



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo químico e desenvolvimento de métodos analíticos
validados em cromatografia para análise de oleorresinas e extratos
de folhas de espécies de *Copaifera***

Jonas Joaquim Mangabeira da Silva

Ribeirão Preto-SP

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo químico e desenvolvimento de métodos analíticos
validados em cromatografia para análise de oleorresinas e extratos
de folhas de espécies de *Copaifera***

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: Jonas Joaquim Mangabeira da Silva

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

**Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas em 28/09/2017. A versão original encontra-se disponível
na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.**

Ribeirão Preto-SP

2017

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.

[Silva, Jonas Joaquim Mangabeira](#)

Estudo químico e desenvolvimento de métodos analíticos validados em cromatografia para análise de oleorresinas e extratos de folhas de espécies de *Copaifera*, Ribeirão Preto, 2017.

192 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. *Copaifera*. 2. Métodos analíticos. 3. Cromatografia líquida e gasosa. 4. Validação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Jonas Joaquim Mangabeira da Silva

Título do trabalho: Estudo químico e desenvolvimento de métodos analíticos validados em cromatografia para análise de oleorresinas e extratos de folhas de espécies de *Copaifera*.

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: Prof. Dr. 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: _____

Dedico a conclusão do curso de doutorado a minha família, em especial a minha mãe Terezinha Mangabeira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela misericórdia, proteção, oportunidade e a conclusão desta importante etapa na minha formação. Glorifico o teu nome acima de tudo!!!

Ao meu orientador Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos pela oportunidade, confiança ensinamentos, cobranças, incentivos, amizade e os bons diálogos científicos e descontraídos ao longo destes quatro anos trabalho.

A Fundação de Amparo e Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo nº 2011/13630-7) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e bolsa de estudo cedidos para o desenvolvimento desta tese.

A minha mãe Terezinha Mangabeira pelo amor, educação, exemplo, confiança e por que não falar da paciência. Minha rainha, muito obrigado por acreditar que seria possível mais essa conquista. Sou infinitamente grato por tudo! Eu te amo!!!

As minhas irmãs Nice, Eliane, Rosane e Halessandra que sempre foram uma fonte de incentivo em todas as escolhas que fiz. Amo vocês também!

A Universidade de São Paulo e as Faculdades de Ciências Farmacêuticas e Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto pela gratificante e importante formação ao longo do curso de doutorado.

Aos Professores Antônio Crotti, Fernando Batista, Hervé Rogez, Jonas Paschoal, Luiz Alberto Moraes, Níge Furtado, Rodrigo Veneziani e Sérgio Ambrósio pelos ensinamentos e recomendações que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho.

Aos técnicos dos laboratórios Mário Ogasawara, Walter Lopes, Maria Angélica Chellegatti, Vinícius Palaretti, Cristina Turatti e José Roberto Jabor, em especial ao amigo Eduardo José Crevelin, que contribuiu grandemente no desenvolvimento deste trabalho.

A minha namorada Ana Paula Nogueira pelo carinho, atenção, cuidado, apoio e as agradabilíssimas viagens.

A família da República 22: Leonardo Lima, Lucas Campos, Marinaldo Pacífico, Gustavo Oda e Fernando Postalí pela camaradagem compartilhada desde minha chegada a Ribeirão Preto. Ah! Não posso esquecer do mascote da casa também (P...).

A todos amigos de laboratório de Farmacognosia da FCFRP: Marivane Lemos, Tatiane Carvalho, Juliana Costa, Rosana Casoti, Ingrid Pontes, Anny Lima, Débora Munhoz, Marcela Etchebehere, Marisa Miranda, Cristiane Bernardes, Leticia Fracaroli, Jennyfer Mejía, Lucas Chibli, Marcelo Claro, Bruno Leite, Federico Padilha, Gari Vidal, Mohammed El-Salam, Vitor Ribeiro, Guilherme Simara e Felipe Antunes pela ajuda, boa convivência e risadas.

Aos amigos de Ribeirão Preto Patrícia Carvalho, Flávio Godoy, Vanda Ramos, Verônica Brauer, Luciano Costa, João Drama, João Paulo Gouvêa, Camila Godinho, Lucas Coelho e Leandro Lofeu.

A todos colaboradores que participaram das etapas iniciais de coleta e identificação das amostras vegetais, em especial a Dr^a. Regina Célia V. Martins-da-Silva, Sr. Dico e ao irmão Juarez Covre.

Aos funcionários do Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP, em especial à Eleni e ao Rafael, pelo auxílio e orientações durante realização do doutorado.

E por fim, a todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para que eu pudesse concluir da melhor forma possível essa importante fase da minha vida.

O meu sincero MUITO OBRIGADO!

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito”.

Martin Luther King

“A estrada é sua e somente sua. Outros podem acompanhá-los, mas ninguém pode andar por você”.

Rumi

“Ter fé não significa que os desafios serão facilmente superados, ter fé significa que os mesmos poderão ser vencidos”.

Autor anônimo

RESUMO

SILVA, J. J. M. **Estudo químico e desenvolvimento de métodos analíticos validados em cromatografia para análise de oleorresinas e extratos de folhas de espécies de *Copaifera***. 2017. 192f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

As copaíferas fazem parte de um importante gênero de plantas que produzem um exsudato denominado como oleorresina, que é constituído por uma mistura de sesquiterpenos e diterpenos ácidos. A medicina popular utiliza a oleorresina de diferentes espécies de *Copaifera* com diversas indicações, tais como: ação anti-inflamatória, antimicrobiana, cicatrizante, antitumoral, entre outras. Desta forma, numerosos pesquisadores têm investigado a composição química e as atividades biológicas e toxicológicas deste produto natural, a fim de reconhecer os benefícios e a segurança deste produto. Todavia, estudos da composição química e das atividades biológicas dos constituintes das folhas são escassos. Assim, neste projeto buscou-se investigar a composição química de diferentes extratos de folhas e de oleorresinas de copaíferas coletadas na flora brasileira, bem como produtos comerciais (óleo de copaíba) propondo e aplicando métodos analíticos em cromatografia para determinação dos principais constituintes das amostras. Dez amostras de folhas e oleorresinas autênticas de diferentes espécies foram coletadas no norte e sudeste do Brasil (*C. langsdorffii* Desf., *C. duckei* Dwyer, *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. paupera* (Herzog) Dwyer, *C. pubiflora* Benth, *C. lucens* Dwyer, *C. oblogifolia* Mart, *C. trapezifolia* Hayne, e *Copaifera* sp.) e mais seis amostras comerciais foram adquiridas. Os compostos voláteis foram separados da oleorresina bruta utilizando-se o aparelho de Clevenger. Os padrões cromatográficos foram isolados utilizando-se diferentes modalidades cromatográficas. As oleorresinas de *C. multijuga* e *C. langsdorffii* apresentaram os maiores teores de óleo volátil das amostras com 92 e 72%, respectivamente. Três diterpenos foram isolados da oleorresina de *C. duckei*: os ácidos *ent*-poliáltico, *ent*-diidroagático e *ent*-agático-15-metil éster. Uma análise qualitativa foi otimizada usando microextração em fase sólida seguido de análise em CG-EM, a qual revelou a presença em comum do α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno e α -bergamoteno em todas as amostras de oleorresina analisadas. Dois métodos analíticos utilizando CLUE-EM/EM e CG-DIC foram desenvolvidos, otimizados e validados para análise de nove diterpenos ácidos e quatro sesquiterpenos, os quais apresentaram adequada seletividade/especificidade, faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão. Todavia, em ambos os métodos há necessidade de controle rigoroso das condições analíticas dos sistemas cromatográficos. Os resultados obtidos aplicando os dois métodos indicaram a presença frequente do β -cariofileno e dos ácidos *ent*-copálico e *ent*-caurenoico como as substâncias mais encontradas em oleorresinas de copaíferas autênticas e comerciais. A análise qualitativa empregando CLUE-EM indicou a presença dos ácidos di-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-8), 5',5''-di-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-9), 5',5'',5'''-tri-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico (AGQ-16), afzelina e quercitrina nos extratos das folhas de nove amostras de copaíferas. Os métodos analíticos desenvolvidos são confiáveis para as análises dos componentes fixos e voláteis e os resultados obtidos neste trabalho confirmam a variabilidade da composição química das oleorresinas desse gênero vegetal.

