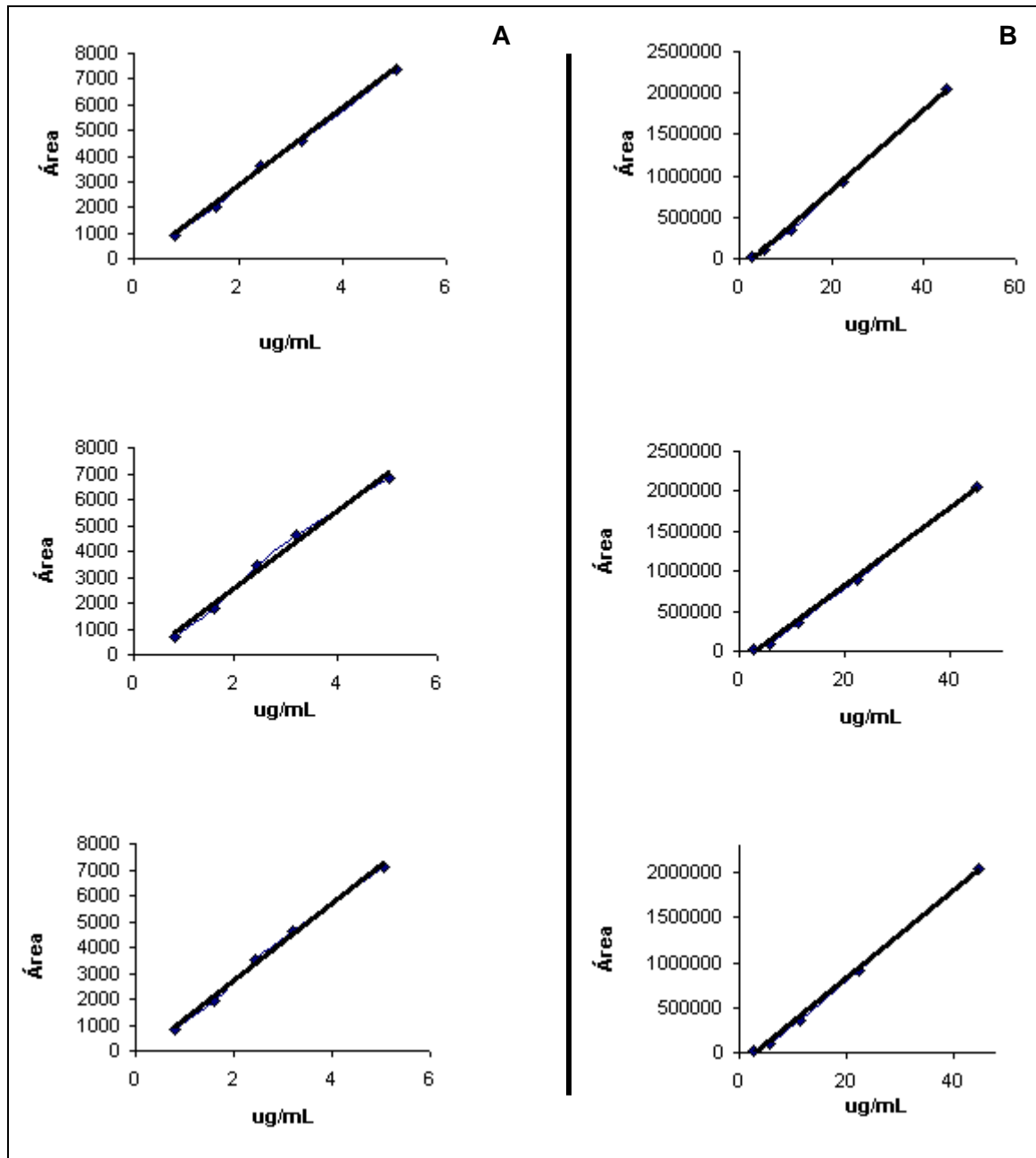


Figura 52: Curvas analíticas em triplicatas para estimativa dos limites de detecção e quantificação. **A:** canferol e **B:** benzofenona (ρ).

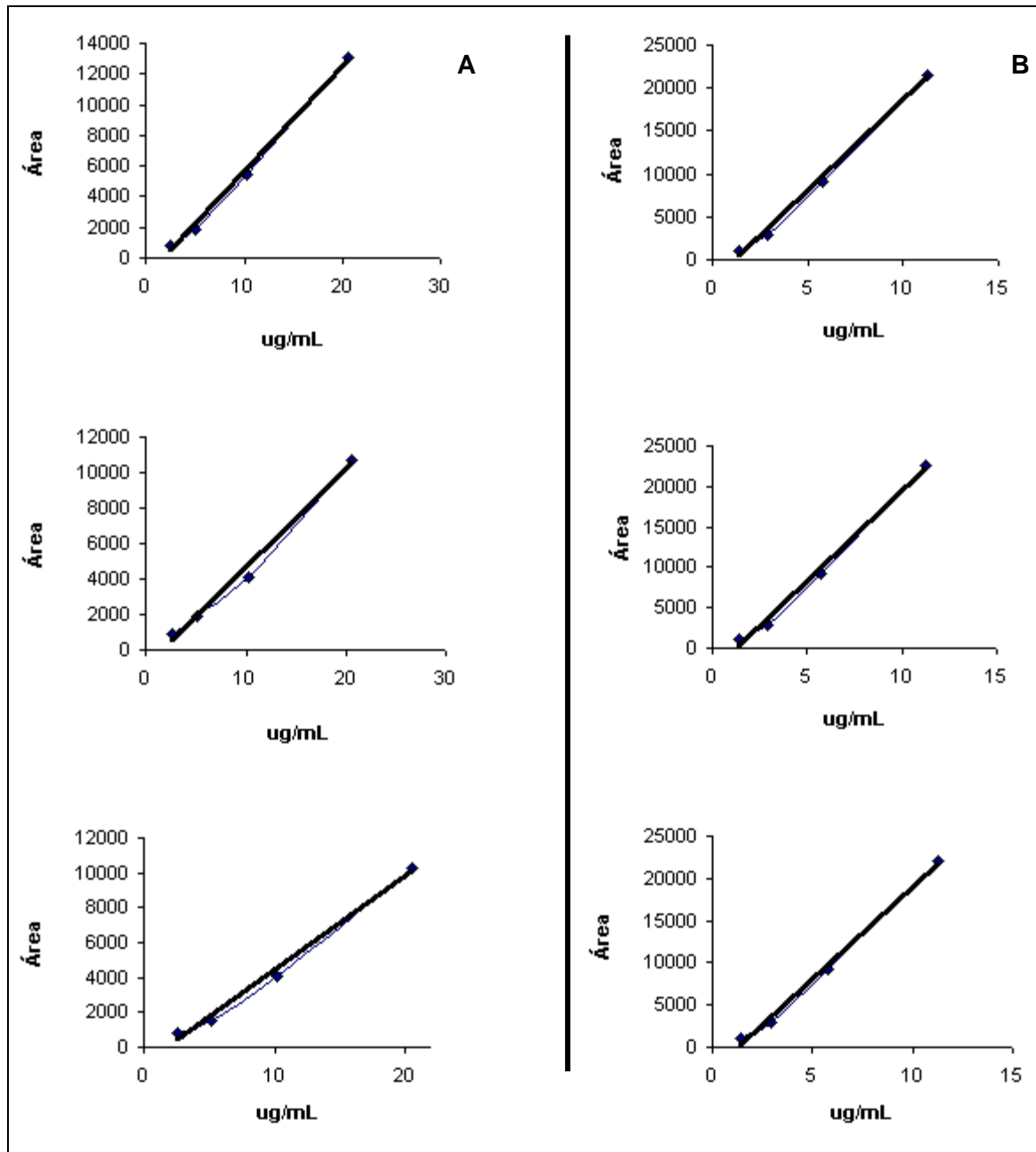


Figura 53: Curvas analíticas em triplicatas para estimativa dos limites de detecção e quantificação. **A:** rutina e **B:** quercetina.

Tabela 12: Estimativas de LOD e LOQ para os padrões.

Componente	FLD ($\mu\text{g/mL}$)	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>	LOD	LOQ	CV (%)*
Rutina	2,60 – 20,50	568	-904	0,9961	1,10	3,34	5,24
Q-ram	0,40 – 5,86	1649	-637	0,9985	0,32	0,96	2,73
C-ram	0,45 – 5,75	1447	-365	0,9981	0,02	0,07	0,90
Quercetina	1,44 – 11,25	2181	-2837	0,9975	0,25	0,75	2,55
Canferol	0,80 – 5,04	1505	-265	0,9980	0,03	0,10	1,52
Benzofenona	2,80 – 44,80	48982	-163200	0,9990	0,15	0,44	0,10
Piperonal	6,50 – 52,0	1380	-3903	0,9982	1,70	5,11	1,07

FLD = faixa linear dinâmica, **r** = coeficiente de correlação. Q-ram = quercitrina e C-ram = 3-O- α -ramnopiranosil-canferol. **$y = ax + b$** , em que, **y**: corresponde à área do pico, **x**: concentração em $\mu\text{g/mL}$, **a**: coeficiente angular e **b**: coeficiente linear. LOD e LOQ dados em $\mu\text{g/mL}$. **CV (%)***: coeficiente de variação considerando os valores de LOQ.

A **precisão** intra-ensaio ou repetibilidade foi dada pela avaliação de seis amostras preparadas no mesmo dia, pelo mesmo analista sob as mesmas condições instrumentais, cromatográficas e de extração. Já a precisão inter-ensaio ou intermediária seguiu os mesmos parâmetros utilizados na determinação da repetibilidade, porém foi realizada em dias diferentes.

As respostas avaliadas nestes procedimentos foram tempo de retenção, área e altura dos picos. Nota-se que os coeficientes encontrados (Tabelas 13 - 15) para cada componente estão abaixo de 5%, tanto para repetibilidade quanto para precisão intermediária, considerando as diferentes respostas.

Tabela 13: Repetibilidade

Experimentos	TR	CV (%)	ÁREA	CV (%)	ALTURA	CV (%)
Q-ram						
1	31,7 ± 0,033	0,103	8273746 ± 81792	0,99	1052593 ± 6701	0,64
2	31,7 ± 0,004	0,013	9008365 ± 19844	0,22	1126217 ± 1102	0,10
3	31,8 ± 0,021	0,067	8985344 ± 34413	0,38	1136331 ± 10131	0,89
4	31,8 ± 0,004	0,013	8606457 ± 31442	0,37	1086640 ± 2545	0,23
5	31,8 ± 0,005	0,016	8632314 ± 26482	0,31	1098375 ± 12456	1,13
6	31,9 ± 0,022	0,069	8894459 ± 46506	0,52	1132236 ± 1030	0,09
C-ram						
1	33,8 ± 0,030	0,090	4384547 ± 33236	0,76	593389 ± 5279	0,89
2	33,9 ± 0,001	0,002	4825737 ± 19377	0,40	636683 ± 2612	0,41
3	33,9 ± 0,013	0,038	4795872 ± 41194	0,86	636059 ± 5293	0,83
4	33,9 ± 0,004	0,013	4568250 ± 11353	0,25	606391 ± 1460	0,24
5	33,9 ± 0,019	0,056	4564262 ± 16589	0,36	605238 ± 2992	0,49
6	33,9 ± 0,024	0,071	4715019 ± 14423	0,31	625556 ± 708	0,11
Benzofenona						
1	50,3 ± 0,017	0,034	2007694 ± 9354	0,47	375114 ± 3449	0,92
2	50,3 ± 0,012	0,024	2133211 ± 3740	0,18	394760 ± 202	0,05
3	50,3 ± 0,001	0,001	2156814 ± 37855	1,76	389955 ± 6187	1,59
4	50,3 ± 0,001	0,001	2049641 ± 26975	1,32	386817 ± 15182	3,92
5	50,3 ± 0,014	0,029	2070452 ± 6547	0,32	384937 ± 1825	0,47
6	50,3 ± 0,001	0,001	2103227 ± 5440	0,26	388386 ± 10685	2,75

Q-ram = quercitrina e C-ram = 3-O- α -ramnopiranosil-canferol. TR: tempo de retenção.

Tabela 14: Precisão intermediária realizada no 1º dia.

Experimentos	TR	CV (%)	ÁREA	CV (%)	ALTURA	CV (%)
Q-ram						
1	32,1 ± 0,580	1,80	8664048 ± 167477	1,93	1101527 ± 6577	0,60
2	31,8 ± 0,045	0,142	8819794 ± 121298	1,38	1122606 ± 14991	1,34
3	31,9 ± 0,019	0,060	9142208 ± 123205	1,35	1154973 ± 8496	0,74
4	31,9 ± 0,012	0,036	8821776 ± 98075	1,11	1124182 ± 13256	1,18
5	31,9 ± 0,005	0,014	8826829 ± 23208	0,26	1124892 ± 1965	0,17
6	31,9 ± 0,019	0,059	9261026 ± 19416	0,21	1178026 ± 8430	0,72
C-ram						
1	33,9 ± 0,014	0,040	4515350 ± 79722	1,77	601092 ± 7794	1,30
2	33,9 ± 0,039	0,114	4648903 ± 75078	1,61	622045 ± 11732	1,89
3	33,9 ± 0,024	0,069	4803763 ± 65122	1,36	633777 ± 7026	1,11
4	33,9 ± 0,005	0,015	4626755 ± 55433	1,20	612531 ± 7776	1,27
5	34,0 ± 0,006	0,017	4633528 ± 10419	0,22	611252 ± 502	0,08
6	34,0 ± 0,017	0,050	4858837 ± 12863	0,26	638992 ± 5229	0,82
Benzofenona						
1	50,4 ± 0,004	0,007	2351540 ± 93350	3,97	408196 ± 14192	3,48
2	50,4 ± 0,002	0,004	2323888 ± 96294	4,14	414366 ± 15047	3,63
3	50,4 ± 0,004	0,008	2269605 ± 11997	0,53	406955 ± 2502	0,61
4	50,4 ± 0,021	0,041	2381529 ± 50939	2,14	419011 ± 1102	0,26
5	50,4 ± 0,012	0,024	2366534 ± 21206	0,90	413603 ± 7647	1,85
6	50,4 ± 0,001	0,002	2296746 ± 42148	1,84	410660 ± 6272	1,53

Q-ram = quercitrina e C-ram = 3-O- α -ramnopiranosil-canferol. TR: tempo de retenção.

Tabela 15: Precisão intermediária realizada no 2º dia.

Experimentos	TR	CV (%)	ÁREA	CV (%)	ALTURA	CV (%)
Q-ram						
1	32,0 ± 0,008	0,024	8695193 ± 17758	0,20	1111610 ± 5452	0,49
2	32,0 ± 0,007	0,022	8513627 ± 32038	0,38	1090314 ± 11177	1,03
3	31,9 ± 0,004	0,011	9146937 ± 5438	0,06	1175058 ± 2988	0,25
4	31,9 ± 0,001	0,004	8669523 ± 57048	0,66	1116117 ± 7473	0,67
5	31,9 ± 0,003	0,009	8844026 ± 8312	0,09	1125646 ± 7591	0,67
6	31,9 ± 0,005	0,016	9115721 ± 43578	0,48	1162208 ± 1484	0,13
7	31,9 ± 0,031	0,098	8365734 ± 218375	2,61	1078879 ± 20136	1,87
8	31,9 ± 0,004	0,011	8999483 ± 43776	0,49	1151898 ± 1886	0,16
C-ram						
1	34,0 ± 0,023	0,069	4566168 ± 8945	0,20	598835 ± 849	0,14
2	34,0 ± 0,005	0,015	4471701 ± 29364	0,66	583855 ± 7309	1,25
3	34,0 ± 0,003	0,008	4847434 ± 4933	0,10	634058 ± 1100	0,17
4	34,0 ± 0,004	0,010	4564501 ± 30199	0,66	598150 ± 6803	1,14
5	34,0 ± 0,004	0,010	4667333 ± 12092	0,26	609199 ± 5526	0,91
6	34,0 ± 0,005	0,015	4810994 ± 25557	0,53	631651 ± 2211	0,35
7	33,9 ± 0,030	0,087	4375549 ± 121522	2,78	582162 ± 15001	2,58
8	34,0 ± 0,005	0,015	4743263 ± 16649	0,35	627309 ± 3776	0,60
Benzofenona						
1	50,4 ± 0,006	0,013	2279580 ± 71778	3,15	408518 ± 10124	2,48
2	50,3 ± 0,052	0,103	2329987 ± 493	0,02	414532 ± 1620	0,39
3	50,4 ± 0,002	0,004	2373674 ± 62276	2,62	421797 ± 11894	2,82
4	50,4 ± 0,015	0,029	2225381 ± 41960	1,89	388974 ± 606	0,16
5	50,4 ± 0,001	0,001	2244090 ± 15502	0,69	388847 ± 427	0,11
6	50,3 ± 0,054	0,107	2250905 ± 25140	1,12	391921 ± 3920	1,00
7	50,4 ± 0,029	0,058	2304783 ± 36136	1,60	411525 ± 5872	1,40
8	50,4 ± 0,008	0,017	2234735 ± 28731	1,30	388910 ± 517	0,10

Q-ram = quercitrina e C-ram = 3-O- α -ramnopiranosil-canferol. TR: tempo de retenção.

A **recuperação** do método foi realizada com a fortificação de matriz de *C. langsdorffii* previamente esgotada com o auxílio de aparelho de Soxhlet. Na figura 54 mostra-se o perfil cromatográfico desta matriz após ser totalmente esgotada. O procedimento de recuperação permite avaliar o quanto do composto é possível recuperar durante o processo analítico, possibilitando os cálculos para a determinação da **exatidão** do método. Estes cálculos são dados pelo percentual de erro relativo entre os valores reais e teóricos das concentrações de cada composto em questão.