Palavras-chave: *Copaifera*, métodos analíticos, cromatografia líquida e gasosa validação.

ABSTRACT

SILVA, J. J. M. **Chemical study and development of analytical methods validated in chromatography for analysis of oleoresins and leaf extracts of the *Copaifera* species.** 2017. 192f. Thesis (Doutorado). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Copaifera plants are part of an important genus that produces an exsudate called oleoresin, which consists of a mixture of sesquiterpenes and acid diterpenes. Folk medicine uses the oleoresin of different *Copaifera* species for different health problems, such as: anti-inflammatory, antimicrobial, wound healing and antitumor, among others. Thus, numerous researchers have investigated the chemical composition, biological and toxicological activities of this natural product in order to recognize its benefits and safety. However, investigation of chemical composition and biological activities of leaf constituents are scarce. In this project we aimed to investigate the chemical composition of different leaf extracts and *Copaifera* oleoresins collected in the Brazilian flora and acquired in the market (copaíba oil) by proposing and applying chromatographic analytical methods to determine their main constituents. Ten samples of leaves and authentic oleoresins of different species were collected in northern and southeastern parts of Brazil (*C. langsdorffii* Desf., *C. duckei* Dwyer, *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. paupera* (Herzog) Dwyer, *C. pubiflora* Benth, *C. lucens* Dwyer, *C. oblogifolia* Mart, *C. trapezifolia* Hayne, e *Copaifera* sp.) and six commercial samples were purchased. The volatile fraction of the crude oleoresin was obtained by using Clevenger apparatus, and the chromatographic standards were isolated by using different chromatographic techniques. The oleoresins of *C. langsdorffii* and *C. multijuga* displayed the highest volatile oil contents. Three diterpenes were isolated from *C. duckei* oleoresin: *ent*-polialthic, *ent*-dihydroagathic and *ent*-agathic-15-metil ester acids. A qualitative analysis was optimized using solid phase micro-extraction followed by GC-MS analysis, which revealed the presence of α -copaene, β -elemene, β -caryophyllene and α -bergamotene in all investigated oleoresins. Two analytical methods using UPLC-MS/MS and GC-FID were developed, optimized and validated for the analysis of nine acid diterpenes and four sesquiterpenes, which gave adequate selectivity/specificity, range, limit of detection, limit of quantification, precision and accuracy. However, in both methods there is a need for rigorous control of the analytical conditions. The results generated by the two methods indicated the frequent presence of β -caryophyllene, *ent*-copalic and *ent*-kaurenoic acids as the compounds frequently found in authentic and commercial *Copaifera* oleoresins. Qualitative analysis of leaf extracts using UPLC-MS/MS indicated the presence of 5',5''-di-*O*-methyl-3,5-di-*O*-galloylquinic acid (GQA-8), 5',5''-di-*O*-methyl-4,5-di-*O*-galloylquinic acid (GQA-9), 5',5'',5'''-tri-*O*-methyl-3,4,5-tri-*O*-galloylquinic acid (GQA-16), afzelin and quercetrin in all studied species. The analytical developed methods are reliable for the analyses of both fixed and volatile compounds of the oleoresins. The obtained results confirm the variability among the composition of the *Copaifera* oleoresins.

Keywords: *Copaifera*, analytical methods, liquid and gas chromatography, validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global do gênero <i>Copaifera</i>	28
Figura 2. <i>Copaifera</i> : A) árvore de <i>C.multijuga</i> , B) característica morfológica e C) extração manual de oleorresina.	29
Figura 3. Oleorresinas de diferentes espécies de copaíferas	30
Figura 4. Produção de oleorresina de <i>Copaifera</i> entre os anos de 1990 a 2015.	31
Figura 5. Principais sesquiterpenos encontrados em oleorresinas de copaíferas.	32
Figura 6. Principais diterpenos encontrados em oleorresinas de copaíferas.	33
Figura 7. Estrutura química básica do isopreno.	35
Figura 8. Esquema básico da biossíntese dos terpenoides.	37
Figura 9. Locais pré-selecionados para coleta das espécies do gênero <i>Copaifera</i>	49
Figura 10. Estrutura química dos nove ácidos diterpênicos utilizados para desenvolver o método CLUE-EM/EM.	60
Figura 11. Estrutura química dos quatro sesquiterpenos utilizados para desenvolver o método CG-CID.	68
Figura 12. Cromatograma da fração ORCd-1.	82
Figura 13. Perfil cromatográfico da oleorresina bruta de <i>C. duckei</i> (ORCd) e das frações ORCd-2 a ORCd-8 obtidos por CLAE-CORONA CAD.....	84
Figura 14. Cromatograma das frações ORCd-2, ORCd-3 e ORCd-4 utilizando sistema CLAE-UV/Vis semipreparativo.	85
Figura 15. Efeito dos fatores com limite de confiança de 95% para as respostas: número de picos e área total por cromatograma para o sistema MEFS-CG-EM.	95
Figura 16. Cromatograma do método CLUE-EM/EM para os nove diterpenos.....	105
Figura 17. Análise de Componentes Principais (PCA) das amostras de oleorresinas investigadas.	116
Figura 18. Cromatograma do método CG-DIC para quatro sesquiterpenos.	118
Figura 19. Estrutura química de alguns ácidos galoilquínicos e flavonoides encontrados nos extratos de folhas de espécies de <i>Copaifera</i> s.....	127
Figura 20. Resultados da análise qualitativa dos extratos das folhas para os ácidos galoilquínicos 1 a 6.....	129
Figura 21. Resultados da análise qualitativa dos extratos das folhas para os ácidos galoilquínicos 7 a 12.....	130