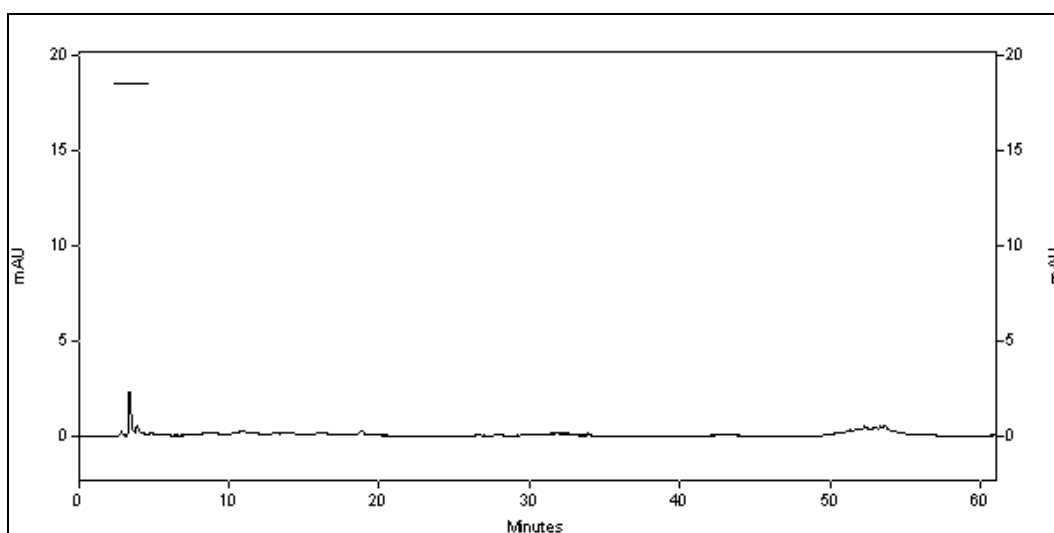


Figura 54: Matriz esgotada após ser submetida à extração com aparelho de Soxhlet.

Na avaliação dos resultados da tabela 16, observa-se que o método de extração empregado é capaz de recuperar rutina em valores entre 80 a 99 %, com CV menores que 5% e erro relativo menor que 20%. Os intervalos aceitáveis de recuperação geralmente estão entre 70 a 120%, com exatidão (erro) de até $\pm 20\%$ (RIBANI et al., 2004). Os percentuais de recuperação para quercitrina, 3-O- α -ramnopiranosil-canferol e canferol, foram bastante semelhantes, em média de 99% com erros relativos menores que 1% (Tabelas 17 - 19). Quanto à quercetina os valores de recuperação variaram entre 96 a 111% com exatidão oscilando na faixa de 4 a 11% (Tabela 20).

Tabela 16: Determinação da recuperação e exatidão para rotina.

Experimentos	Área \pm DP	CV (%)	VR	Erro (%)	Rec. (%) \pm DP	CV (%)
Conc. Nível 1 $VT = 199,16 \mu\text{g/mL}$						
1	1766583 \pm 13246	0,75	199,67	-0,17	99,83 \pm 0,70	0,70
2	1662176 \pm 5251	0,32	199,91	-0,04	99,96 \pm 0,47	0,47
3	1670892 \pm 3343	0,20	193,32	-3,34	96,66 \pm 0,56	0,58
4	1680348 \pm 14275	0,85	198,24	-0,88	99,12 \pm 0,28	0,29
5	1728940 \pm 22469	1,30	201,48	0,74	100,74 \pm 0,65	0,65
Média total	1701788 \pm 11717	0,68	198,52	-0,74	99,26 \pm 0,53	0,54
Conc. Nível 2 $VT = 99,58 \mu\text{g/mL}$						
1	553450 \pm 9966	1,80	97,55	-2,45	97,55 \pm 0,89	0,91
2	599470 \pm 5841	0,97	100,55	0,55	100,55 \pm 0,89	0,88
3	556853 \pm 10997	1,97	98,70	-1,30	98,70 \pm 1,70	1,72
4	620012 \pm 11061	1,78	100,58	0,58	100,58 \pm 1,52	1,52
5	673896 \pm 12431	1,84	101,33	1,33	101,33 \pm 0,93	0,92
Média total	600736 \pm 10059	1,68	99,74	-0,26	99,74 \pm 1,19	1,19
Conc. Nível 3 $VT = 49,79 \mu\text{g/mL}$						
1	140844 \pm 1566	1,11	38,98	-22,03	77,97 \pm 0,53	0,68
2	133014 \pm 6032	4,53	37,43	-25,13	74,87 \pm 2,73	3,64
3	139105 \pm 3144	2,26	40,10	-19,81	80,19 \pm 1,11	1,39
4	160262 \pm 2922	1,82	42,83	-14,34	85,66 \pm 0,44	0,52
5	158525 \pm 3442	2,17	42,89	-14,21	85,79 \pm 1,50	1,75
Média total	146350 \pm 3421	2,38	40,45	-19,10	80,90 \pm 1,26	1,59

Rec.: recuperação; **VT:** valor teórico; **VR:** valor real ($\mu\text{g/mL}$); **DP:** desvio padrão; **CV:** coeficiente de variação

Tabela 17: Determinação da recuperação e exatidão para quercitrina.

Experimentos	Área \pm DP	CV (%)	VR	Erro (%)	Rec. (%) \pm DP	CV (%)
Conc. Nível 1	<i>VT = 268,33 μg/mL</i>					
1	6376831 \pm 19634	0,31	269,82	0,56	100,56 \pm 0,23	0,22
2	6006013 \pm 23482	0,39	270,42	0,78	100,78 \pm 0,34	0,33
3	6013051 \pm 25818	0,43	260,35	-2,97	97,03 \pm 0,03	0,04
4	6085682 \pm 55376	0,91	268,75	0,15	100,15 \pm 0,17	0,17
5	6196557 \pm 79982	1,29	270,38	0,76	100,76 \pm 0,30	0,30
Média total	6135627 \pm 40858	0,67	267,94	-0,14	99,86 \pm 0,21	0,21
Conc. Nível 2	<i>VT = 134,16 μg/mL</i>					
1	2805330 \pm 32145	1,15	129,78	-3,27	96,73 \pm 0,25	0,26
2	3108834 \pm 33970	1,09	136,96	2,08	102,08 \pm 0,24	0,23
3	2930222 \pm 51529	1,76	136,25	1,56	101,56 \pm 0,25	0,25
4	3188837 \pm 18870	0,59	135,90	1,30	101,30 \pm 0,15	0,14
5	3321178 \pm 24412	0,74	131,37	-2,08	97,92 \pm 0,19	0,20
Média total	3070880 \pm 32185	1,06	134,05	-0,08	99,92 \pm 0,22	0,22
Conc. Nível 3	<i>VT = 67,08 μg/mL</i>					
1	1319846 \pm 7982	0,60	66,80	-0,42	99,58 \pm 0,70	0,70
2	1290352 \pm 14752	1,14	65,69	-2,07	97,93 \pm 1,15	1,17
3	1240952 \pm 3542	0,29	65,96	-1,67	98,33 \pm 0,39	0,39
4	1331048 \pm 18788	1,41	66,67	-0,60	99,40 \pm 0,23	0,23
5	1327571 \pm 6749	0,51	67,32	0,36	100,36 \pm 1,04	1,03
Média total	1301954 \pm 10363	0,79	66,49	-0,88	99,12 \pm 0,70	0,71

Rec.: recuperação; **VT:** valor teórico; **VR:** valor real (μ g/mL); **DP:** desvio padrão; **CV:** coeficiente de variação

Tabela 18: Determinação da recuperação e exatidão para 3-O- α -ramnopiranosil-canferol.

Experimentos	Área \pm DP	CV (%)	VR	Erro (%)	Rec. (%) \pm DP	CV (%)
Conc. Nível 1 $VT = 166,66 \mu\text{g/mL}$						
1	3289697 \pm 12774	0,39	166,68	0,01	100,01 \pm 0,31	0,31
2	3093548 \pm 14094	0,46	166,79	0,08	100,08 \pm 0,43	0,43
3	3177436 \pm 12390	0,39	164,73	-1,16	98,84 \pm 0,05	0,05
4	3143996 \pm 32266	1,03	166,25	-0,24	99,76 \pm 0,05	0,05
5	3227893 \pm 45265	1,40	168,60	1,16	101,16 \pm 0,31	0,30
Média total	3186514 \pm 23358	0,73	166,61	-0,03	99,97 \pm 0,23	0,23
Conc. Nível 2 $VT = 83,33 \mu\text{g/mL}$						
1	1388424 \pm 16138	1,16	83,71	0,45	100,45 \pm 0,29	0,29
2	1457873 \pm 15414	1,06	83,80	0,56	100,56 \pm 0,29	0,29
3	1376120 \pm 27509	2,00	83,50	0,20	100,20 \pm 0,46	0,46
4	1499695 \pm 8053	0,54	83,40	0,09	100,09 \pm 0,09	0,09
5	1567567 \pm 12864	0,82	81,01	-2,79	97,21 \pm 0,07	0,07
Média total	1457936 \pm 15996	1,12	83,08	-0,30	99,70 \pm 0,24	0,24
Conc. Nível 3 $VT = 41,66 \mu\text{g/mL}$						
1	575744 \pm 1355	0,24	41,85	0,45	100,45 \pm 0,43	0,43
2	530512 \pm 6442	1,21	39,20	-5,91	94,09 \pm 1,17	1,24
3	543099 \pm 1164	0,21	41,49	-0,42	99,58 \pm 0,40	0,40
4	596342 \pm 8928	1,50	42,74	2,60	102,60 \pm 0,34	0,33
5	592143 \pm 3680	0,62	42,95	3,10	103,10 \pm 0,94	0,91
Média total	567568 \pm 4314	0,76	41,64	-0,04	99,96 \pm 0,66	0,67

Rec.: recuperação; **VT:** valor teórico; **VR:** valor real ($\mu\text{g/mL}$); **DP:** desvio padrão; **CV:** coeficiente de variação

Tabela 19: Determinação da recuperação e exatidão para o canferol.

Experimentos	Área \pm DP	CV (%)	VR	Erro (%)	Rec. (%) \pm DP	CV (%)
Conc. Nível 1	<i>VT = 172,5 μg/mL</i>					
1	3942367 \pm 12706	0,32	172,76	0,15	100,15 \pm 0,28	0,28
2	3761011 \pm 13289	0,35	175,44	1,70	101,70 \pm 0,47	0,46
3	3834750 \pm 14868	0,39	171,87	-0,36	99,64 \pm 0,07	0,07
4	3811434 \pm 33772	0,89	174,34	1,07	101,07 \pm 0,20	0,20
5	3854292 \pm 53162	1,38	174,21	0,99	100,99 \pm 0,19	0,19
Média total	3840771 \pm 25559	0,67	173,73	0,71	100,71 \pm 0,24	0,24
Conc. Nível 2	<i>VT = 86,25 μg/mL</i>					
1	1663592 \pm 22659	1,36	83,42	-3,28	96,72 \pm 0,49	0,51
2	1798758 \pm 19740	1,10	86,13	-0,14	99,86 \pm 0,17	0,17
3	1703610 \pm 21503	1,26	86,10	-0,18	99,82 \pm 0,35	0,35
4	1900577 \pm 7077	0,37	88,11	2,16	102,16 \pm 0,31	0,31
5	1974718 \pm 14307	0,72	84,76	-1,73	98,27 \pm 0,29	0,29
Média total	1808251 \pm 17057	0,96	85,70	-0,63	99,37 \pm 0,32	0,32
Conc. Nível 3	<i>VT = 43,12 μg/mL</i>					
1	676791 \pm 2697	0,40	42,20	-2,14	97,86 \pm 0,14	0,14
2	657540 \pm 8572	1,30	41,07	-4,76	95,24 \pm 1,58	1,66
3	651241 \pm 1987	0,31	42,67	-1,04	98,96 \pm 0,62	0,62
4	709047 \pm 7265	1,02	43,96	1,95	101,95 \pm 0,58	0,57
5	694339 \pm 6723	0,97	43,56	1,01	101,01 \pm 1,41	1,39
Média total	677791 \pm 5449	0,80	42,69	-0,99	99,01 \pm 0,87	0,88

Rec.: recuperação; **VT:** valor teórico; **VR:** valor real (μ g/mL); **DP:** desvio padrão; **CV:** coeficiente de variação

Tabela 20: Determinação da recuperação e exatidão para quercetina.

Experimentos	Área ± DP	CV (%)	VR	Erro (%)	Rec. (%) ± DP	CV (%)
Conc. Nível 1	<i>VT = 355,83 µg/mL</i>					
1	9928086 ± 88988	0,90	393,54	10,54	110,54 ± 0,33	0,29
2	10275572 ± 196155	1,91	394,20	10,73	110,73 ± 0,08	0,07
3	12059850 ± 55693	0,46	396,92	11,49	111,49 ± 0,24	0,22
4	10622932 ± 72799	0,69	397,75	11,73	111,73 ± 0,20	0,18
5	10449252 ± 245621	2,35	395,97	11,23	111,23 ± 0,71	0,63
Média total	10667138 ± 131851	1,26	395,68	11,14	111,14 ± 0,31	0,28
Conc. Nível 2	<i>VT = 177,91 µg/mL</i>					
1	4127905 ± 75598	1,83	176,46	-0,87	99,13 ± 0,18	0,19
2	4563613 ± 68630	1,50	189,73	6,59	106,59 ± 0,03	0,03
3	4669076 ± 41045	0,88	189,74	6,60	106,60 ± 0,08	0,07
4	4776860 ± 98097	2,05	187,47	5,32	105,32 ± 0,49	0,47
5	4670236 ± 150789	3,23	188,60	5,96	105,96 ± 0,89	0,84
Média total	4561538 ± 86832	1,90	186,40	4,72	104,72 ± 0,33	0,32
Conc. Nível 3	<i>VT = 88,95 µg/mL</i>					
1	1755959 ± 46028	2,62	84,03	-5,58	94,42 ± 1,38	1,46
2	1975208 ± 10843	0,55	86,21	-3,13	96,87 ± 0,40	0,41
3	1888172 ± 38344	2,03	86,08	-3,28	96,72 ± 0,46	0,48
4	1794094 ± 30326	1,69	85,26	-4,20	95,80 ± 0,19	0,20
5	1884651 ± 128067	6,80	85,74	-3,67	96,33 ± 0,76	0,78
Média total	1859616 ± 50721	2,74	85,46	-3,97	96,03 ± 0,64	0,67

Rec.: recuperação; **VT:** valor teórico; **VR:** valor real (µg/mL); **DP:** desvio padrão; **CV:** coeficiente de variação

Utilizando-se o piperonal como padrão secundário foi possível avaliar a recuperação da benzofenona, a qual foi em média de 76% com erro relativo em torno de 23% e CV variando entre 5 a 9%. Embora os valores obtidos para recuperação do padrão interno sejam aceitáveis, nota-se que tais valores estão próximos ao limite de 70% enquanto que a recuperação média para os flavonóis foi de 97%. Possivelmente, o padrão interno, benzofenona, deve ter interagido mais acentuadamente com a matriz utilizada. Por isso, deve ter ocorrido a perda relativamente pronunciada deste componente durante a

elaboração do processo. Todavia a recuperação do padrão interno pode ser considerada satisfatória para a proposição do trabalho. Por outro lado, a ótima recuperação dos flavonóis, pode ser atribuída, não somente ao método de extração como um todo, mas também à proporção do solvente extrator (etanol 70%), a qual mostrou ser bastante seletiva para extrair este grupo de flavonóis.

O teste de **robustez** visa examinar fontes potencialmente passíveis de variações por meio da avaliação de uma ou um conjunto de respostas inerentes ao método. Para examinar estas fontes, um número de fatores, os quais estão inseridos ao procedimento de validação são selecionados e variações relativamente leves são deliberadas. De forma geral, determinar estas variações significa definir a perspectiva de uma dada oscilação quando o método é executado em instrumentos de outras marcas ou transferido para outro laboratório. Seguindo a metodologia descrita no parâmetro robustez 12 experimentos foram realizados. Para estes, as respostas área do pico, tempo de retenção, altura do pico e concentração do componente foram obtidas. Posteriormente, os efeitos, dados pelo CV%, de cada uma das respostas foram calculados para todos os fatores (Figuras 55 e 56).

Avaliando os valores obtidos nas respostas estudadas para quercitrina e 3-O- α -ramnopiranosil-canferol (Figuras 55 e 56), nota-se que os fatores quantidade de amostra (**A**), vazão da fase móvel (**G**), comprimento de onda (**J**) e volume injetado (**K**) apresentaram CV entre 10 e 20%. Considerando os desenho experimental e o número de variáveis envolvidas, estes valores podem ser considerados aceitáveis dentro da faixa limite de no máximo 20% (RIBANI, et al., 2004). Por outro lado, o fator solvente extrator (**F**) apresentou variações entre 50 e 60%. Portanto, a quantidade do solvente extrator sob nenhuma hipótese pode ser alterada, levando em conta a obtenção de resultados adequados na execução de todo o procedimento validado. Na avaliação do conjunto de resultados obtidos durante o processo de extração e análise por CLAE, mantendo-se a quantidade do solvente extrator, este método pode ser considerado robusto.

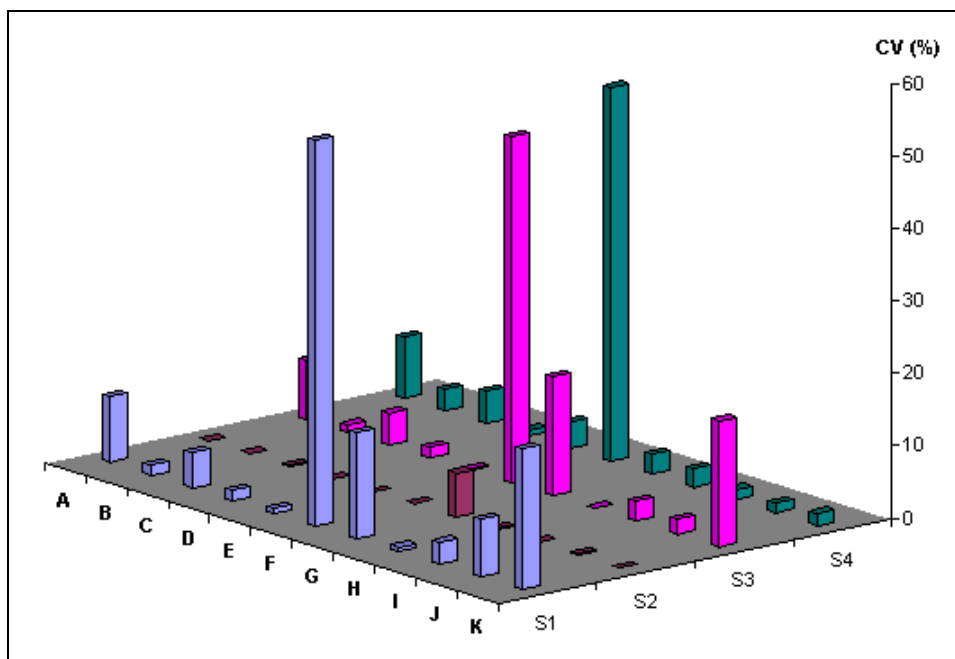


Figura 55: Efeitos dados pelo CV (%) para quercitrina. **S1** = área do pico; **S2** = tempo de retenção; **S3** = altura do pico e **S4** = concentração ($\mu\text{g/mL}$). **A**: quantidade de amostra (mg); **B**: tempo de extração (minutos); **C**: temperatura de extração ($^{\circ}\text{C}$); **D**: rotação (rpm); **E**: partícula (mesh); **F**: solvente extrator (mL); **G**: vazão (mL/min); **H**: fase móvel inicial (%); **I**: fase móvel intermediária (%); **J**: comprimento de ondas (nm) e **K**: volume injetado (μL).

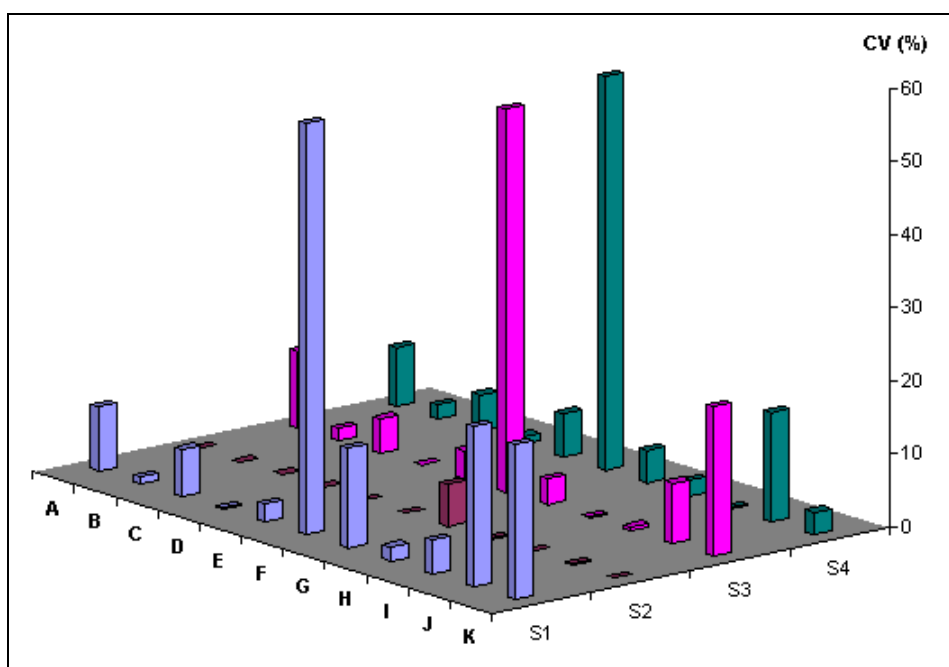


Figura 56: Efeitos dados pelo CV (%) para 3-O- α -ramnopiranosil-canferol. **S1** = área do pico; **S2** = tempo de retenção; **S3** = altura do pico e **S4** = concentração ($\mu\text{g/mL}$). Os fatores (**A – K**) seguem a figura 55.

III – ANÁLISE DA SAZONALIDADE

4.6 Influência da sazonalidade

Na avaliação química da *C. langsdorffii*, foram identificados e/ou purificados sesquiterpenos, diterpenos e derivados fenólicos. Considerando os extratos hidroalcoólico e a cromatografia líquida de alta eficiência com UV-DAD, dois flavonóis, quercitrina e 3-O- α -ramnopiranosil-canferol, se destacaram como compostos majoritários. Ao longo dos estudos fitoquímicos em conjunto com a validação de método analítico, foi observado que uma das formas de assegurar a qualidade destes extratos era a proposição de método cromatográfico para quantificar estes flavonóis. Para o desenvolvimento e validação deste método, além de quercitrina e 3-O- α -ramnopiranosil-canferol, os flavonóis, rutina, quercetina e canferol, também foram considerados como padrões. Contudo, duas questões foram relevantes:

- Estes flavonóis estariam presentes nestas amostras em qualquer época do ano?
- Como seria o perfil qualitativo e quantitativo destes compostos em um dado período de tempo?

Neste sentido, não somente levando em conta estas questões, mas também considerando a aplicabilidade do método validado, o estudo sazonal foi proposto.

Sabe-se que a variabilidade química das plantas é enorme, já que as rotas biossintéticas responsáveis pela produção de metabólitos secundários no vegetal são sensíveis a diversos fatores, como variações climáticas, fatores ambientais e, especialmente interação com insetos e predadores. O conhecimento das variações químicas é de grande importância para a qualidade e o preparo das espécies medicinais de interesse terapêutico e/ou industrial, sendo útil para a extração e isolamento de princípios ativos desejados ou

para a determinação da interrupção da colheita em épocas de produção de metabólitos tóxicos (BAUER; TITTEL, 1996).

Certamente, neste estudo de sazonalidade, não foi possível avaliar todos os fatores que influenciam a produção dos metabólitos da *C. langsdorffii*. Este estudo iniciou-se em fevereiro do ano de 2009. Estas amostras foram coletadas durante 14 meses consecutivos, finalizando a amostragem março de 2010. Ao longo deste período, observou-se que a época de floração da espécie ocorreu entre a 2^o quinzena de janeiro e 1^o quinzena de fevereiro. As figuras 57 e 58 apresentam ramos da *C. langsdorffii* florido e flores, respectivamente.



Figura 57: Ramos com flores da *C. langsdorffii*.



Figura 58: Destaque para as flores da espécie em estudo.

Continuando as observações, durante a floração notou-se a intensa visita de diferentes insetos incluindo a presença de *Apis mellifera*. Posteriormente, entre 2^o quinzena de agosto e 1^o quinzena de setembro foi observado à presença de frutos. Em algumas partes da planta coletaram-se frutos maduros (Figura 59), em outras partes verificou-se a presença de frutos verdes. Em alguns casos foi possível observar frutos verde, seco (após o amadurecimento) e frutos se abrindo e liberando as sementes (Figuras 60 e 61). Faltando cerca de sete dias para finalizar o mês de setembro, notou-se a queda de folhas aparentemente velhas. No mês de outubro esta queda intensificou, porém foi observado um leve crescimento de folhas jovens. Já a partir da 2^o quinzena de novembro o crescimento de folhas jovens foi visualmente aumentado. Levando em conta estas observações pode-se sugerir que a renovação foliar ocorre entre setembro e novembro.



Figura 59: Fruto maduro da *C. langsdorffii*.



Figura 60: Em único ramo é possível observar, frutos verde, seco e fruto se abrindo, liberando a semente.

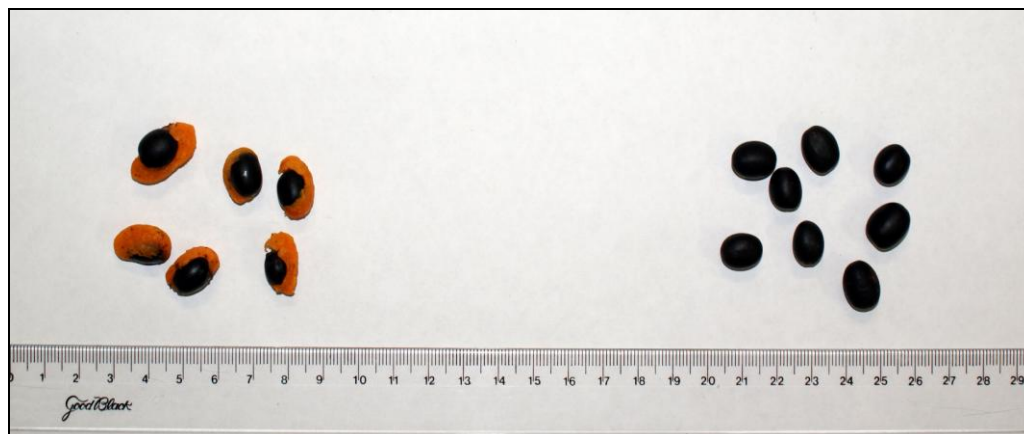


Figura 61: Destacam-se as sementes retiradas dos frutos.

Considerando a figura 61, nota-se que as sementes *in natura* são recobertas por uma espécie de resina de coloração laranja. O extrato hidroalcoólico desta resina foi analisado seguindo o método. Considerando detecção por UV-DAD, nesta análise não foi possível observar compostos promissores. Na análise do extrato obtidos dos frutos também não foi observado à presença de flavonóis, considerando a técnica analítica CLAE/UV-DAD. Por outro lado, no extrato hidroalcoólico obtido das flores (Figura, 62) detectou-se quercitrina como majoritário usando-se a mesma técnica de análise. Embora na avaliação geral da espécie existam algumas variações considerando o isolamento de diferente compostos, com base na fitoquímica, método analítico e estudo sazonal, a quercitrina somente não será detectada no óleo-resina da *C. langsdorffii*. Nas outras matrizes derivadas desta planta haverá a possibilidade em detectar este flavonol.

Quanto às análises qualitativas sazonais, a cada mês alíquotas das folhas foram submetidas ao método de análise. Estas análises foram realizadas em triplicata ao longo do período de estudo. Na figura 63 apresentam-se todos os cromatogramas obtidos para sazonalidade.

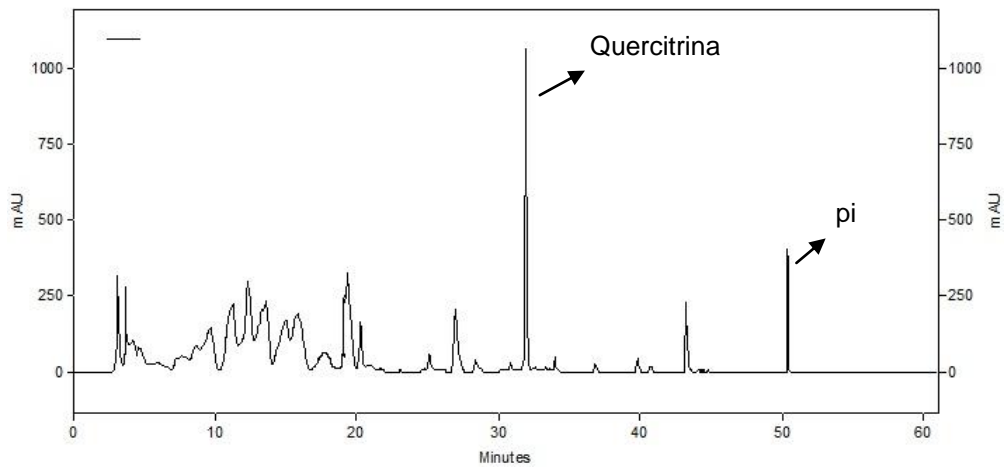
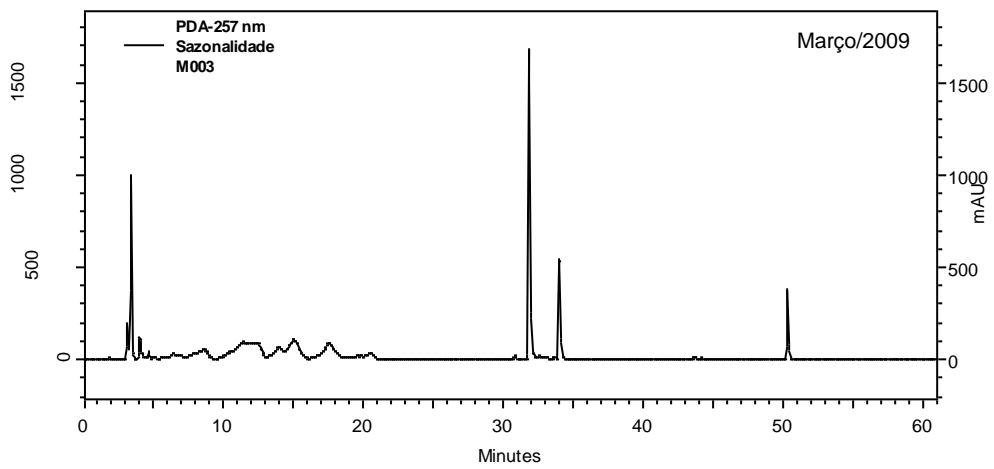
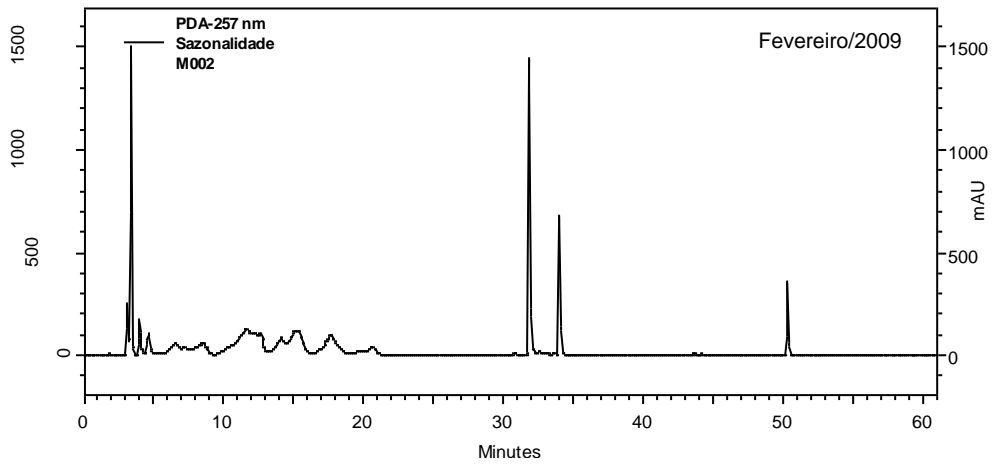
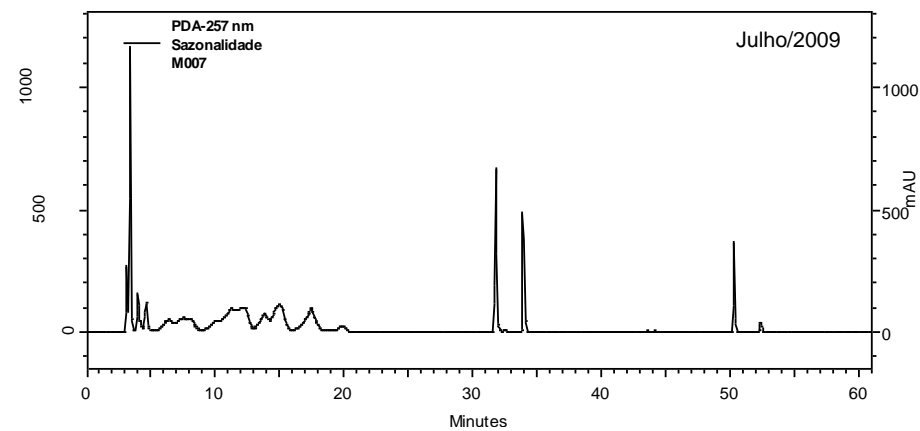
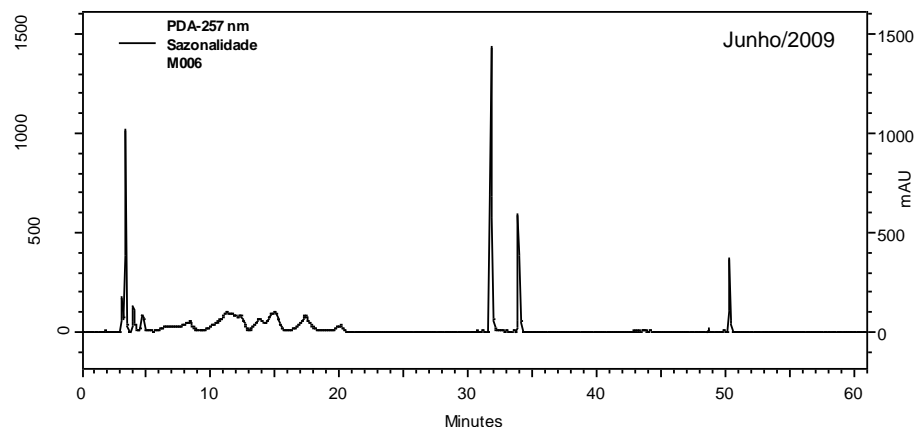
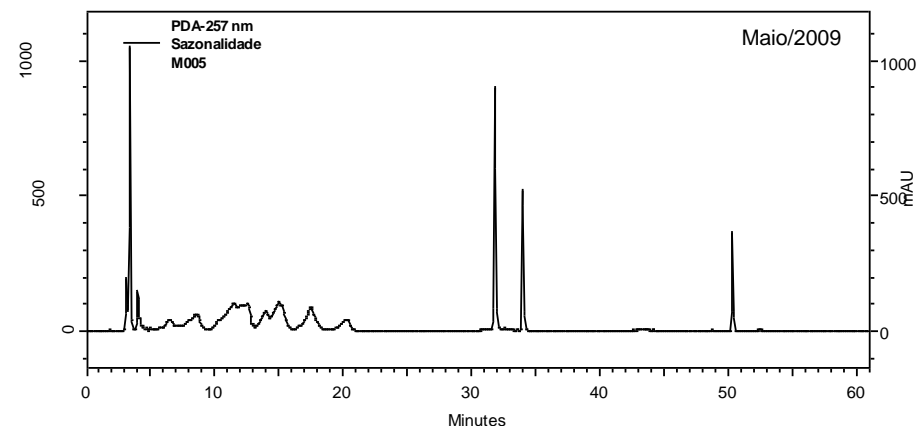
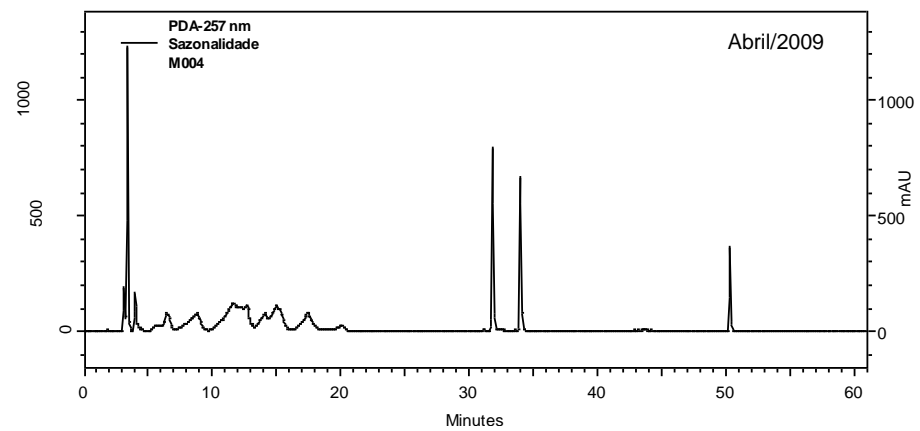