Figura 22. Resultados da análise qualitativa dos extratos das folhas para os ácidos galolquínicos 13 a 16, afzelina e quercitrina. 131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos terpenoides.	36
Tabela 2. Distribuição das principais espécies de <i>Copaifera</i> no território brasileiro.	48
Tabela 3. Sistema de solventes utilizados no fracionamento da oleorresina de <i>C. duckei</i> (ORCd).	52
Tabela 4. Planejamento experimental do tipo Box-Benhken para um sistema de três variáveis empregado na análise dos componentes voláteis por MEFS-CG-EM das oleorresinas.	56
Tabela 5. Gradiente da fase móvel estabelecido para análise cromatográfica.	61
Tabela 6. Parâmetros do espectrômetro de massas para análise de nove diterpenos.	61
Tabela 7. Programação da temperatura utilizada no método CG-DIC.	69
Tabela 8. Fatores e planejamento experimental tipo Placktt-Burman usado para robustez do método CG-DIC.	73
Tabela 9. Gradiente da fase móvel estabelecido para análise cromatográfica CLUE-EM.	75
Tabela 10. Espécies do gênero <i>Copaifera</i> coletadas no território brasileiro.	79
Tabela 11. Percentual da fração volátil e fração fixa das oleorresinas coletadas.	80
Tabela 12. Fracionamento em coluna clássica da oleorresina de <i>C. duckei</i>	82
Tabela 13. Dados experimentais dos espectros de ^1H e ^{13}C para o composto isolado ORCd-2.4 em CDCl_3 (500 e 125 MHz).	88
Tabela 14. Dados experimentais dos espectros de ^1H e ^{13}C para o composto isolado ORCd-4.1.6 em CDCl_3 (500 e 125 MHz).	90
Tabela 15. Dados experimentais dos espectros de ^1H e ^{13}C para o composto isolado ORCd-5 em CDCl_3 (500 e 125 MHz).	92
Tabela 16. Resultados do teste de seleção da fibra de MEFS.	93
Tabela 17. Resultados experimentais do planejamento tipo Box-Behnken para três fatores utilizando a fibra PDMS.	94
Tabela 18. Composição química dos voláteis das amostras de oleorresinas autênticas e comerciais de <i>Copaifera</i> spp.	97
Tabela 19. Composição química da fração volátil (óleo) das amostras de oleorresinas autênticas e comerciais de copaíferas.	102
Tabela 20. Parâmetros do espectrômetro de massas empregados na seletividade do método.	105
Tabela 21. Parâmetros das curvas analíticas dos nove diterpenos.	107

Tabela 22. Precisão do método CLUE-EM/EM para nove diterpenos utilizando três níveis de concentração.	108
Tabela 23. Exatidão do método CLUE-EM/EM para nove diterpenos utilizando três níveis de concentração.	110
Tabela 24. Resultados para o teste de robustez do método CLUE-EM/EM.	112
Tabela 25. Quantificação dos nove diterpenos em amostras de oleorresinas utilizando o método CLUE-EM/EM.	115
Tabela 26. Respostas para os parâmetros de seletividade do método CG-DIC.	118
Tabela 27. Parâmetros das curvas analíticas para os quatro sesquiterpenos.	119
Tabela 28. Precisão do método CG-DIC para quatro sesquiterpenos utilizando três níveis de concentração.	120
Tabela 29. Exatidão do método CG-DIC para quatro sesquiterpenos utilizando três níveis de concentração.	121
Tabela 30. Resultados para o teste de robustez do método CG-DIC.....	122
Tabela 31. Quantificação de quatro sesquiterpenos em amostras de oleorresina utilizando do método CG-DIC.	124

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação (1). Fração volátil (%).	51
Equação (2). Índice de retenção (IR).....	58
Equação (3). Tipo linear das curvas analíticas.	62
Equação (4). Limite de detecção (LOD).	64
Equação (5). Limite de quantificação (LOQ).....	65
Equação (6). Desvio padrão relativo (%).	65
Equação (7). Exatidão (%).	66
Equação (8). Número de pratos teóricos (N).....	70
Equação (9). Fator de retenção (α).	70
Equação (10). Resolução cromatográfica (Rs).....	70
Equação (11). Efeito dos fatores no planejamento experimental Plackett-Burman.	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

¹H	Hidrogênio (RMN)
¹³C	Carbono 13 (RMN)
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação Oficial de Químicos Agrícolas (<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>)
CAR-PDMS	Carboxen-polidimetilsiloxano
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl₃	Clorofórmio delterado
CEN	Comité Europeu de Normalização
CG	Cromatografia em fase Gasosa
CG-DIC	Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama
CG-EM	Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
C-I	Oleorresina de <i>Copaifera</i> - amostra comercial I
C-II	Oleorresina de <i>Copaifera</i> - amostra comercial II
C-III	Oleorresina de <i>Copaifera</i> - amostra comercial III
C-IV	Oleorresina de <i>Copaifera</i> - amostra comercial IV
C-V	Oleorresina de <i>Copaifera</i> - amostra comercial V
C-VI	Oleorresina de <i>Copaifera</i> - amostra comercial VI
CID	Dissociação Induzida por Colisão (<i>Collision Induced Dissociation</i>)
CL	Cromatografia em fase Líquida
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CLUE-EM	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada Espectrômetro de Massas
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CORONA-CAD	Detector de Aerossol Carregado
CV	Coeficiente de variação
CVACBA	Centro de Valorização Agroalimentar de Compostos Bioativos da Amazônia
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DPR	Desvio padrão relativo
EM	Espectrometria de Massas/Espectrômetro de Massas
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Organização Alimentar e Agrícola (OMS)
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (EUA)
FFCLRP	Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto

FFNSC	<i>Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds</i>
FPP	Farnesil difosfato
GGPP	Geranilgeraniol difosfato
GPP	Geranil difosfato
H_{2(g)}	Hidrogênio gasoso
HCl	Ácido clorídrico
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
ILAC	Cooperação Internacional de Acreditação de Laboratório
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IPP	Isopentanol difosfato
IR_{Exp}	Índice de Retenção calculado
IR_{Lit}	Índice de Retenção descrito na literatura científica
ISO	Organização Internacional de Normalização
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
J	Constante de acoplamento
JBRJ	Jardim Botânico do Rio de Janeiro
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
m/z	Razão massa/carga
MEFS	Microextração em Fase Sólida
MEFS-CG-EM	Microextração em Fase Sólida seguido análise de em Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
MEP	Fosfato de metil eritritol
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MVA	Ácido mevalônico
N	Número de pratos teóricos
NH₄OH	Hidróxido de amônio
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORCd	Oleoresina de <i>Copaifera duckei</i>
ORClc	Oleoresina de <i>Copaifera lucens</i>
ORClf	Oleoresina de <i>Copaifera langsdorffii</i>
ORCm	Oleoresina de <i>Copaifera multijuga</i>
ORCo	Oleoresina de <i>Copaifera oblongifolia</i>
ORCpb	Oleoresina de <i>Copaifera pubiflora</i>
ORCp	Oleoresina de <i>Copaifera paupera</i>
ORCr	Oleoresina de <i>Copaifera reticulata</i>
ORCt	Oleoresina de <i>Copaifera trapezifolia</i>
PCA	Análise de Componentes Principais
PDMS	Polidimetilsiloxano

PDMS-DVB	Polidimetilsiloxano-divinibenzeno
PI	Padrão Interno
<i>r</i>	Coefficiente de correlação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
R_s	Resolução cromatográfica
SIR	<i>Single Ion Reaction</i>
T (°C)	Temperatura em graus Celsius
t_{eq}	Tempo de equilíbrio
t_{ext}	Tempo de extração
TMB	1,2,4,5-tetrametilbenzeno
UFPA	Universidade Federal do Pará
UNIFRAN	Universidade de Franca
USP	Universidade de São Paulo
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
α	Fator de retenção
δ	Deslocamento químico
σ	Desvio padrão absoluto
-CH	Carbono metino (RMN)
-CH₂	Carbono metileno (RMN)
-CH₃	Carbono metila (RMN)

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE EQUAÇÕES	VII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	VIII
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 PRODUTOS NATURAIS	26
2.2 <i>COPAIFERAS</i>	27
2.3 TERPENÓIDES	35
2.3.1 <i>Considerações Gerais</i>	35
2.3.2 <i>Monoterpenos (C₁₀)</i>	37
2.3.3 <i>Sesquiterpenos (C₁₅)</i>	38
2.3.4 <i>Diterpenos (C₂₀)</i>	38
2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS E VALIDAÇÃO	40
3 OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 MATERIAL VEGETAL	47
4.1.1 <i>Autorização para estudo das espécies</i>	47
4.1.2 <i>Coleta do material vegetal</i>	47
4.2 ESTUDO DAS OLEORRESINAS	50
4.2.1 <i>Hidrodestilação das oleorresinas</i>	50
4.2.2 <i>Fracionamento das oleorresinas de Copaifera</i>	51
4.2.3 <i>Isolamento de constituintes das oleorresinas de Copaifera</i>	53
4.2.4 <i>Purificação dos compostos isolados por cristalização</i>	54
4.2.5 <i>Identificação estrutural das substâncias isoladas</i>	55
4.2.6 <i>Análise das oleorresinas por CG-EM</i>	55
4.2.7 <i>Análise das frações voláteis por CG-EM</i>	58
4.2.8 <i>Desenvolvimento do método CLUE-EM/EM para análise de diterpenos em oleorresinas de Copaifera</i>	59

4.2.8.1	Condições Cromatográficas.....	60
4.2.8.2	Curvas analíticas.....	62
4.2.8.3	Preparo das amostras	62
4.2.8.4	Parâmetros de verificação do método CLUE-EM/EM.....	63
4.2.8.4.1	Especificidade/Seletividade.....	63
4.2.8.4.2	Linearidade	63
4.2.8.4.3	Faixa de trabalho	64
4.2.8.4.4	Limite de detecção (LOD).....	64
4.2.8.4.5	Limite de quantificação (LOQ)	64
4.2.8.4.6	Precisão.....	65
4.2.8.4.7	Exatidão	65
4.2.8.4.8	Robustez	66
4.2.8.5	Aplicação do método	67
4.2.9	<i>Desenvolvimento do método CG-DIC para análise de sesquiterpenos em oleorresinas de Copaifera</i>	<i>67</i>
4.2.9.1	Condições cromatográficas	68
4.2.9.2	Curvas analíticas.....	69
4.2.9.3	Preparo das amostras	69
4.2.9.4	Parâmetros de validação	70
4.2.9.4.1	Seletividade	70
4.2.9.4.2	Linearidade	71
4.2.9.4.3	Faixa de trabalho	71
4.2.9.4.4	Limite de detecção (LOD).....	71
4.2.9.4.5	Limite de quantificação (LOQ)	71
4.2.9.4.6	Precisão.....	71
4.2.9.4.7	Exatidão	72
4.2.9.4.8	Robustez	72
4.2.9.5	Aplicação do método	74
4.3	ESTUDO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS.....	74
4.3.1	<i>Obtenção dos extratos</i>	<i>74</i>
4.3.2	<i>Condições cromatográficas e análise dos extratos das folhas por CLUE-EM....</i>	<i>74</i>
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	78
5.2	ESTUDO DAS OLEORRESINAS.....	80
5.2.1	<i>Hidrodestilação</i>	<i>80</i>

5.2.2	<i>Fracionamento da oleorresina de Copaifera duckei</i>	81
5.2.3	<i>Isolamento de diterpenos da oleorresina de C. duckei</i>	85
5.2.4	<i>Purificação por cristalização dos compostos isolados</i>	86
5.2.5	<i>Identificação estrutural das substâncias isoladas</i>	87
5.2.5.1	Identificação estrutural do composto isolado ORCd-2.4	87
5.2.5.2	Identificação estrutural do composto isolado ORCd-4.1.6	89
5.2.5.3	Identificação estrutural do composto isolado ORCd-5	91
5.2.6	<i>Análise das oleorresinas por CG-EM</i>	92
5.2.7	<i>Análise da fração volátil (hidrodestilação) das oleorresinas por CG-EM</i>	101
5.2.8	<i>Desenvolvimento do método CLUE-EM/EM para análise das oleorresinas de Copaifera</i>	104
5.2.8.1	Seletividade	104
5.2.8.2	Linearidade e faixa de trabalho	106
5.2.8.3	Limites de detecção e (LOD) e quantificação (LOQ)	106
5.2.8.4	Precisão.....	108
5.2.8.5	Exatidão	109
5.2.8.6	Robustez	111
5.2.8.7	Aplicação do método (análise das amostras).....	113
5.2.9	<i>Desenvolvimento do método CG-CID para análise das oleorresinas de Copaifera</i>	117
5.2.9.1	Seletividade	117
5.2.9.2	Linearidade e Faixa de trabalho.....	118
5.2.9.3	Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	119
5.2.9.4	Precisão.....	120
5.2.9.5	Exatidão	120
5.2.9.6	Robustez	121
5.2.9.7	Aplicação do método (análise das amostras).....	124
5.3	ESTUDO DAS FOLHAS	126
6	CONCLUSÕES	133
7	REFERÊNCIAS	137
8	APÊNDICES	154
9	ANEXOS	188

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais pela população como alternativa para tratamento de diversas doenças tem sido relatado há milhares de anos. No entanto, a busca por componentes ativos presentes em plantas medicinais iniciou no século passado, levando assim à concepção do primeiro medicamento com as características que conhecemos hoje (DUTRA et al., 2016).