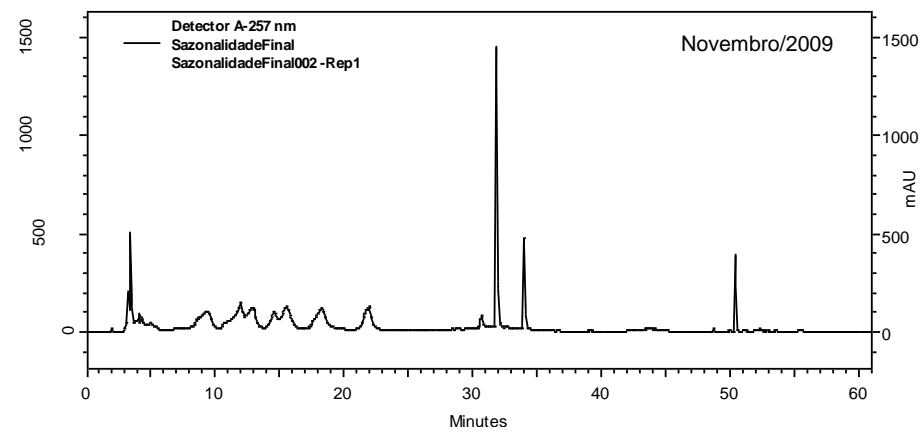
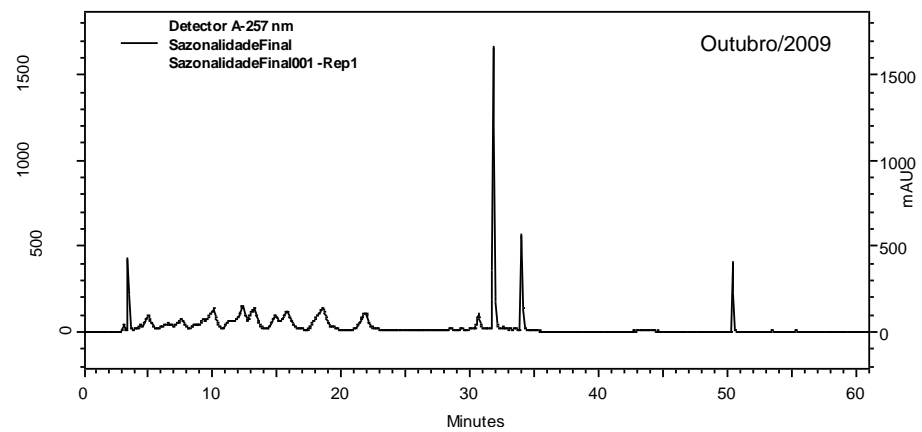
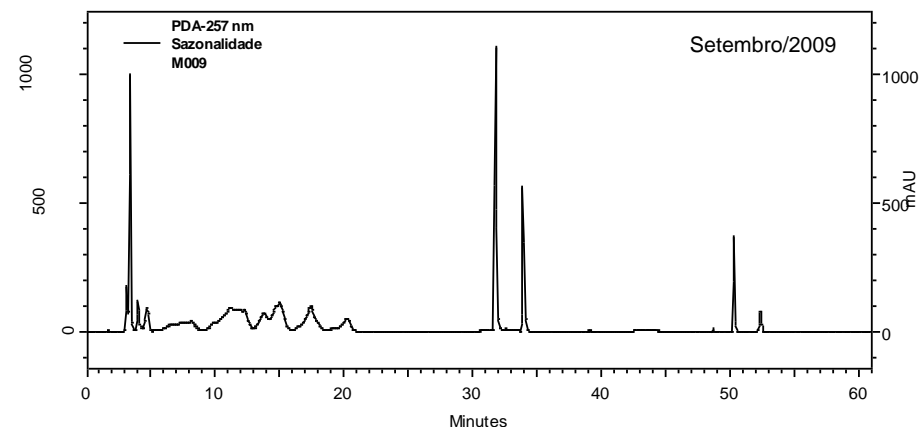
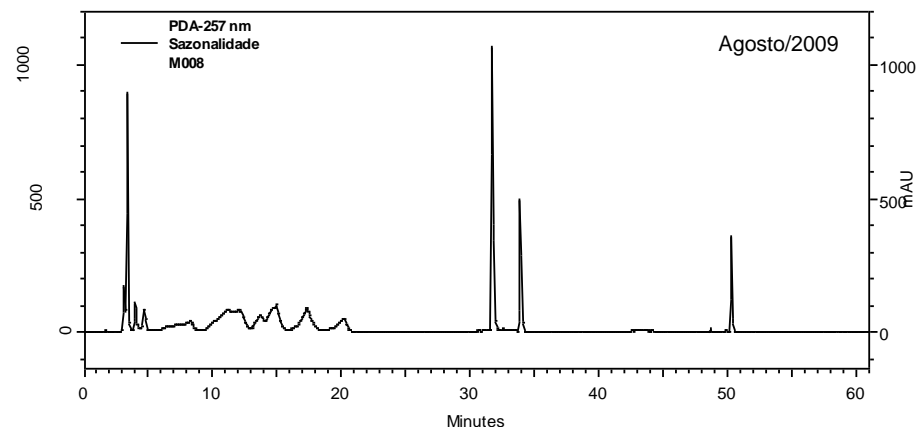
Figura 62: Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico das flores.



continua



continua



continua

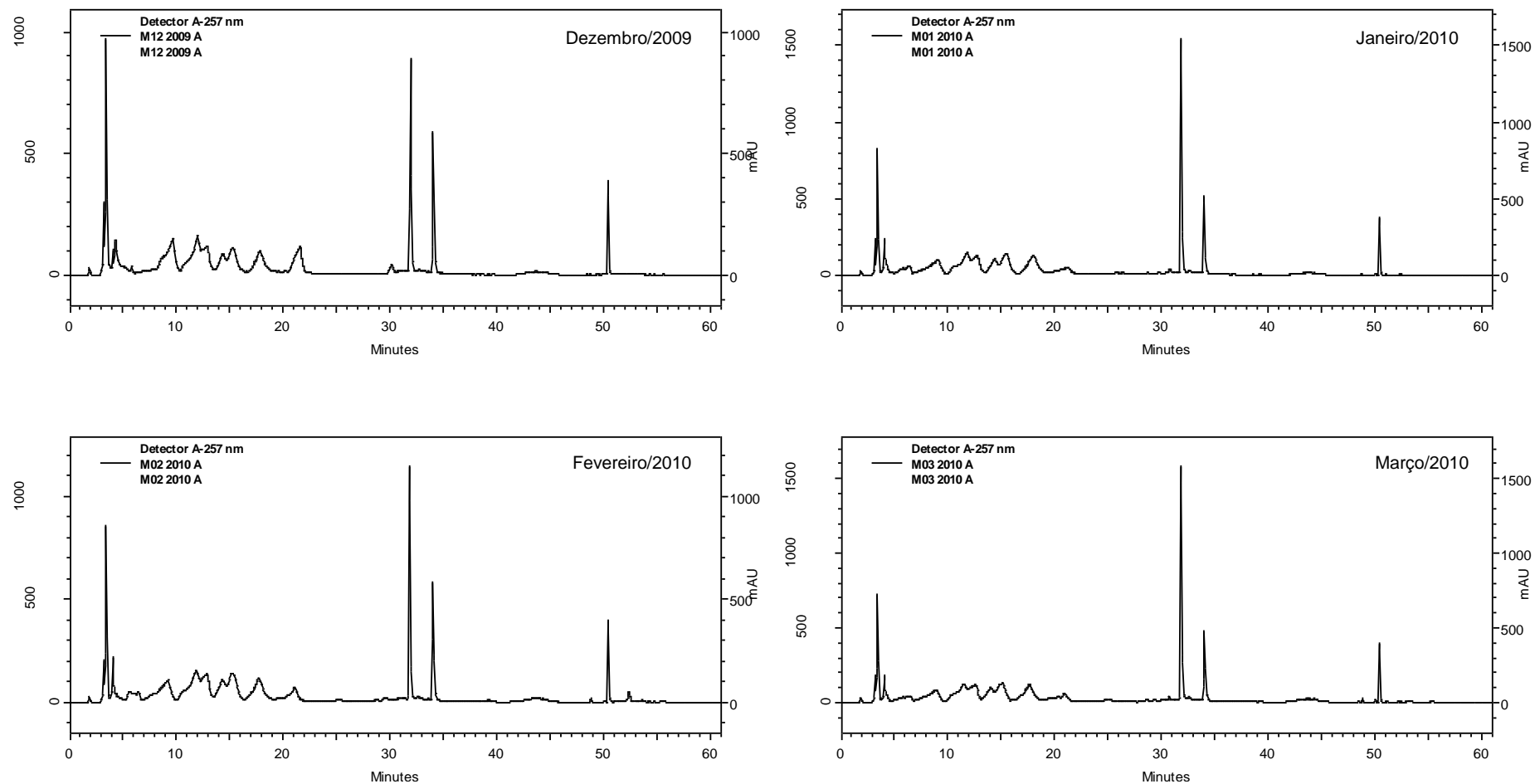


Figura 63: Perfis cromatográficos dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. langsdorffii* obtidos para o estudo sazonal. Tempo de retenção em 32 min. = quercitrina; em 34 min. = 3-O- α -ramnopiranosil-canferol; em 50 min. = benzofenona, pi.

Nota-se na figura 63 que os perfis qualitativos das amostras analisadas são bastante semelhantes, sendo que nos cinco minutos iniciais é possível detectar um pico, relativamente instável, não identificado, com característica polar. Logo em seguida detectam-se compostos polares, aparentemente minoritários, e a partir dos 30 minutos os flavonóis de interesse são detectados. Este padrão de detecção foi observado durante os 14 meses de análise.

Todos os cromatogramas foram apresentados, não somente para esclarecer confiavelmente os perfis qualitativos destes extratos, mas também para avaliar a aplicabilidade do método. Neste sentido, após todo o processo de validação, este método foi aplicado 42 vezes em distintos períodos de tempo. Nota-se que os perfis cromatográficos foram reprodutíveis, sendo possível detectar e/ou quantificar fidedignamente os flavonóis de interesse. Este fato reforça a qualidade dos parâmetros desempenho estudado na validação.

Quanto às análises quantitativas, estas foram realizadas por meio de curvas analíticas dos compostos padrões. Na figura 64 apresentam-se os perfis quantitativos para quercitrina e 3-O- α -ramnopiranosil-canferol durante o período de avaliação sazonal.

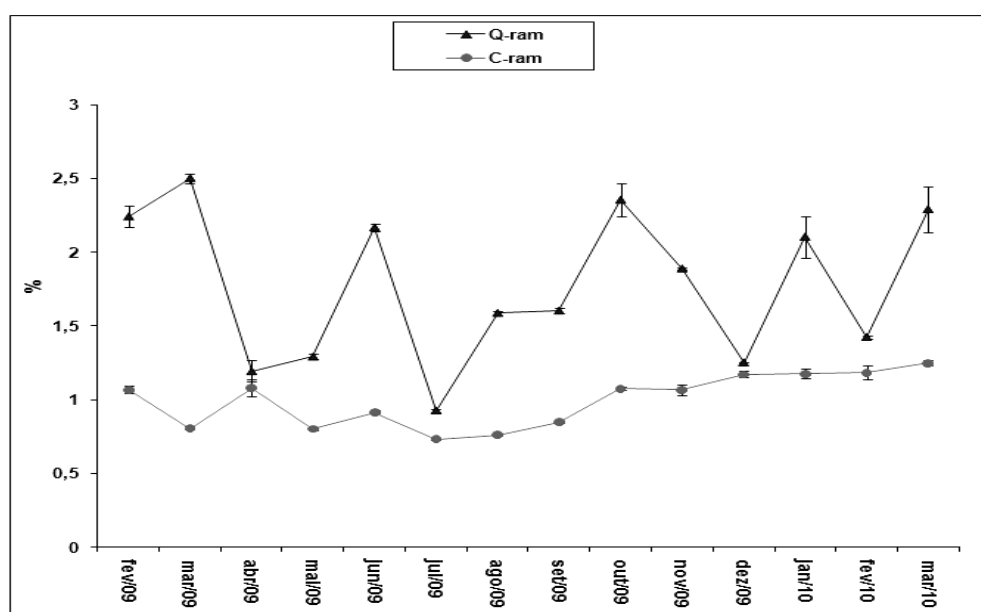


Figura 64: Análises quantitativas para quercitrina e 3-O- α -ramnopiranosil-canferol.

Avaliando-se a figura 64, nota-se que o teor de quercitrina em março de 2009 foi de 2,5% e em julho cerca de 1%. O teor médio para este flavonol, considerando os 14 meses, foi de 1,8%. Observa-se que o percentual de quercitrina variou ao longo do período de análise, mas esta variação sempre ficou na faixa de 1 a 2,5%. Quanto ao 3-O- α -ramnopiranosil-canferol, este não apresentou variações significativas com teor médio de 1% no mesmo período. Adicionalmente, relacionando as análises qualitativas e quantitativas, verifica-se que nos meses de abril, julho e dezembro, os teores de quercitrina e 3-O- α -ramnopiranosil-canferol são bastante semelhantes com média de 1%. Este fato também pode ser observado na análise qualitativa dos cromatogramas da figura 63, em que a intensidade de absorção dos picos (*mAU*) correspondentes a estes compostos são bem similares. Isto se deve à variação da quercitrina, já que o 3-O- α -ramnopiranosil-canferol mostrou-se mais estável ao longo das análises sazonais. Depois de 12 meses de avaliação, a quercitrina e 3-O- α -ramnopiranosil-canferol parecem manter os mesmos níveis médios de 1,8 e 1%, respectivamente. Dados que podem ser observados entre os meses de fevereiro e março de 2010.

Quercitrina e 3-O- α -ramnopiranosil-canferol podem ser encontrados em diferentes comestíveis, extratos de própolis e em outras fontes vegetais (ZHANG et al., 2008; KANG et al., 2009). Por isso, estes flavonóis são compostos alvos em diversos estudos (SMITH et al., 2006; JIANG et al., 2009). Neste estudo sazonal foi possível demonstrar que estes dois flavonóis podem ser detectados nas folhas de *C. langsdorffii* em qualquer época do ano, bem como os mesmos apresentam teores relativamente bons, considerando o metabolismo vegetal. Certamente, a pesquisa com a *C. langsdorffii* resultará na proposição de técnicas de cultivo visando à obtenção de biomassa em larga escala. Portanto, esta avaliação sazonal pode ser considerada um ponto de partida para a elaboração de novos trabalhos, visando enriquecer o conhecimento do gênero para, futuramente, sugerir a fabricação de novos produtos. Todas as fotos foram obtidas pelos autores do presente trabalho, sendo algumas auxiliadas pelo fotógrafo profissional Cássio, FCFRP-USP, para quem já registramos nossos agradecimentos.

IV – VALIDAÇÃO POR CG

4.7 Validação de método por CG-DIC

No projeto inicial, um dos objetivos foi o estudo químico comparativo envolvendo as frações voláteis obtidas das folhas e do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii*. Neste estudo, metodologias para análise e identificação dos principais compostos foram definidas. Durante a execução destas metodologias duas informações despertaram interesse: a quantidade da fração volátil obtida do óleo-resina foi bastante expressiva; três sesquiterpenos, α -copaeno, β -cariofileno e α -humuleno foram detectados em todas as amostras analisadas.

Sabe-se que o β -cariofileno se destaca como majoritário presente no óleo-resina extraído do tronco de copaíbas (PINTO et al., 2000). Este volátil também pode ser detectado em outros óleos obtidos de *Piper nigrum* L. (Piperaceae) (POLITEO; JUKI; MILO, 2006) e *Baccharis* spp. (Asteraceae) (MASSIGNANI et al., 2009). Uma variedade de atividades biológicas, incluindo anticâncer (Di SOTTO et al., 2010), anti-inflamatória (YOUNG et al., 2007) e antioxidante (KA et al., 2005) têm sido relatada para este sesquiterpeno. α -Copaeno, β -cariofileno e α -humuleno também são compostos alvos em distintos estudos, já que estes apresentam potencial anti-inflamatório (FERNANDES et al., 2007), antialérgico (PASSOS et al., 2007), antimicrobiano e inseticida (KOTAN et al., 2008).