As observações populares sobre o uso e a eficácia das plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais, sendo estas prescritas e administradas com frequência pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de em muitos casos não haver a identificação completa dos seus constituintes químicos. Desta forma, usuários de plantas medicinais de todo mundo mantêm em voga a prática do consumo de plantas (fitoterápicos), tornando válidas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (MACIEL et al., 2002; DUTRA et al., 2016).

As plantas conhecidas popularmente como: copaíba, copaibeiras, copaíferas, pau d'óleo, entre outras denominações, pertencem ao gênero *Copaifera* (Fabaceae – Caesalpinioideae), o qual tem ocorrência na África, nas Américas Central e do Sul, e provavelmente, na Ásia; sendo 28 espécies descritas somente no Brasil (MARTINS-DASILVA, PEREIRA e LIMA, 2008; LEANDRO et al., 2012; LEMOS, et al., 2015). As árvores desse gênero apresentam grande importância social, econômica e medicinal em virtude da produção de um exsudato extraído do tronco sendo constituído de uma mistura de ácidos resinosos e substâncias voláteis (mistura de diterpenos ácidos e sesquiterpenos, respectivamente), denominado de oleorresina, que possui composição variável em função de fatores bióticos e abióticos (PLOWDEN, 2003; LEANDRO et al., 2012).

A oleorresina é empregada na medicina popular com as mais diversas indicações terapêuticas, tais como: cicatrizante, anti-inflamatório, antimicrobiano, antitumoral, gastroprotetor, entre outras. Em virtude dessas propriedades, este produto natural vem sendo foco de numerosas investigações científicas, principalmente no que tange o a composição química, os efeitos medicinais e/ou toxicológicos (TAPPIN et al., 2004; MARTINS-DASILVA, PEREIRA; LIMA, 2008; LEANDRO et al., 2012; LEMOS, et al., 2015).

No contexto do estudo químico, diversas técnicas vêm sendo aplicadas para caracterizar a composição e determinar as quantidades de seus constituintes, auxiliando desta forma no reconhecimento das substâncias ativas das oleorresinas. Entre as técnicas classicamente utilizadas para análise desse produto destacam-se a cromatografia líquida em

coluna clássica, cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência (SOUSA et al., 2011; BALDISSERA et al. 2014); porém o desenvolvimento de métodos analíticos para o estudo da composição química de oleorresinas de *Copaifera* são poucos.

Embora diversos estudos tenham demonstrado a necessidade de garantir segurança aos produtos de origem vegetal, a aplicação e validação de métodos analíticos para matérias-primas advindas de plantas são escassos na literatura, incluindo as oleorresinas de copaíferas (BARA et al., 2006). Para tanto, a validação deve atender os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, faixa de trabalho, precisão, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão, conforme preconiza a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial e órgãos internacionais a exemplo da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a Organização Internacional para Padronização (ISO) e a Conferência Internacional em Harmonização (ICH), entre outras agências (BRASIL, 2003; PASCHOAL et al., 2008; KRUBE et al., 2015).

Desta forma, no presente trabalho propôs-se desenvolver, aperfeiçoar e validar diferentes métodos cromatográficos acoplados a diferentes detectores visando indicar as diferenças de composição química em amostras de oleorresinas autênticas coletadas no território brasileiro, bem como de produtos comercializados (óleo de Copafba) de forma simples, rápida e direta.

Destaca-se que a presente tese é parte integrante do desenvolvimento do Projeto Temático da FAPESP “Validação química e farmacológica de extratos e princípios ativos de espécies de *Copaifera*”, Processo nº 2011/13630-7, sob coordenação do Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos.

Revisão Bibliográfica

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUTOS NATURAIS

Conceitualmente, produtos naturais são definidos como um grupo diversificado de compostos derivados de fontes naturais, as quais podem ser plantas, fungos, bactérias, organismos marinhos e insetos. Essas importantes fontes de substâncias biologicamente ativas vêm sendo exploradas por civilizações como provedoras de compostos utilizadas no tratamento de diversas doenças. Atualmente, uma porcentagem significativa de fármacos em uso clínico ou em investigação são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos de origem natural (BARREIRO e BOLZANI, 2009; LAHLAU, 2013; XEI et al., 2015).

Entre todas as fontes naturais, o reino vegetal destaca-se como o mais importante fornecedor de substâncias naturais com comprovadas atividades biológicas empregadas para fins medicinais. A utilização de plantas ou substâncias extraídas delas como alternativa na terapia de muitas doenças tem sido uma prática comum a milênios para atender às necessidades básicas de cuidados de saúde, sendo estes vegetais prescritos e administrados com frequência pelos efeitos terapêuticos que produzem, apesar de em muitos casos não haver a identificação precisa e completa dos seus constituintes químicos (SILVA e FERNANDES-JUNIOR, 2010; SINGH, 2015).

Para atender à crescente demanda de novas terapias, as companhias farmacêuticas têm extraído com frequência de plantas substâncias ativas utilizadas na produção de diferentes fármacos, a exemplo de laxantes, anticoagulantes, antimaláricos, antineoplásicos, antimicrobianos, entre outras indicações. Podem-se citar como princípios ativos de medicamentos comercializados o paclitaxel (Taxol[®]), vincristina (Oncovin[®]) e morfina (Dimorf[®]) isolados de *Taxus baccata*, *Catharanthus roseus* e *Papaver somniferum*, respectivamente (SINGH, 2015).

Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos disponíveis são derivados a partir de fontes naturais. Em algumas áreas, tais como a oncologia, a quantidade de medicamentos derivados de plantas atinge 60% (DUTRA et al., 2016), demonstrando a importância das plantas dentro dos segmentos de tratamento e cuidados à saúde.

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, a qual é estimada em aproximadamente 20% do número total de seres vivos do planeta (BARREIRO e BOLZANI, 2009; DUTRA et al., 2016). Atualmente, essa rica biodiversidade é reconhecida como uma

importante fonte de substâncias derivadas de plantas, animais e micro-organismos que são objeto de pesquisa em distintas áreas do conhecimento, com destaque na prospecção de substâncias com atividade terapêutica (LIMA et al., 2010). Todavia, apesar da abundante biodiversidade brasileira e o grande interesse da população no uso da medicina tradicional, atualmente o mercado de fitoterápicos no Brasil ainda é modesto, representando menos de 5% do mercado mundial, o qual movimentou US\$ 28 bilhões em 2014 (DUTRA et al., 2016), demonstrando o grande potencial na prospecção e desenvolvimento de fitoterápicos no Brasil.