A cromatografia de fase gasosa com detector por ionização de chama (CG-DIC) e/ou acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) são técnicas extensivamente utilizadas na caracterização de voláteis devido às propriedades de rapidez e alta eficiência (MERFORT, 2002). Recentemente, método validado por CG-DIC demonstrou a quantificação de E- β -farneseno e β -cariofileno a partir de formulação de liberação controlada (HEUSKIN et al., 2010). O óleo extraído das sementes de *C. langsdorffii* foi caracterizado por CG-DIC (STUPP et al., 2008). Veiga Jr et al. (2007) relatou a presença destes três sesquiterpenos (Figura 24) no óleo-resina de três diferentes espécies: *Copaifera multijuga*, *Copaifera*

cearensis e *Copaifera reticulata*. Estes autores demonstraram que o β -cariofileno foi o composto majoritário seguido pelo α -humuleno e α -copaeno, com diferentes quantidades para cada amostra. Portanto, considerando estes parâmetros, uma proposta de validação de método cromatográfico, para quantificar α -copaeno, β -cariofileno e α -humuleno, a partir de amostras disponíveis comercialmente foi adicionalmente estabelecida ao presente trabalho.

Importante ressaltar que o padrão de análise, levando em conta a validação para os sesquiterpenos e suas diferentes variáveis, foi similar ao descrito para os flavonóis, considerando o número de replicatas, estudos de linearidade e detecção, dentre os outros parâmetros de desempenho. Por isso, optou-se por ocultar alguns termos e/ou dados, evitando-se a repetição de informações.

Quanto à obtenção da amostra, hidrodestilação usando aparelho tipo Clevenger é o método oficial preconizado pela AOAC para obter óleos voláteis (ERTL, 1997). Diversos pesquisadores usam esta técnica para obtenção deste voláteis a partir de diferentes fontes vegetais (SILVA et al., 2005). Durante todos os estudos com relação ao preparo da amostra, foi observado que o rendimento de óleo volátil obtido do óleorresina variou entre 30 e 40% da composição total do óleo *in natura*. Assim, o procedimento de extração, utilizando-se hidrodestilação, foi otimizado usando-se alíquota representativa do óleorresina de copaíba (2 mL), 250 mL de água sob destilação por 30 minutos. Quatro aparelhos tipo Clevenger foram ligados em série visando obter as frações voláteis e suas replicatas com melhores eficiência e rapidez. Os rendimentos das frações voláteis obtidas dos óleos das amostras de *C. langsdorffii*, Santos Flora Comércio de Ervas e Vid Amazon Comércio e Indústria (lotes Nº 104-08 e Nº 107-08) foram medidos resultando em 0,8; 0,7; 0,7 e 0,6 mL, respectivamente. Estes parâmetros de rapidez e versatilidade, juntamente com o baixo custo, considerando todo o procedimento de obtenção da amostra são características importantes para as análises de rotina do óleorresina de copaíba ou de seus produtos.

β -Cariofileno, α -copaeno, e α -humuleno são compostos de baixa polaridade. Por isso, o solvente, hexano foi selecionado como agente diluente. 1, 2, 4, 5-Tetrametilbenzeno – TMB, octadecano, piperonal, veratraldeído, trimetóxi benzeno e benzofenona foram

avaliados como possíveis padrões internos - pi e secundários - ps. A escolha do TMB como pi e octadecano como ps atenderam todos os requisitos necessários, apresentando tempos de retenção que não interferem com os compostos da amostra e boa resposta de detecção. O ponto de ebulição médio dos três sesquiterpenos em análise é 145 °C. Assim, as temperaturas do injetor e detector, bem como o gradiente de temperatura programado para o forno foram adequadamente desenvolvidos com o propósito de atingir a separação ótima dos principais compostos em única análise. Três colunas capilares contendo fases estacionárias apolares: HP-1 empacotada com 100% de dimetilpolisiloxano, HP-5 e DB-5 ambas empacotadas com 5% de fenil-metilsiloxano foram avaliadas. A melhor resolução dos picos, a qual permitiu a quantificação dos principais sesquiterpenos nas amostras de copaíba, foi atingida conforme descrito na metodologia de desempenho com o tempo de análise de 21 minutos. É importante ressaltar que o método foi validado usando o aparelho CG-DIC Agilent Technologies-HP. Visando ampliar o conhecimento sobre a versatilidade analítica, mantendo-se os mesmo parâmetros cromatográficos, as amostras em questão também foram analisadas utilizando outro aparelho, CG/EM Shimadzu, no qual também foram obtidos bons resultados de resolução e separação dos compostos de interesse.

A **seletividade** do método foi determinada pela comparação do perfil cromatográfico dos padrões com aqueles obtidos para as amostras. Levando em conta o perfil cromatográfico dos padrões, os coeficientes de variação (CV%) para o fator de separação α , largura de base do pico e número de pratos teóricos também foi calculado (Tabela 21). Estes resultados foram considerados bons já que o CV máximo foi de 6,80%.

Tabela 21: Respostas que compõem a seletividade do método ($n = 5$).

	α	CV (%)	Wb	CV (%)	N	CV (%)
TMB (pi)	$1,97 \pm 0,004$	0,20	$0,02 \pm 0,0005$	2,94	443005 ± 26813	6,05
α -Copaeno	$1,20 \pm 0,001$	0,12	$0,03 \pm 0,0004$	1,38	656321 ± 21481	3,27
β -Cariofileno	$1,20 \pm 0,001$	0,12	$0,03 \pm 0,0005$	1,59	652877 ± 21306	3,26
α -Humuleno	$1,10 \pm 0,001$	0,08	$0,03 \pm 0,0009$	2,70	675429 ± 33039	4,90
Octadecano (ps)	$2,25 \pm 0,013$	0,60	$0,06 \pm 0,0021$	3,35	1012812 ± 68772	6,80

Fator de separação α ; número de pratos teóricos **N**; *width* largura de base do pico **Wb**. TMB: 1, 2, 4, 5-tetrametilbenzeno

O cromatograma da solução de padrões é apresentado na figura 65. A linha de base foi atingida na separação de todos os compostos, incluindo os padrões interno e secundário. Os perfis cromatográficos das frações voláteis das amostras de óleo de copaíba são apresentados nas Figuras 66A-D. Nota-se que a linha de base, considerando a separação dos sesquiterpenos β -cariofileno, α -copaeno, e α -humuleno, também foi atingida. Estes perfis cromatográficos mostraram boa resolução e foram bem reproduzidos uma vez que estes parâmetros foram avaliados em pelo menos 300 análises, durante o desenvolvimento deste método.

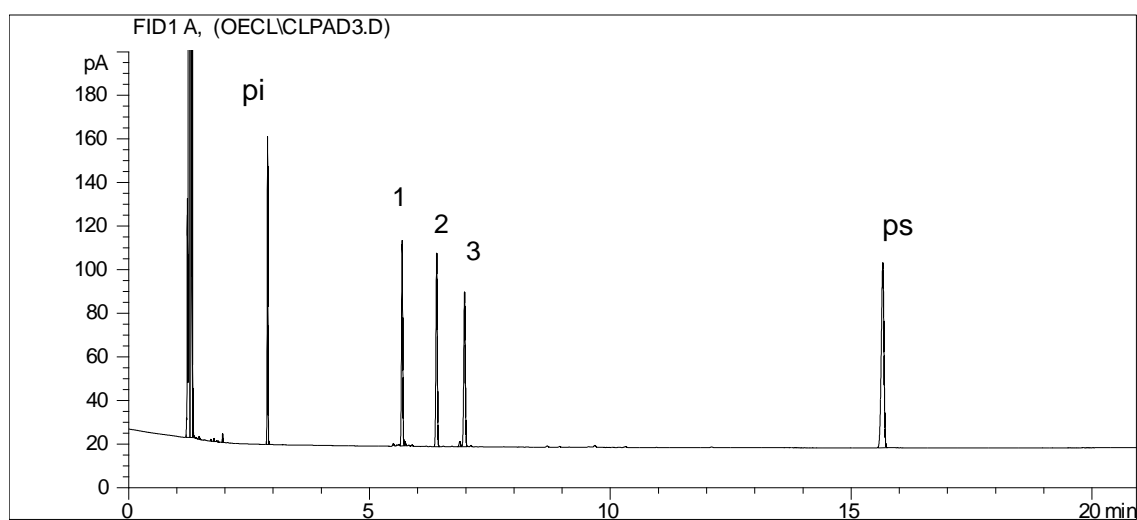


Figura 65: Perfil cromatográfico por CG-DIC dos compostos padrões. pi: 1,2,4,5-tetrametilbenzeno-TMB, 1: α -copaeno, 2: β -cariofileno, 3: α -humuleno, ps: octadecano.

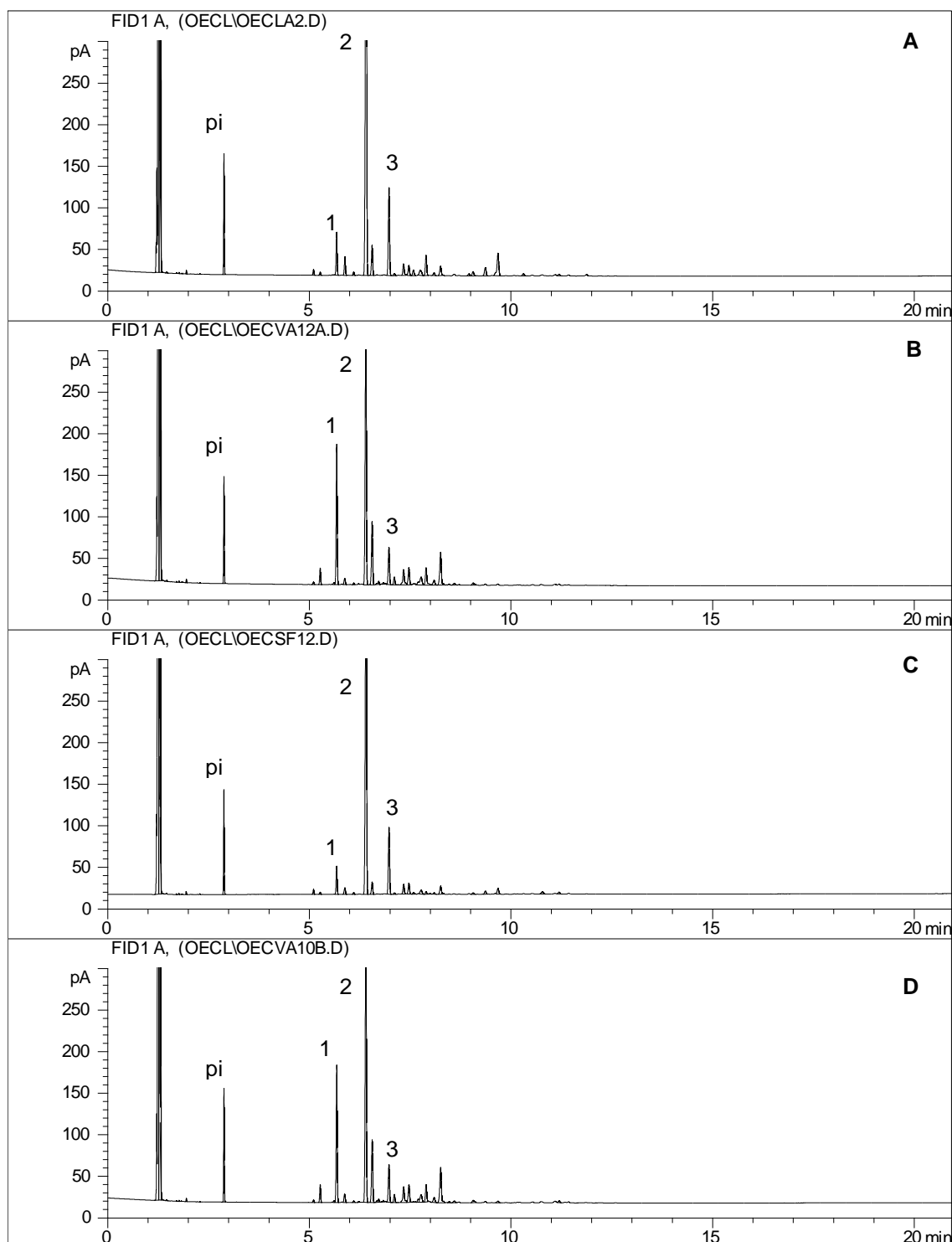


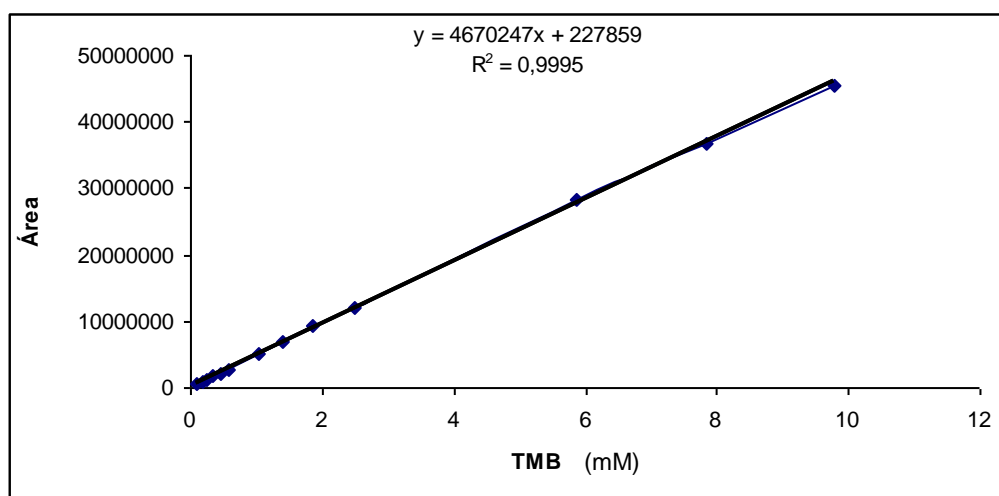
Figura 66: Perfil cromatográfico por CG-DIC de três frações voláteis obtidas do óleo de copaíba. **A:** Fração volátil da *C. langsdorffii*; **B:** Fração volátil Vid Amazon Comércio e Indústria Lote Nº 104-08; **C:** Amostra Santos Flora Comércio de Ervas e **D:** Vid Amazon Comércio e Indústria Lote Nº 107-08. pi: 1,2,4,5-tetrametilbenzeno-TMB, 1: α -copaeno, 2: β -cariofileno, 3: α -humuleno.

Os resultados listados na tabela 22 demonstram que a resposta de **linearidade**, para o método desenvolvido, foi adequada para todos os compostos usados como padrões. Visando à obtenção de dados de forma simples, sensível e reprodutível, a quantificação de β -cariofileno, α -copaeno, e α -humuleno foi realizada usando-se padronização interna. Observando-se os dados da tabela 22 nota-se que por meio da faixa linear dinâmica proposta, de 0,10 mM a 18,74 mM, é possível quantificar todos os compostos em estudo. Além disso, como pode ser observado na figura 67, os coeficientes de correlação r^2 foram maiores que 0,999.

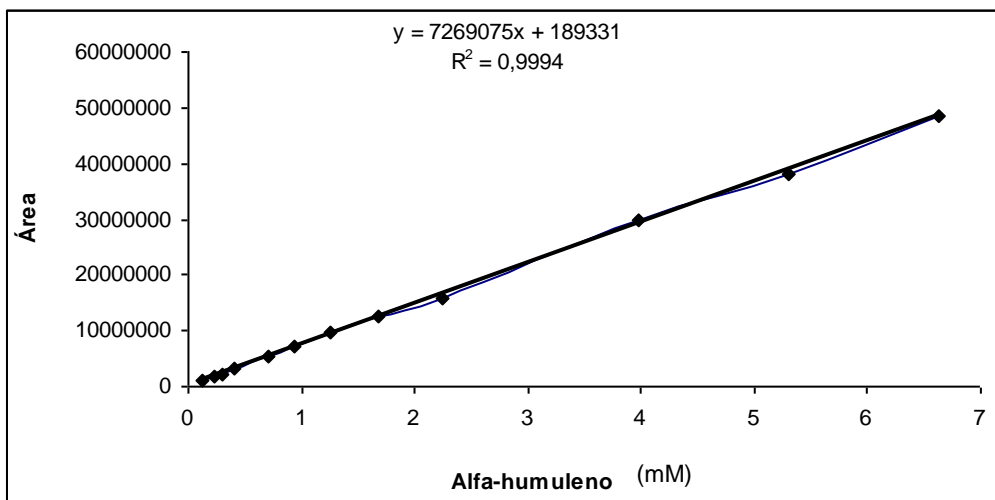
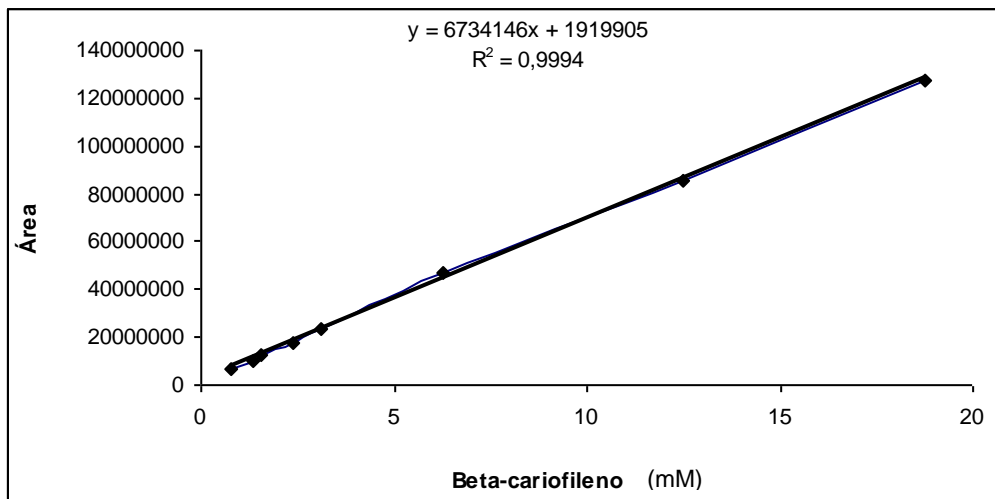
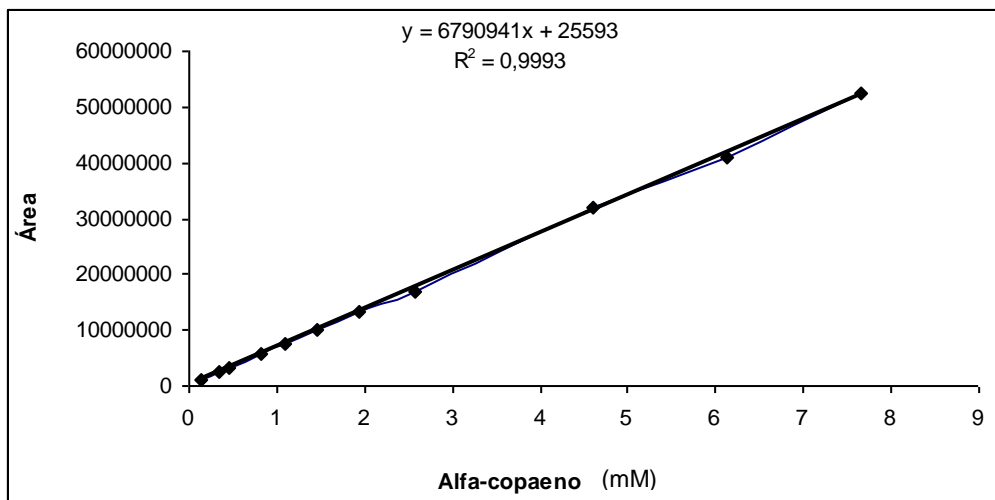
Tabela 22: Parâmetros das curvas analítica dos compostos em estudo ($n = 3$).

	FLD (mM)	Equações	r^2	n
TMB (pi)	0,10 – 9,80	$y = 4670247x + 227859$	0,9995	12
α -Copaeno	0,15 – 7,66	$y = 6790941x + 25593$	0,9993	11
β -Cariofileno	0,78 – 18,74	$y = 6734146x + 1919905$	0,9994	8
α -Humuleno	0,13 – 6,63	$y = 7269075x + 189331$	0,9994	11
Octadecano (ps)	0,10 – 10,53	$y = 9254815x + 700311$	0,9995	9

FLD = faixa linear dinâmica, r^2 = coeficiente de correlação. $y = ax + b$, em que, y : corresponde à área do pico, x : concentração em mM, a : coeficiente angular e b : coeficiente linear.



continua



continua

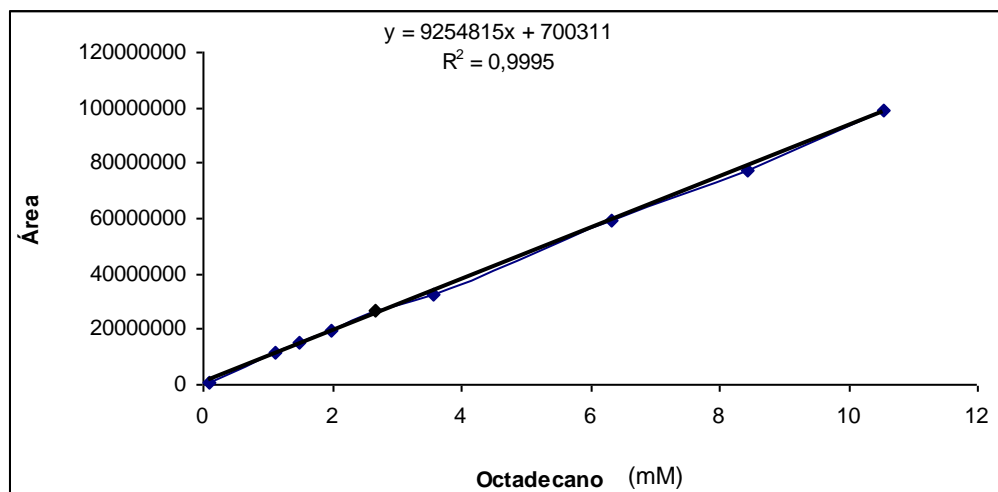
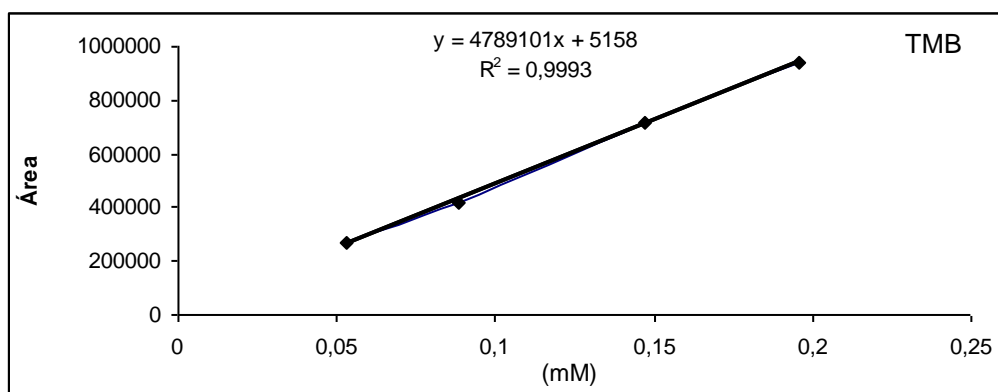


Figura 67: Curvas analíticas de todos os compostos em análise, obedecendo à faixa linear dinâmica, as quais foram obtidas pela escala logarítmica versus resposta relativa. (ver exemplo: método flavonóis)

Os limites operacionais de detecção (**LOD**) e quantificação (**LOQ**) foram determinados por meio da elaboração de curvas analíticas (Figura 68). A escala linear dinâmica variou entre 0,04 a 1,26 mM e os coeficientes r^2 oscilaram entre 0,9979 e 0,9995. Os resultados para LOD e LOQ foram entre 0,003 e 0,091 mM com valores de CV menores que 10% (Tabela 23). Estes valores permitem sugerir que este método é capaz de quantificar todos os compostos padrões, bem como detectar traços dos sesquiterpenos em diferentes amostras de óleo-resina de copaíba.



continua

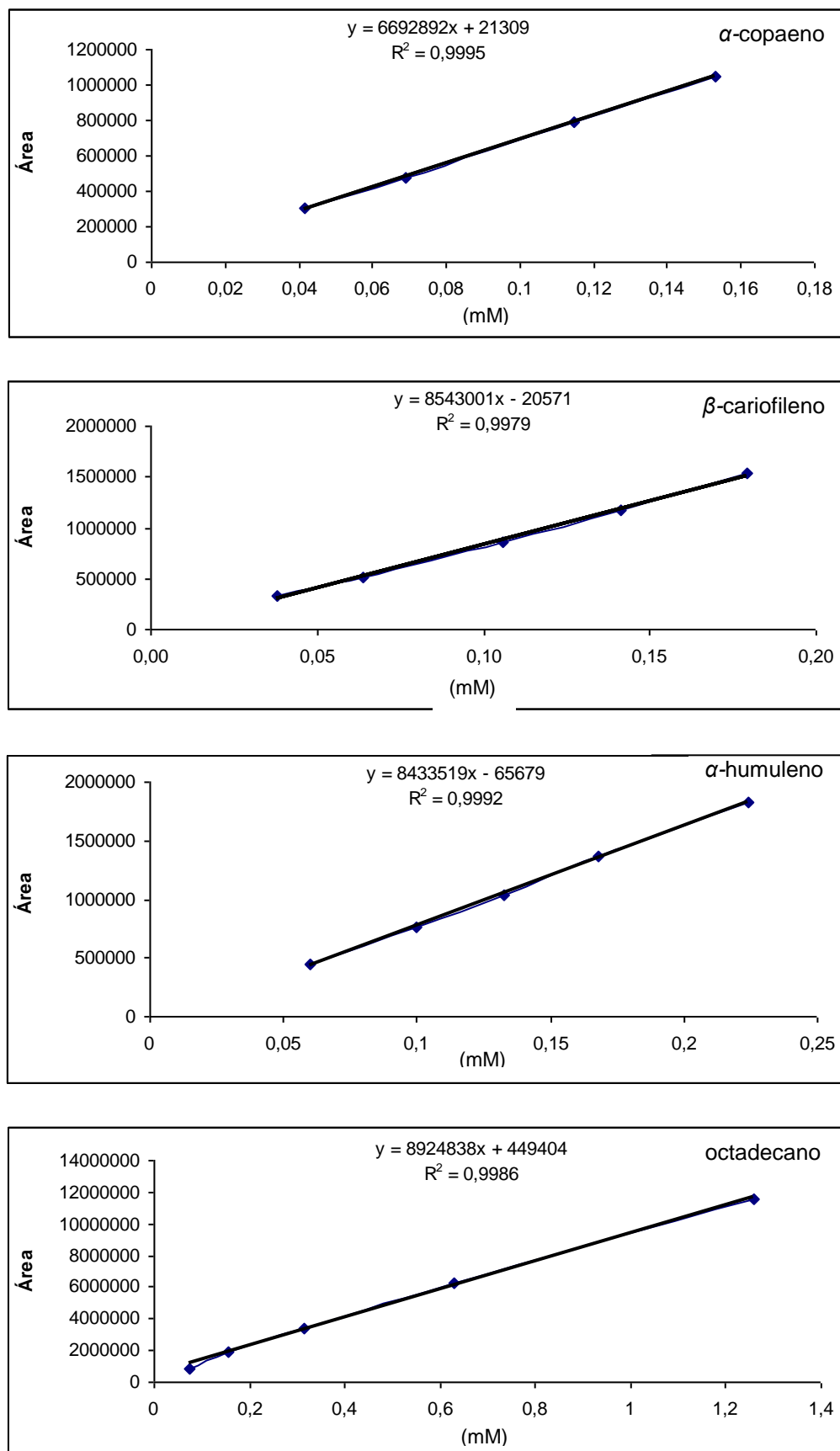


Figura 68: Curvas analíticas utilizadas na determinação de LOD e LOQ.

Tabela 23: Limites operacionais de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) ($n = 3$).

	Equações	FLD (mM)	r^2	LOD	LOQ	CV (%)*	n
TMB (pi)	$y = 4789101x + 5158$	0,05 – 0,20	0,9993	0,024	0,074	8,82	4
α -Copaeno	$y = 6692892x + 21309$	0,04 – 0,15	0,9995	0,009	0,028	6,30	4
β -Cariofileno	$y = 8543001x - 20571$	0,04 – 0,18	0,9979	0,003	0,008	5,75	5
α -Humuleno	$y = 8433519x - 65679$	0,06 – 0,22	0,9992	0,030	0,091	5,33	5
Octadecano (ps)	$y = 8924838x + 449404$	0,07 – 1,26	0,9986	0,028	0,085	7,40	5

FLD = faixa linear dinâmica, r^2 = coeficiente de correlação. $y = ax + b$, em que, y : corresponde à área do pico, x : concentração em mM, a : coeficiente angular e b : coeficiente linear. LOD e LOQ dados em mM. **CV (%)***: coeficiente de variação considerando os valores de LOQ.

A análise de **precisão** foi dada pela repetibilidade e precisão intermediária. Para repetibilidade os valores dos coeficientes de variação (CV) para o tempo de retenção foram entre 0,06 e 0,10%. Em relação à área do pico os resultados foram menores que 6,0%. Quanto à resposta concentração, o CV variou de 4,85 a 5,79%. No parâmetro precisão intermediária, para as respostas tempo de retenção, área do pico e concentração foram obtidas as seguintes variações 0,03-0,04%, 7,47-7,55% e 4,37-5,28%, respectivamente. Os resultados para análise da precisão listados na tabela 24 demonstram que o método desenvolvido atende a concordância das medições de uma mesma amostra sob diferentes variáveis.

Table 24: Precisão, recuperação e exatidão do método.

Precisão (n = 8)	TR	CV (%)	Área do Pico	CV (%)	Conc.	CV (%)
Repetibilidade						
α -Copaeno	5,7 \pm 0,006	0,10	30430458 \pm 1617189	5,29	4,25 \pm 0,21	4,95
β -Cariofileno	6,4 \pm 0,006	0,09	74339513 \pm 2987134	3,97	10,22 \pm 0,50	4,85
α -Humuleno	7,0 \pm 0,004	0,06	9798720 \pm 554883	5,64	1,25 \pm 0,07	5,79
Intermediária						
α -Copaeno	5,7 \pm 0,002	0,03	28552746 \pm 2140886	7,47	4,16 \pm 0,22	5,28
β -Cariofileno	6,4 \pm 0,002	0,04	71437916 \pm 5313455	7,50	10,20 \pm 0,44	4,37
α -Humuleno	7,0 \pm 0,003	0,04	9448821 \pm 710535	7,55	1,26 \pm 0,06	4,56
Recuperação e exatidão (n = 5).						
	CT (mM)	CR (mM)	Rec. (%) \pm DP	CV (%)	Erro (%)	
α-Copaeno						
Alta	2,20	1,82 \pm 0,13	82,92 \pm 5,96	7,19	-17,09	
Média	1,10	0,91 \pm 0,03	82,86 \pm 2,95	3,56	-17,14	
Baixa	0,45	0,39 \pm 0,02	86,43 \pm 4,71	5,45	-13,57	
β-Cariofileno						
Alta	11,09	8,30 \pm 0,58	74,71 \pm 5,21	6,98	-25,30	
Média	4,30	3,40 \pm 0,11	79,57 \pm 2,47	3,11	-20,42	
Baixa	2,10	1,67 \pm 0,10	79,65 \pm 4,52	5,68	-20,36	
α-Humuleno						
Alta	3,40	3,00 \pm 0,28	88,31 \pm 8,13	9,21	-11,69	
Média	1,70	1,46 \pm 0,07	86,15 \pm 3,88	4,51	-13,85	
Baixa	0,70	0,59 \pm 0,04	84,47 \pm 5,58	6,60	-15,53	
TMB (pi)	2,00	2,24 \pm 0,40	112,40 \pm 5,40	4,81	12,39	

TR = tempo de retenção; **Conc** = concentração em mM. **CT** = concentração teórica; **CR** = concentração real.

No que diz respeito aos estudos de **recuperação** e **exatidão**, os resultados apresentados na tabela 24 permitem inferir que por meio da técnica de hidrodestilação foi possível recuperar β -cariofileno, α -copaeno, e α -humuleno na escala de 74 a 88% com valores de CV menores que 10% e erro relativo entre -11 e -25%. Por isso, os resultados obtidos para estes dois parâmetros foram considerados satisfatórios. Adicionalmente, utilizando-se a padronização secundária, foi possível determinar a recuperação e exatidão para o pi TMB, as quais foram de 112% com CV de 4,8% e erro relativo de 12%. Os resultados em conjunto foram adequados à proposição do método.

No teste de **robustez**, avaliando os coeficientes de variação CV (%) para cada resposta estudada, considerando β -cariofileno, α -copaeno, e α -humuleno o fator temperatura do detector (**B**) foi sensível em relação às repostas área do pico, altura do pico e concentração com valores médios de 17%. A variável divisor de amostra (**C**) apresentou média de 14% considerando a resposta concentração. A vazão de gás H₂ (**D**) e a temperatura inicial do forno (**E**) foram suscetíveis quanto à resposta tempo de retenção com média de 12% e 14%, respectivamente. Todos os outros valores, avaliando fatores e repostas ficaram abaixo de 10% (Tabela 25). De um modo geral, levando em conta o desenho experimental, estes valores podem ser aceitáveis (RIBANI et al., 2004). Por isso o método pode ser considerado robusto e está adequado ao uso em diferentes laboratórios.

A legislação brasileira sobre medicamentos fitoterápicos exige que os produtos devam ser padronizados quimicamente e os parâmetros de eficácia e segurança para o uso humano devem apresentar sólida base científica (CALIXTO, 2005). Validação de método e a padronização química do óleoresina de copaíba são claramente importantes, já que a composição química deste óleo está relacionada com suas atividades biológicas (CASCON; GILBERT, 2000).

Table 25: CV (%) obtidos para o teste de robustez do método cromatográfico ($n = 3$).

	Área do Pico	TR	Altura do Pico	Conc.
α-Copaeno				
A Temperatura do injetor °C	3,79	0,36	2,96	0,88
B Temperatura do detector °C	17,76	0,01	16,83	16,58
C <i>Split</i> (divisor de amostra)	7,70	0,36	6,95	14,13
D Vazão de gás H ₂ (mL/min)	5,17	12,12	9,13	8,94
E Temperatura inicial do forno °C	1,75	15,09	4,89	1,10
F Temperatura final do forno °C	1,95	0,33	1,57	0,47
G Vazão de gás N ₂ (mL/min)	2,49	0,22	2,17	5,52
β-Cariofileno				
A Temperatura do injetor °C	3,70	0,36	2,43	0,83
B Temperatura do detector °C	17,77	0,05	16,21	17,01
C <i>Split</i> (divisor de amostra)	7,94	0,36	7,73	14,73
D Vazão de gás H ₂ (mL/min)	5,21	12,08	8,92	9,16
E Temperatura inicial do forno °C	2,13	14,09	4,42	1,52
F Temperatura final do forno °C	1,80	0,33	1,67	0,62
G Vazão de gás N ₂ (mL/min)	2,53	0,21	2,54	5,64
α-Humuleno				
A Temperatura do injetor °C	3,77	0,35	2,96	0,87
B Temperatura do detector °C	17,24	0,04	16,95	16,46
C <i>Split</i> (divisor de amostra)	7,92	0,35	6,43	14,65
D Vazão de gás H ₂ (mL/min)	3,62	11,96	9,37	7,51
E Temperatura inicial do forno °C	3,19	13,45	5,00	2,57
F Temperatura final do forno °C	1,54	0,32	1,40	0,90
G Vazão de gás N ₂ (mL/min)	2,42	0,21	3,48	5,74

Nesta validação, β -cariofileno, α -copaeno, e α -humuleno presentes em amostras de óleorresina de copaíba foram determinados usando-se método cromatográfico por CG-DIC. Os resultados estão listados na tabela 26 e cromatogramas representativos destas amostras são apresentados na figura 66 A-D.