É importante notar que embora haja inúmeros benefícios na utilização de drogas vegetais no tratamento de enfermidades, a segurança do uso de plantas no tratamento de enfermidades depende de regulação por órgãos governamentais competentes. No Brasil, o Ministério da Saúde estabeleceu a primeira legislação para avaliar a segurança, qualidade e eficácia dos medicamentos à base de plantas comercializadas. Este regulamento proposto baseou-se em recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) e nas legislações alemãs e francesas que regulam o mercado de medicamentos à base de plantas em tais países (DUTRA et al., 2016), onde a determinação da(a) substância(s) ativa(s) compreende uma das mais importantes etapas de regulação para o uso.

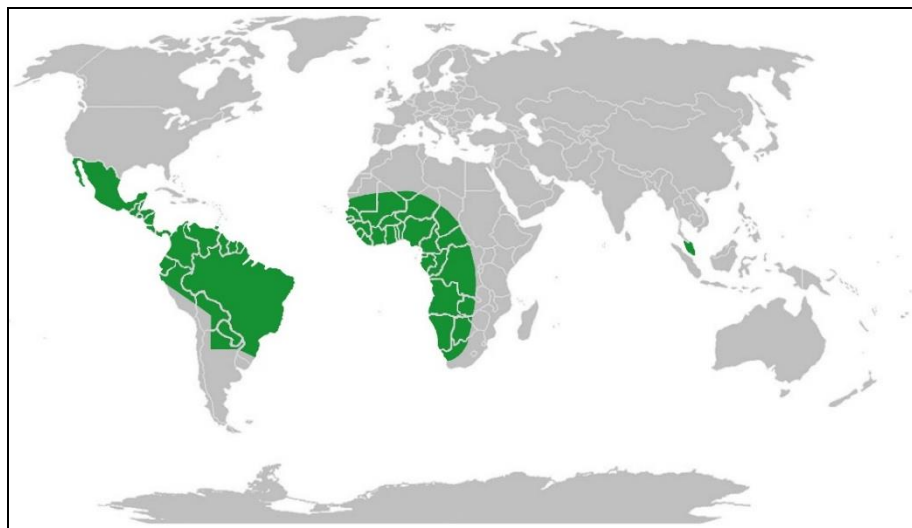
Somado ao aprofundamento dos estudos fitoquímicos e de investigação de atividade biológica, faz-se necessário a integração dos dados publicados até o momento para cada espécie vegetal, com o objetivo de reunir tais informações em trabalhos que possibilitarão informar ao meio científico quais plantas necessitam de maiores estudos, bem como divulgar os possíveis efeitos toxicológicos, forma de uso, doses e atividades farmacológicas comprovadas nas plantas medicinais (VEIGA-JUNIOR e MELLO, 2008).

2.2 *Copaiferas*

As espécies vegetais popularmente conhecidas como copaíba, copaibeiras, copaíferas, pau d'óleo, entre outras descrições fazem parte do gênero *Copaifera* (Fabaceae-Caesalpinoiodidaee) (BORGES et al., 2016), o qual encontra-se distribuído nas Américas Central (4 espécies) e do Sul (37 espécies, sendo 28 espécies presentes no território brasileiro) e região oeste da África (4 espécies), resultando em mais de 45 espécies descritas (MARTINS-DASILVA, PEREIRA e LIMA, 2008; HERRERO-JAUREGUI et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2012). Todavia, há divergência sobre a possível presença desse gênero no continente

asiático (Figura 1), sendo este um dos fatores que gera divergência a respeito do número exato de espécies que compõe o gênero (MARTINS-DA-SILVA, PEREIRA, 2008).

Figura 1. Distribuição global do gênero *Copaifera*, adaptado de MARTINS-DA-SILVA, PEREIRA e LIMA (2008) e NASCIMENTO et al. (2012).



No Brasil, o gênero *Copaifera* está bem documentado em todas as regiões geográficas (MARTINS-DA-SILVA, PEREIRA e LIMA, 2008; FLORA DO BRASIL 2020, 2016) e sua distribuição mais ampla varia da região mais seca do Cerrado até a floresta tropical densa e mista, indicando uma relativa plasticidade na adaptação do gênero a diferentes habitats (KLAUBERG et al., 2014). Dentre as mais de vinte espécies encontradas no território brasileiro, as mais abundantes são: *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. officinalis* L., *C. cearensis* Huber ex Ducke, *C. guianensis* Desf, *C. confertiflora*, *C. langsdorffii* Desf, *C. coriacea* Mart e *C. duckei* Dwyer (LEANDRO et al., 2012).

As copaíferas (Figura 2) apresentam-se como um grupo vegetal morfológicamente distinto, sendo que podem ser arbustos ou árvores que atingem até 40 m de altura, podendo viver até 400 anos (VEIGA-JUNIOR e PINTO, 2002; MARTINS-DA-SILVA, PEREIRA, 2008). Os indivíduos adultos, de modo geral, apresentam as seguintes características morfológicas: tronco áspero, com coloração variável, medindo de 0,4 a 4,0 m de diâmetro, folhas alternadas, pecioladas e penuladas; os frutos são escuros e com uma semente em forma ovoide; e as flores são pequenas e arranjadas em panículos axilares (VEIGA-JUNIOR e PINTO, 2002, MARTINS-DA-SILVA, PEREIRA e LIMA, 2008).

Figura 2. Copaifera: **A)** árvore de *C.multijuga* (Manacapuru-AM), **B)** característica morfológica (Fonte: LVDP, 2017) e **C)** extração manual de oleorresina.

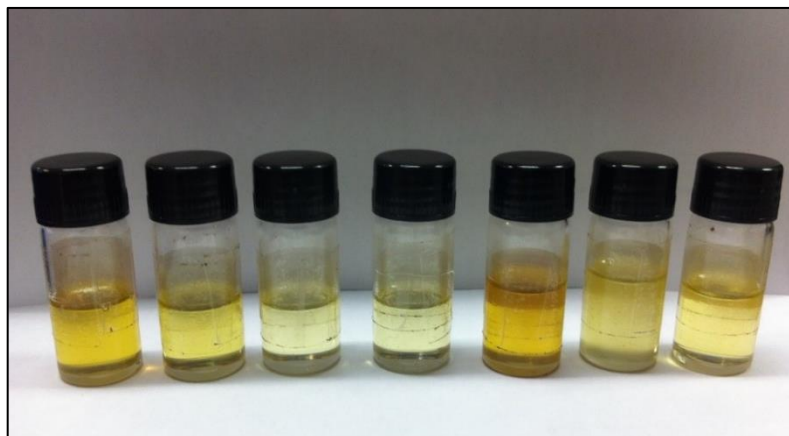


Segundo Klauberg et al. (2014), algumas espécies de Copaifera possuem valiosa importância econômica devido a dois produtos: a madeira e um exsudato proveniente do tronco. O primeiro foi por muito tempo explorado, principalmente pela indústria moveleira, mas também em menor escala pela indústria civil e naval (VEIGA-JUNIOR e PINTO, 2002); muito embora a exploração desse produto vem diminuído ao longo das últimas décadas devido a fatores como: a existência de outras espécies de árvores que são economicamente mais viáveis para a exploração da madeira e a proibição em alguns estados da federação da derrubada de copaíferas (KLAUBERG et al., 2014). O segundo e mais importante produto desse gênero é popularmente conhecido como “óleo de copaíba”, embora tecnicamente definido como oleorresina (Figura 3), o qual se trata de um exsudato líquido com coloração (incolor ou do amarelo ao castanho) e viscosidade variável, constituído de uma mistura de ácidos resinosos e substâncias voláteis (VEIGA-JUNIOR e PINTO, 2002, GALÚCIO et al., 2016).

Atualmente, a oleorresina das copaíferas é extraída de forma artesanal não agressiva e sustentável por comunidades indígenas ou tradicionais, através de uma incisão com trado à aproximadamente 1,0 m de altura do solo no tronco da árvore, formando um orifício que atinge os canais axiais onde é depositada a oleorresina e por onde escoo o exsudato até um recipiente coletor. Ao término da coleta, a abertura do tronco é vedada com tampão de argila, madeira ou conexão hidráulica apropriada para impedir a perda do exsudato e a infestação da planta por

micro-organismos ou insetos (VEIGA-JUNIOR e PINTO, 2002; BARBOSA, YOSHIDA e SCULDELLER, 2009; LAMEIRA et al., 2009; KLAUBERG et al., 2014).

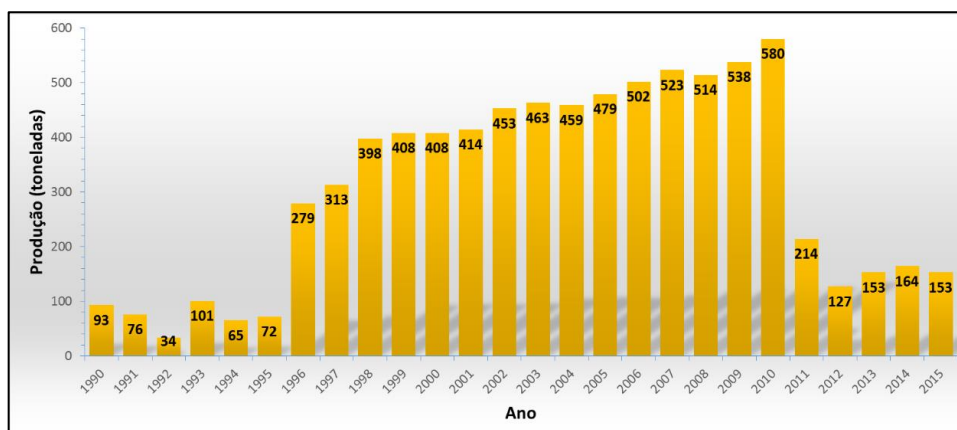
Figura 3. Oleorresinas de diferentes espécies de copaíferas coletadas no território brasileiro



Apesar do seu grande impacto no comércio extrativista, a produção dessa matéria prima é variável, pois fatores como: variedade de espécies, tamanho das áreas de exploração, densidade populacional das espécies nas áreas de coleta, porte dos indivíduos e fatores sazonais e ambientais impactam decisivamente na exploração racional deste produto (PLOWDEN, 2003; KLAUBERG et al., 2014). Estatísticas oficiais indicam que a produção entre 2010 e 2015 de oleorresina foi superior a 1300 toneladas (Figura 4), sendo os estados do Amazonas, Pará e Rondônia, nesta ordem, os maiores produtores (LAMEIRA et al., 2009; KLAUBERG et al., 2014; IBGE, 2016). Desta forma, os presentes dados que atestam a grande importância desta *Commodity* dentro do seguimento de extrativismo vegetal no Brasil.

Investigações a respeito da composição química de oleorresinas de copaíferas datam do século XIX (VEIGA-JUNIOR e PINTO, 2002). Quimicamente a oleorresina de *Copaifera* é um produto do metabolismo secundário e constituído majoritariamente por uma mistura de sesquiterpenos e diterpenos ácidos (LEANDRO et al., 2012; ABRÃO et al., 2015; GALÚCIO et al., 2016).

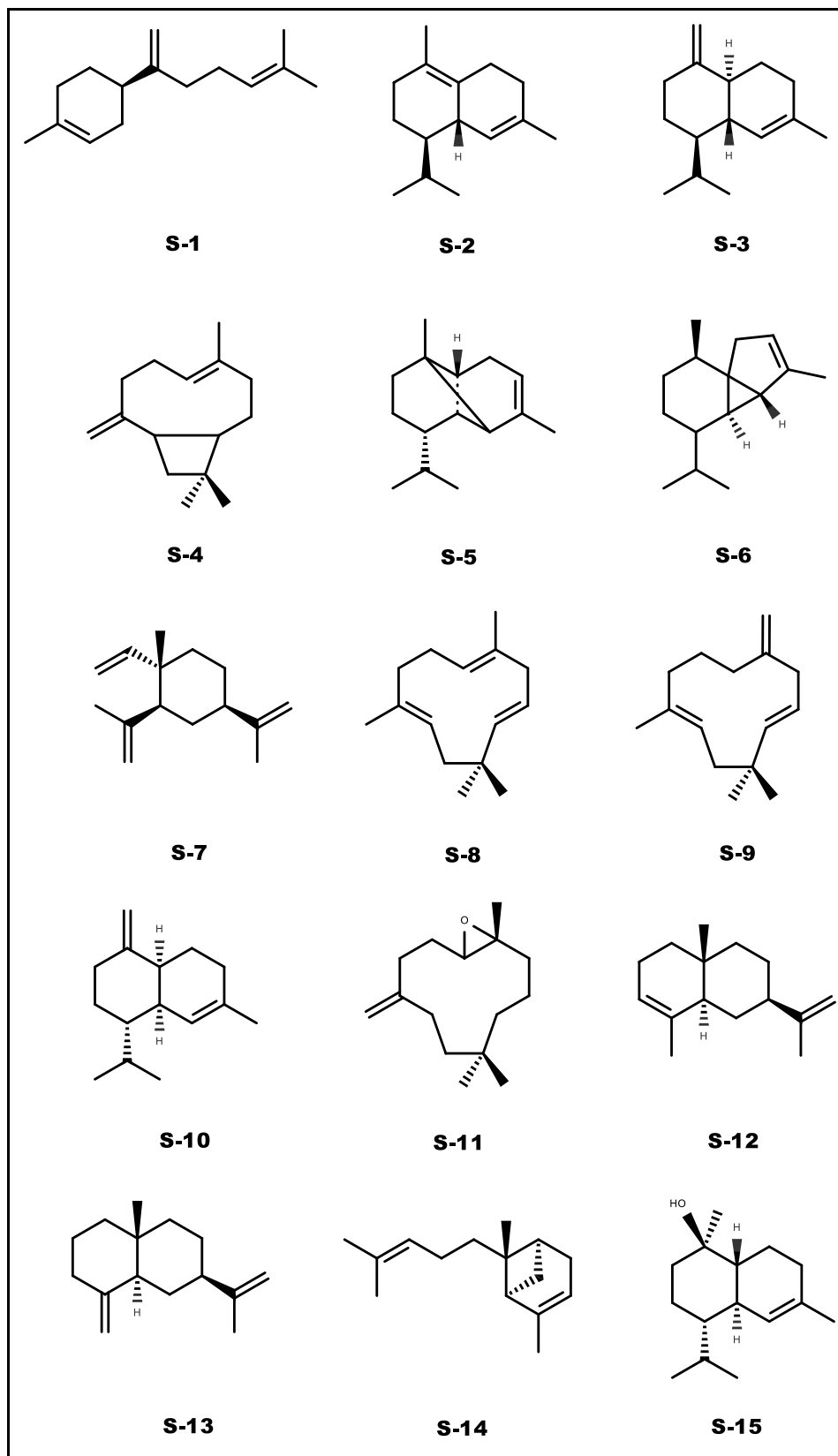
Figura 4. Produção de oleorresina de *Copaifera* entre os anos de 1990 a 2015 (Fonte: IBGE, 2016).