O conteúdo de α -copaeno, β -cariofileno e α -humuleno nas quatro amostras analisadas foram entre 0,93-4,40 mM, 10,48-19,47 mM e 1,30-2,56 mM, respectivamente. A

quantificação destes sesquiterpenos também foi realizada a partir do óleorresina *in natura* e óleo essencial obtido das folhas de *C. langsdorffii*. Nesta quantificação novamente o β -cariofileno se destacou com concentrações próximas a 16 mM no óleorresina e 7 mM no óleo da folhas (Tabela 26). Todos os parâmetros de desempenho como seletividade, linearidade, LOD, LOQ, precisão, recuperação, exatidão e robustez, avaliados nesta validação apresentaram resultados satisfatórios, permitindo a quantificação fidedigna dos três sesquiterpenos em distintas amostras de copaíba.

Tabela 26: Quantificação dos sesquiterpenos em distintos óleos de copaíba disponíveis comercialmente ($n = 3$).

Amostras	α -Copaeno (mM)	CV (%)	β -Cariofileno (mM)	CV (%)	α -Humuleno (mM)	CV (%)
1	1,12 \pm 0,03	2,69	19,47 \pm 0,53	2,73	2,56 \pm 0,07	2,59
2a	4,24 \pm 0,06	1,44	10,48 \pm 0,17	1,66	1,33 \pm 0,03	2,62
2b	4,40 \pm 0,05	1,04	10,59 \pm 0,15	1,46	1,30 \pm 0,03	2,09
3	0,93 \pm 0,01	1,40	18,47 \pm 0,33	1,79	2,51 \pm 0,05	2,03
4	0,82 \pm 0,03	3,88	15,74 \pm 0,70	4,43	2,05 \pm 0,10	5,06
5	0,55 \pm 0,01	1,46	6,37 \pm 0,10	1,64	0,86 \pm 0,02	1,86

1: fração volátil obtida do óleorresina da *C. langsdorffii*;

2: fração volátil obtida do óleorresina comercializado pela Vid Amazon Comércio e Indústria (a: lote N° 104-08; b: lote N° 107-08);

3: fração volátil obtida do óleorresina comercializado pela Santos Flora Comércio de Ervas;

4: óleorresina *in natura* da *C. langsdorffii*;

5: fração volátil obtida a partir das folhas de *C. langsdorffii*.

O desenvolvimento de métodos bem validados para analisar amostras de copaíba é muito importante devido à escassez de métodos validados na literatura. Neste sentido, Cascon e Gilbert (2000) divulgaram a quantificação relativa de terpenóides no óleorresina de três espécies de *Copaifera* utilizando CG/EM. Para tanto, o óleo *in natura* foi esterificado com diazometano e éter, sendo as amostras analisadas diretamente por CG/EM.

Muito importante ressaltar, que a produção do óleo de copaíba superou 500 toneladas em 2008, considerando somente três estados da região Amazônica, sendo que o estado do Amazonas foi responsável por mais de 90% desta produção (IBGE, 2008). Por isso, no Brasil este óleo tem sido comercializado na forma de óleo cru, cápsulas, pomadas, sabonetes, dentre outros produtos. Além disso, estes produtos frequentemente são exportados para Inglaterra, França, Alemanha e Estados Unidos da América (VEIGA JR; PINTO, 2002). Portanto, nós consideramos que este método contribuirá para assegurar a qualidade, não somente do óleoresina *in natura*, bem como de seus produtos.

4.8 Considerações finais

A nefrolitíase é um distúrbio comum, a qual afeta grande parcela da população. O impacto econômico da morbidade decorrente de cálculos renais ultrapassa US\$ 2 bilhões por ano, além do sofrimento que causa aos pacientes. O tratamento geralmente é invasivo e apresenta diferentes efeitos adversos e alto custo para a sociedade. Além disso, até o presente, não há no mercado medicamentos por via oral que sejam capazes de dissolver os cálculos urinários.

No laboratório de farmacognosia da FCFRP-USP vêm sendo desenvolvidas há cerca de quatro anos, pesquisas com as partes aéreas de *C. langsdorffii* para o tratamento da litíase renal. Neste sentido, Brancalion, (2010) investigou a atividade antilitiásica *in vivo* do extrato hidroalcoólico das folhas desta espécie. Nestes estudos foram demonstrados que os cálculos retirados dos animais sem qualquer tratamento apresentavam rígidos e em maior número, enquanto àqueles retirados dos animais tratados com o extrato apresentavam-se com substancial porosidade, quebradiços e em menor número (BRANCALION, 2010).

Diante destas informações, tornou-se importante investigar a composição química das partes aéreas da *C. langsdorffii*. O trabalho foi iniciado pela revisão bibliográfica na qual se demonstrou que o óleoresina obtido de copaíbas é rico em sesquiterpenos e diterpenos e amplamente utilizado na medicina popular para diferentes fins. Foram encontrados poucos

estudos relativos às partes aéreas de copaíbas. Considerando estes fatores, o fracionamento do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii* foi realizado, resultando no isolamento de sesquiterpeno, diterpenos e flavonóis. Além disso, neste extrato também foram detectados compostos voláteis comuns ao óleo-resina e uma fração rica em compostos polares. Visando ampliar o conhecimento fitoquímico da espécie, o estudo comparativo envolvendo as principais matrizes, tais como óleo-resina, frações voláteis, extratos obtidos das folhas, flores e frutos, foi proposto. De um modo geral, as composições químicas destas amostras foram consideradas semelhantes. Adicionalmente, em análise preliminar, os extratos das partes aéreas foram avaliados quanto às atividades antimicrobiana e antiparasitária (**Apêndices 26 - 28**). Considerando os resultados destas atividades, bem como novos estudos sobre a atividade antiliteiásica, sugere-se que estas atividades sejam reavaliadas utilizando-se os principais compostos puros divulgados no presente trabalho.

Ao longo do estudo fitoquímico, por um lado, foi observado que a quantificação dos flavonóis majoritários poderia ser considerada como marcadores da qualidade dos extratos das folhas, uma vez que estes flavonóis foram detectados nestes extratos durante toda época do ano conforme descrito nos estudos sazonais. Por isso, o método por CLAE foi desenvolvido e validado. Por outro lado, verificou-se que a quantificação de sesquiterpenos poderia assegurar a qualidade das frações voláteis e do óleo-resina. Portanto, método por CG também foi desenvolvido e validado. O método validado por CLAE poderá ser otimizado e revalidado considerando a adição de novos padrões. Diterpenos foram encontrados em todas as amostras estudadas. Portanto, certamente, outra forma de sugerir a avaliação da qualidade destas amostras poderia ser pela proposição de método cromatográfico, no qual em única análise seria possível quantificar, por exemplo, um sesquiterpeno e um derivado de cada classe, representando os esqueletos diterpênicos dos cauranos, clerodanos e labdanos.

Logo após esta validação, amplo estudo sazonal poderia ser efetuado no sentido de avaliar amostras de, praticamente, todo território brasileiro. Desta forma, o comportamento

qualitativo e quantitativo de sesquiterpenos e diterpenos detectados em diferentes espécies de *Copaifera*, originárias de diferentes regiões brasileiras poderia ser fielmente determinado. O conjunto destes dados poderia favorecer a proposição de melhores técnicas de cultivo da espécie resultando na obtenção de matéria-prima de melhor qualidade e com manejo sustentável. Todas estas características funcionando sequencialmente dentro de parâmetros aceitáveis aumentariam as chances de se obterem produtos com altos níveis de segurança e qualidade. A obtenção destes produtos, certamente, favoreceria toda a cadeia produtiva, bem como preservaria a espécie e o meio-ambiente.

5. Conclusões

As composições químicas das amostras de *C. langsdorffii*, óleorresina, extratos obtidos das folhas, flores e frutos, foram investigadas. Por meio desta investigação foi possível isolar e identificar 13 compostos. Nas análises das frações voláteis identificaram-se 12 sesquiterpenos:

- α -Copaeno, β -cariofileno, α -humuleno e óxido de cariofileno podem ser considerados os principais compostos voláteis presentes no óleorresina. No óleo essencial das folhas destacam-se também o δ -cadineno, germacreno D; biciclogermacreno; germacreno B e α -cadinol;
- O ácido caurenóico demonstrou ser um importante diterpeno, já que o mesmo foi isolado e identificado a partir de todas as amostras em estudo;
- O ácido copálico é considerado marcador químico no óleorresina. Nesta amostra, os derivados ácidos como 3-acetóxi-copálico, agático e 3-hidróxi-copálico, bem como o caurenol parecem ser recorrentes;
- O fracionamento dos extratos obtidos das folhas, flores e frutos também resultou no isolamento de labdanos: ácidos *ent*-labda-7,13-dien-15-óico e 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-óicos; flavonóis: 3-O- α -ramnopiranosil-quercetina e 3-O- α -ramnopiranosil-canferol e no derivado éter: éter 2-hidróxifenilvinil etílico;
- A reação de derivatização com reagente diazometano foi eficiente. Por meio desta reação foi possível melhorar o perfil de separação de algumas amostras, obtendo-se os seguintes derivados metilados: caurenato de metila, 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-oato de metila e o 4-metóxi-cinamoato de etila. Os dois derivados diterpenos metilados são resultantes do ácido caurenóico e 2-hidróxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-óicos, respectivamente. O derivado metilado 4-metóxi-cinamoato de etila, certamente confirma a presença do 4-hidróxi-cinamoato de etila na planta.

O método por CLAE quantifica, adequadamente, cinco derivados flavonóis, rutina, 3-O- α -ramnopiranosil-quercetina, 3-O- α -ramnopiranosil-canferol, quercetina e canferol. Este método apresentou recuperação média de 97% e escala de linearidade variando entre 10,32 a 1000 $\mu\text{g/mL}$. Na avaliação da seletividade, LOD, LOQ, exatidão, precisão e robustez os resultados obtidos foram satisfatórios. Por meio deste método, os extratos hidroalcoólicos das folhas e de outras partes da planta podem ser qualificados.

Na avaliação sazonal da *C. langsdorffii*, foi possível observar algumas características como o período de florescimento, queda de folhas velhas, crescimento de folhas jovens e a presença de frutos e sementes. As análises qualitativas sazonais dos extratos hidroalcoólicos indicaram a presença de 3-O- α -ramnopiranosil-quercetina e 3-O- α -ramnopiranosil-canferol durante o período de fevereiro de 2009 a março de 2010. Nas análises quantitativas, considerando o mesmo período, estes dois flavonóis apresentaram teores médios de 1,8 e 1,0 %, respectivamente. Durante este período de análise, o método por CLAE foi aplicado 42 vezes em distintas épocas do ano. Os perfis cromatográficos foram reprodutíveis, sendo possível detectar e/ou quantificar fidedignamente os flavonóis de interesse.

O método desenvolvido por GC-DIC é confiável para a quantificação de α -copaeno, β -cariofileno, α -humuleno em óleo de copaíba. Os valores obtidos para os parâmetros de validação tais como: seletividade, linearidade, LOD, LOQ, exatidão, precisão e recuperação foram aceitáveis. A proposta de teste de robustez permitiu a avaliação simultânea de sete variáveis para o método cromatográfico. Portanto, este método pode ser considerado adequado para ser utilizado no controle de qualidade de óleos de copaíba.

6. Referências

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography Quadupole Mass Spectroscopy**. Illions, USA: Allures Publishing Coorporation, 451 p., 2001.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. 1 ed. The Netherlands, Elsevier, p. 336-337, 1989.
- ALENCAR, J. C. Estudo silviculturais de uma população de Copaifera multijuga Hayne-Leguminosae, na Amazônia Central – Produção de óleorresina. **Acta Amazônica**. v. 1, p. 75-89, 1982
- AMBROSIO, S.R.; TIRAPELLI, C.R.; COUTINHO, S.T.; DE OLIVEIRA, D.C.R.; DE OLIVEIRA, A. M.; DA COSTA, F.B. Role of the carboxylic group in the antispasmodic and vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 1407-1413, 2004.
- AMBROSIO, S.R.; TIRAPELLI, C.R.; DA COSTA, F.B.; DE OLIVEIRA, A.M. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the Viguiera species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Science**, v. 79, p. 925-933, 2006.
- ANDRADE Jr, M. A.; FERRAZ, I. D. K.; VEIGA Jr, V. F. **51º Congresso Nacional de Botânica da Sociedade Botânica do Brasil**, Brasília, Brasil, 2000.
- ANVISA – **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução – RE nº 899, 29 de maio de 2003.
- ARAÚJO-JUNIOR, F.A.; BRAZ, M.N.; ROCHA-NETO, O.G.; D'ALMEIDA COSTA, F.; BRITO, M.V.H. Copaiba oil effect in rats aminotransferases submitted to hepatic ischemic and reperfusion with and without preconditioning. **Acta Cirurgica Brasileira** v. 20, p. 93–99 2005.
- ASEN, S.; HOROWITZ, R. M. 2"-O-acetylquercitrin from azalea flowers. **Phytochemistry**, v. 16, p. 147-148, 1977.
- AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P.; RIEDO, C. R. F. **Análise quantitativa por cromatografia**. Disponível em: <http://www.chemkeys.com>. 10 p., 2003. Acessada em janeiro de 2011.
- AVEDA CORPORATION. Stanley R. Foog, Roland T. Kapsner, Peter Matravers. **Methods of coloring hair or eyelashes with compositions wich contain metal containing pigments and a copiba resin**. US 6045589, 04 abril 2000.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, J. M.; AGUIAR, I. B.; SANTOS, S. R. G. **2º Congresso Nacional de Essências Nativas**, Brasília, Brasil, 1992.

BATISTA, R.; HUMBERTO, J.L.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A.B. Synthesis and trypanocidal activity of ent-kaurane glycosides. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 381-391, 2007.

BAUER, R.; TITTLEL, G. Quality assessment of herbal preparations as a preconization of pharmacological and clinical studies. **Phytomedicine**, v.2, p. 93-198, 1996.

BOHLIN, L.; BRUHN, J.G. **Bioassay methods in natural product research and drug development**. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, v. 43. Kluwer Academic, Dordrecht 1999.

BRAGA, W. F.; REZENDE C. M.; ANTUNES, A. C.; PINTO, A. C. Terpenoids from *Copaíba cearensis* of *Copaifera* species. **Phytochemistry**, v. 49 p. 263-264, 1998.

BRANCALION, A. P. S. **Estudo fitoquímico e investigação da atividade antiliteásica do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Copaifera langsdorffii***. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 82 p., 2010.

BRITO, M.V.H.; MOREIRA, R.J.; TAVARES, M.L.C.; CARBALLO, M.C.S.; CARNEIRO, T.X.; SANTOS, A.A.S. Copaiba oil effect on urea and creatinine serum levels in rats submitted to kidney ischemia and reperfusion syndrome. **Acta Cirurgica Brasileira** v. 20, p. 243–246, 2005.

BRUNETON, J.; **Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie**, Lavoisier, Paris, 585 p., 1987.

BUCKERIDGE, M.S.; ROCHA, D.C.; REID, J.S.G.; DIETRICH, S.M.C. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savanna and forest populations. **Physiologia Plantarum**, v.86, p.145-151, 1992

CALIXTO J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-135, 2005.

CANUTO, K. M. **Aspectos Químicos do Estudo Interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de *Amburana cearensis* A.C. Smith**. Tese (Doutorado) Centro de Ciências/Depto de Química Orgânica e Inorgânica. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – CE, 303 p., 2007.

CARVALHO, J.C.T.; CASCON, V.; POSSEBON, L.S.; MORIMOTO, M.S.S.; CARDOSO, L.G.V.; KAPLAN, M.A.C.; GILBERT, B. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research** v. 19, p. 946–950, 2005.

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 p. 773-778, 2000.

CHOI, H.-S. Character impact odorants of citrus hallabong [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 2687-2692, 2003.

CHUNG, T.Y.; EISERICH, J.P.; SHIBAMOTO, T. Volatile compounds isolated from edible Korean chamchwi (*Aster scaber* Thunb). **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 41, p. 1693-1697, 1993.

CLARIDGE, T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. Pergamon, Amsterdam, 1999.

CLEMENT, R. E. **GAS Chromatography: Biocchemical, Biomedical and Clinical applications**. Ed. John Wiley and Sons, Inc. Nova York. 393 p., 1990.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P.A.M.; VIANA, G.S.B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V.; RAO, V.S.N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicol.** v. 40, p. 1231-1234, 2002.

DA COSTA, F.B.; VICHNEWSKI, W.; HERZ, W. Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspilioides* with trypanomicidal activity. **Planta Medica**, v. 62, p. 557-559, 1996.

DENG, G.; SANYAL, G. Applications of mass spectrometry in early stages of target based drug discovery. **Journal Pharmacology Biomedicine Analysis**, v. 40, p. 528-538, 2006.

de RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W.M.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U.A. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v.1112, p. 31-63, 2006.

DICKISON, W.C. **Integrative Plant Anatomy**. Harcourt Academic Press, San Diego, 2000

DI SOTTO, A.; MAZZANT, G.; CARBONE, I. F.; HRELIA, P.; MAFFEI F. Inhibition by *trans*-caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes, **Mutation Research Genetics Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 699, p. 23-28 2010.

DJERASSI, C.; MARSHALL, D. Optical rotator dispersion studies – XII: absolute configuration of eperuic and labdanolic acids. **Tetrahedron**, v. 1, p. 238-240, 1957.

EIRA, M.T.S.; SALOMÃO, A.N.; CUNHA, R. DA; MELLO, C.M.C. DE; TANAKA, D.M. Conservação de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. Leguminosae. In: **2º Congresso Nacional sobre Essências Nativas**. CENARGEN/EMBRAPA, Brasília. p. 523-526, 1992.

ERTL, F. Procedure modification of AOAC official method 962.17, volatile oils in spices. **Journal of the AOAC International**, v. 80, p. 901-910, 1997.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte II. São Paulo, Atheneu, 1988

FEINBERG, M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 174-183, 2007.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds α -humulene and β -caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*, **European Journal of Pharmacology** v. 569, p. 228-236, 2007.

FRANCO, T. T.; RODRIGUES, N. R.; SERRA, G. E.; PANEGASSI, V. R.; BUCKERIDGE, M. S. Characterization of storage cell wall polysaccharides from Brazilian legumes seeds and the formation of aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**. v. 680, p. 255-261, 1996.

FULLBECK, M.; MICHALSKY, E.; DUNKEL, M.; PREISSNER, R. Natural products: sources and databases. **Natural Products Report**, v. 23, p. 347-356, 2006.

GAO, J.; MEDINA-SANCHEZ A.; PENDRY B.A.; HUGHES M.J.; WEBB G.P.; CORCORAN O. Validation of a HPLC method for flavonoid biomarkers in skullcap (*Scutellaria*) and its use to illustrate wide variability in the quality of commercial tinctures. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 11, p. 77-87, 2008.

GEROLANO, D. Q.; GIMENES, J. Q. **Pomada de Copaíba**. Patente BR8605738, 28 junho 1988.

GILBERT, B.; TEIXEIRA, D.F.; CARVALHO, E.S.; DE PAULA, A.E.; PEREIRA, J.F.; FERREIRA, J.L.; ALMEIDA, M.B.; MACHADO R, S.; CASCON, V. Activities of the pharmaceutical technology institute of the Oswaldo Cruz Foundation with medicinal, insecticidal and insect repellent plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v. 71, p. 265–271, 1999.

GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity of Amazonian copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**. v.12, p. 486–492, 2007.

GOWICK, P. The validation of methods for regulatory purposes in the control of residues. **Journal of Chromatography A**. v. 1216, p. 8051-8158, 2009.

GRAMOSA, N.V.; BRIGIDO, C.L.; SILVEIRA, E.R. **Contribuição ao conhecimento químico do óleo de Copaíba do Ceará**. VII Encontro de Químicos e Farmacêuticos Industriais do Norte-Nordeste, Fortaleza, Brasil, 2001.

GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of *Copaifera langsdorffii* from the Brazilian northeast. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p.130-132, 2005.

HARGER, C. A. **Tratamento de hemorróidas, com óleo vegetal extraído de plantas da espécie das copaíferas (copaíba)**. Patente BR8203234, 09 maio 2002.

HAYASE TOMOKO; RIFUSE KK; DAIHO KORYO KK; SUZUKI YUSHI KOGYO KK. Komai Koichiro, Hayase Tomoko, Hayase Manabu, Miiwita Masayasu, Sakuri Osamu, Kuroki Osamu, Miziguchi Masaaki. **Sanitary insect pest repellent of natural essential oil and application thereof**. Patente JP 2004099535, 02 abril 2004.

HAYASE TOMOKO; RIFUSE KK; SUZUKI YUSHI KOGYO KK. Komai Koichiro, Hayase Tomoko, Hayase Manabu, Miiwita Masayasu, Kuroki Osamu, Miziguchi Masaaki. **Repellent active sustained release porous fine particle and use thereof**. Patente JP 2002308705, 23 outubro 2002.

HEUSKIN, S.; ROZET, E.; LORGE, S.; FARMAKIDIS, J.; HUBERT, P.; VERHEGGEN, F.; HAUBRUGE, E.; WATHELET, J.P.; LOGNAY, G. Validation of a fast gas chromatographic method for the study of semiochemical slow release formulations, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v.53, 962–967, 2010.

HEYDEN, V.Y.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.G.M.; MASSART, D.L. Guidance for robustness/ruggedness test in method validation. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 24, p 723-753, 2001.

HIROSE Y.; TOMOYUKI F.; TOSHIYUKI I.; NAOYA U. Antioxidative properties and flavonoid composition of Chenopodium quinoa seeds cultivated in Japan. **Food Chemistry** v 119, p. 1300–1306, 2010.

HOGNADOTTIR, A.; ROUSEFF, R.L. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 998, p. 201-211, 2003.

HUANG, S. H.; CHEN, J. R.; TSAI, F. Y. Palladium (II)/Cationic 2,2'-bipyridyl system as a highly efficient and reusable catalyst for the Mizoroki-Heck reaction in water, **Molecules**, v. 15, p. 315-330, 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Vegetable extraction and silviculture - 2008**. Rio de Janeiro, <http://www.ibge.gov.br> 2009.

ICH - International Conference on Harmonisation. **Q2B, Validation of Analytical Procedures: methodology**. Geneva: [s.n.], 1996. Disponível em: <http://www.pharmacontract.ch/support/pdf_support/Q2a.pdf>. Acesso em: fev. 2011.

INDEX KEWENSIS, Supplement XX; Clarendon Press: Oxford, 346 p., 1996.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 35 p., 2003.

JEFFERIES, P. R.; KNOX, J. R.; SCAF, B. The chemistry of *Dodonaea* spp. VII* *ent*-Labdanes from *D. microzyga* (Sapindaceae), **Australian Journal Chemistry**, v. 27, p. 1097-1102, 1974.

JIANG, R.W.; WANG, Y.; GAO, H.; ZHANG, D.M.; YE W.C. Molecular structures and π - π interactions of quercitrin and morusin hydroperoxide. **Journal of Molecules and Structures** v. 920, p. 383-390, 2009.

JIROVETZ, L., BUCHBAUER, G., NGASSOUM, M.B., GEISLER, M. Aroma compound analysis of Piper nigrum and Piper guineense essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction -gas chromatography, solid-phase microextraction -gas chromatography -mass spectrometry and olfactometry. **Journal of Chromatography A**. v. 976, p. 265-275, 2002.

JUDD, S. W.; CAMPBELL, S. C.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. S. **Plant Systematics, A Phylogenetic Approach**, Ed Sinauer Associates Inc. Sunderland, p. 464, 1999.

KA, M.H.; CHOI, E.H.; CHUN, H.S.; LEE, K.G. Antioxidative activity of volatile extracts isolated from *Angelica tenuissima* roots, peppermint leaves, pine needles, and sweet flag leaves. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 4124-4129, 2005.

KAO CORPORATION; Akiba Shunichi, Hama Masakatsu, Okihaka Kouichi, Ara Katisutoshi, Kayane Shigeto. **Deodorant**. Patente JP2002255774, 11 setembro 2002,

KANG, G. Y.; LEE, E. R. J.; KIM, H.; JUNG, J. W.; LIM, J.; KIM, S. K.; CHO, S. G.; KIM, K. P. Downregulation of PLK-1 expression in kaempferol-induced apoptosis of MCF-7 cells. **European Journal of Pharmacology**. v. 611, p. 17-21, 2009.

KINGHORN, A. D.; BALUNAS, M. J. Drug discovery from medicinal plants. **Life Science**, v. 78, p. 431-441, 2005.

KORFMACHER, W.A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today** v. 10, p.1357-1367, 2005.

KOSE CORPORATION; TANABE SEITAKU CORP LTDA. Hoshino Horishi, Hata Tomonori, Nishio Maki, Takamatsu Satoshi. **Skin care preparation**. Patente JP 2001322941, 20 novembro 2001.

KOTAN, R.; KORDALI, S.; ÇAKIR, A.; KESDEK, M.; KAYA, Y.; KILIC, H. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. **Biochemistry and Systematics Ecology**, v. 36, p. 360-368, 2008.

LEUCUTA, S.; VLASE, L.; GOCAN, S.; RADU, L.; FODOREA, C. Determination of phenolic compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 28, p. 3109-3117, 2005.

LIMA-NETO, J. S.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos dos frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Química Nova**, v. 31, p. 1078-1080, 2008.

LIMA, S.R.M.; VEIGA JUNIOR, V.F.; CHRISTO, H.B.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research** v. 17, p.1048–1053, 2003.

LION CORPORATION. Uchiyama Chiyoko, Hayashi Tatsuo. **Agent for preventing and improving gray hair**. Patente JP2000169348, 20 junho 2000.

MARKHAM, K. R.; TERNAJ, B.; STANLEY, R.; GEIGER, H.; MABRY, T. J. Carbon-13 NMR studies of flavonoids – III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. **Tetrahedron**, v. 34, p. 1389-1397, 1978.

MARSTON, A. Role of advances in chromatographic techniques in **phytochemistry**, *Phytochemistry*, v. 68, p. 2785-2797, 2007.

MASSIGNANI, J. J.; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L.; SCHAPHAUSER, H.P.; JORGE, R.F.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. Antiulcerogenic Activity of the Essential Oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1355–1360, 2009.

McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015-2022, 2007.

MEDEIROS, R.S.; VIEIRA, G. Sustainability of extraction and production of copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oleoresin in Manaus, AM, Brazil. **Forest Ecology Management**, v. 256, p. 282–288, 2008.

MERFORT, I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 115–130, 2002.

MOREIRA, I.C.; ROQUE, N.F.; CONTINI, K.; LAGO, J.H.G. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata* (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 17, p. 55-58, 2007.

MORIN, P. H.; CAUDE, M.; RICHARD, H.; ROSSET, R. Semipreparative separation of terpenoids from oils by high-performance liquid chromatography and their subsequent identification by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 363, p. 37-56, 1986.

MORS, W. B.; MONTEIRO, H. J. Duas cumarinas nas sementes da *Copaifera langsdorffii* Desf. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 18, p. 181-182, 1959.

NAKABAYASHI, R.; MIYAKO K.; MAKOTO K.; TAKAYUKI T.; KEIKO Y.; NORIYUKI K.; MAMI Y.; MARIKO K.; KAZUKI S.; HIROMITSU T. Metabolomics-oriented isolation and structure elucidation of 37 compounds including two anthocyanins from *Arabidopsis thaliana* **Phytochemistry** v 70, p.1017–1029, 2009.

NEWMAN, D.J.; GRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the last 25 years. **Journal Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

OHSAKI, A.; YAN, L.T.; ITO, S.; EDATSUGI, H.; IWATA, D.; KOMODA, Y. The isolation and in vivo potent antitumour activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desfon. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, p. 2889-2892, 1994.

PAIVA, E. A. S. Occurrence, structure and functional aspects of the colleters of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae, Caesalpinioideae). **Comptes Rendus Biologies**, v. 332, p. 1078-1085, 2009.

PAIVA, L. A.; DE ALENCAR CUNHA, K. M.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Investigation on the wound healing activity of leo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**. v. 16, p. 737–739, 2002.

PAIVA, L. A.; GURGEL, L. A.; CAMPOS, A. R.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleoresin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Science**, v. 75 p.1979-1987, 2004b.

PAIVA, L. A.; GURGEL, L. A.; De SOUSA, E. T.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleoresin against acetic acid induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93 p. 51-56, 2004a.

PAIVA, L. A., RAO, V. S. N., GRAMOSA, N. V., SILVEIRA, E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oil-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 73–78, 1998.

PAIVA, L. A.; GURGEL, L. A.; SILVA, R. M., TOMÉ, A. R., GRAMOSA, N. V., SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A., RAO, V. S. N. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**. v. 39, p. 303-307, 2003.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenácea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 323-333, 2007.

PAULI, G. F.; SAMUEL M. PRO; FRIESEN, J. B. Countercurrent Separation of Natural Products. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1489–1508, 2008.

PELLETIER, S.W.; CHOKSHI, H.P.; DESAI, H.K. Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. **Journal of Natural Products**, v. 49, p.892–900, 1986.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and pharmacognosy. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2960-2972, 2007.

PINO, J.A.; MESA, J.; MUNOZ, Y.; MARTI, M.P.; MARBOT, R. Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 2213-2223, 2005.

PINTO, A. C.; ANTUNES, O. A.; REZENDE, C. M.; CORREIA, C. R. D. Three isomeric diterpenes from *Vellozia flavicans*. **Phytochemistry**, v. 42 p. 767-769, 1996.

PINTO, A. C.; BRAGA, W. F.; RESENDE, C. M.; GARRIDO, F. M. S. Separation of acid diterpenes of Copaíba by flash chromatography using potassium hydroxid impregnated silica gel. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 11 p. 355-360, 2000.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, vol. 2. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1984.

POLITEO, O.; JUKI, M.; MILO, M. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants, **Croatica Chemica Acta** v. 79, p. 545–552, 2006.

PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. **Trends Analytical Chemistry**, v. 28, p. 28-38, 2009.

QUEIROGA, C.L.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; MAGALHÃES, P. M. Comparison of the Chemical Composition of the Essential Oil and the Water Soluble Oil of *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 111-114, 2008.

RAMOS, M. F. S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica**. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto – SP, 132 p., 2006.

RAWAT, P.; MOHAMMAD F. K.; MANMEET K.; AKHILESH K. T.; ARVIND K. S.; KAMAL R. A.; RAKESH M. Constituents from fruits of *Cupressus sempervirens*. **Fitoterapia**, v. 81, p. 162-166, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p. 771-780, 2004.

RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, p. 201-205, 2007.

RIFUSE:KK. KOMAI K.; MIIWATA M.; SAKURAI O. **Sanitary insect pest repellent and repellent active wax**. Patente JP2001348304, 18 dezembro 2001.

RODRIGUES, R. M. **A flora da Amazônia**, Ed. Cejup, Belém, Brasil p. 463, 1989.

ROMERO, A. L. **Contribuição ao conhecimento químico do óleo-resina de copaíba: configuração absoluta de terpenos**. Dissertação (Mestrado) Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 204 p., 2007.

ROMERO, A.L.; BAPTISTELLA, L.H.B.; IMAMURA, P.M. Absolute configuration of some dinorlabdanes from the Copaiba oil. **Journal of Brazilian Chemistry Society** v. 20, p.1036–1040, 2009.

ROZETE E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**. v. 1158, p. 111-125. 2007.

SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 103, p. 277–281, 2008a.

SANTOS, O. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, V.C. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 120, p. 204-208, 2008b.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SILVA, L.V.; NELSON, D.L.; DRUMMOND, M.F.B.; DUFOSSÉ, L.; GLÓRIA, M.B.A. Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. **Food Research International**, v. 38, p. 1087-1096, 2005.

SMITH, J.A.; MALONEY, D.J.; CLARK, D.E.; XU, Y.; HECHT, S.M.; LANNIGAN, D.A. Influence of rhamnose substituents on the potency of SL0101, an inhibitor of the Ser/Thr kinase, RSK. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 6034-6042, 2006.

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. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria, **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 215-220, 2011.

STUPP, T.; FREITAS, R.A.; SIERAKOWSKI, M.R.; DESCHAMPS, F.C.; WISNIEWSKI JR., A.; BIAVATTI, M.W. Characterization and potential uses of *Copaifera langsdorffii* seeds and seed oil, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2659-2663, 2008.

SZAFRANEK, B.; CHRAPKOWSKA, K.; SKA, M.P.; SZAFRANEK, J. Analysis of leaf surface sesquiterpenes in potato varieties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 53:2817-2822, 2005.

TAPPIN, M.R.R.; PEREIRA, J.F.G.; LIMA, L.A.; SIANI, A.C.; MAZZEI, J.L.; RAMOS, M.F.S. Análise química para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. *Química Nova*, v. 27, p. 236-240, 2004.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends Analytical Chemistry**, v. 23, p. 535-552, 2004.

TELLEZ, M.R.; CANEL, C.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1035-1040, 1999.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835 – 855, 2002.

TINCUSI, B.M.; JIMÉNEZ, I.A.; BAZZOCCHI, I.L.; MOUJIR, L.M.; MAMANI, Z.A.; BARROSO, J.P.; RAVELO, A.G.; HERNÁNDEZ, B.V. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. **Planta Medica** v. 68, p.808–812, 2002.

VALDEVITE, L. M. **Estudo do efeito in vitro do extrato das folhas e do óleoresina de Copaíba sobre fatores de virulência de *Streptococcus mutans* relacionados à cárie dental**. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto – SP, 128 p., 2007.

VAN DEN BERG, M. E. Plantas Medicinais da Amazônia. Contribuição ao seu conhecimento sistemático, **CNPq-MPEG**, Brasília, p.145, 1982.

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v 25, p 273–286 2002.

VEIGA JR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaíba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne – A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 248-254, 2007.

VEIGA JR, V. F.; ZUNINO, L.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C.; CALIXTO, J.B. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 58, p. 1405–1410, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Traditional and Alternative Medicine**, Fact Sheet # 271, Geneva, 2002.

XIANG, W.; LI, R. T.; SONG, Q. S.; NA, Z.; SUN, H. D. *ent*-Clerodanoids from *Isodon scoparius*, **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, p. 2860-2865, 2004.

YOUNG, J.C.; CHANG, H.J.; LEE, S.K.; KIM, H.J.; HWANG, J.K.; CHUN, H. S. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of β -caryophyllene, a sesquiterpene. **Life Science**, v. 80, p. 932-939, 2007.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; KING, R.M. Diterpenes and norditerpenes from the *Aristeguetia* group. **Phytochemistry** v. 30, p. 2991–3000, 1991.

ZHANG, Y.; CHEN, A. Y.; LI, M.; CHEN, C.M.D.; YAO, Q.M.D. *Ginkgo biloba* Extract Kaempferol Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. **Journal of Surgical Research**, v. 148 p. 17-23, 2008.