Os sesquiterpenos são as substâncias que compõem a fração volátil e que conferem o aroma característico das oleorresinas de copaíferas (VEIGA-JUNIOR e PINTO, 2002, LEANDRO et al., 2012). A composição química da fração volátil da oleorresina apesar de ser formada majoritariamente por uma classe de substância, a mesma é variável, uma vez que diferenças entre as espécies e fatores ambientais podem influenciar qualitativamente e quantitativamente na sua composição (LEANDRO et al., 2012).

A literatura reporta mais de 70 diferentes sesquiterpenos descritos para as amostras de oleorresinas de copaíferas, sendo os sesquiterpenos β -bisaboletos, δ -cadineno, γ -cadineno, cariofileno, β -cariofileno, cipreno, α -copaeno, α -cubebeno, β -elemeno, α -humoleno, β -humoleno, γ -muroleno, óxido de cariofileno, α -salineno e β -salineno as substâncias voláteis mais descritas (Figura 5) (VEIGA-JUNIOR e PINTO, 2002, LEANDRO et al., 2012), embora muitas citações não diferenciem isômeros, mas apenas descrevem com os nomes genéricos, a exemplo do cadineno, descrito somente como cadineno e/ou como α -cadineno, δ -cadineno e γ -cadineno (VEIGA-JUNIOR e PINTO, 2002; LEANDRO et al., 2012).

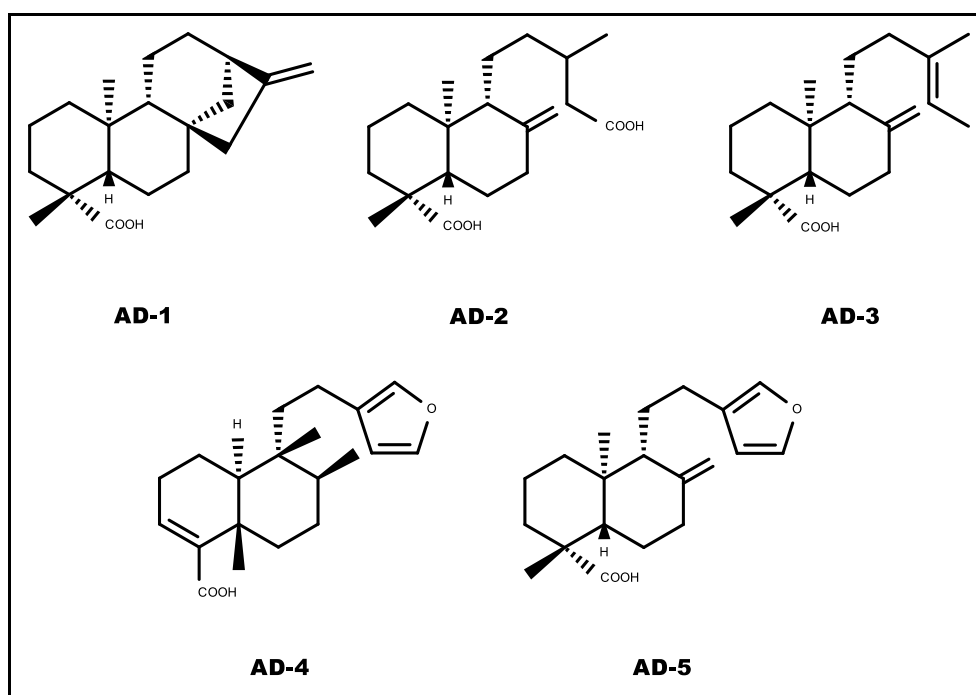
Figura 5. Principais sesquiterpenos encontrados em oleorresinas de copaíferas; onde: β -bisaboleno (S1), δ -cardineno (S2), γ -cardineno (S3), β -cariofileno (S4), α -copaeno (S5), α -cubebeno (S6), β -elemeno (S7), α -humuleno (S8), β -humuleno (S9), γ -muuruleno (S10), óxido de cariofileno (S11), α -salineno (S12), β -salineno (S13), α -bergamoteno (S14) e α -cardinol (S15).



Leandro et al. (2012) destacam que a fração volátil possui grande valor comercial agregado, chegando a ser centenas de vezes superior aos valores das oleorresinas brutas.

A respeito da composição química da fração resinosa das oleorresinas de copaíferas, reporta-se, comumente, a presença de ácidos diterpênicos com esqueletos dos tipos caurano, labdano e clerodano, sendo os ácidos copálico, poliáltico, hardwico e caurenóico (Figura 6), bem como os derivados desse último, as substâncias mais descritas (SOUZA et al., 2010; LEANDRO et al., 2012).

Figura 6. Principais diterpenos encontrados em oleorresinas de copaíferas; onde: ácido caurenóico (**AD-1**), ácido agático (**AD-2**), ácido copálico (**AD-3**), ácido hardwiicko (**AD-4**) e ácido poliáltico (**AD-5**).



As variações na composição química das oleorresinas de copaíferas são grandes. Muitas publicações atribuem essa variabilidade a fatores como: diferenças metabólicas entre indivíduos de mesma ou diferentes espécies botânicas, sazonalidade, idade, tipo de solo, porte do vegetal, entre outros fatores. É importante frisar que embora a diferença de composição pareça ser mais sensível a fatores bióticos, como lesões causadas por insetos e fungos, fatores ambientais como luz e nutrientes também pode contribuir como possíveis condições que influenciam na variação da composição química das oleorresinas (BARBOSA et al., 2012).

Outro fator não ligado a biossíntese dos terpenoides das oleorresinas de copaíferas mas que pode interferir na sua composição, é a adulteração que muitas vezes esse produto pode sofrer ao longo da sua cadeia produtiva, uma vez que seu processo de obtenção é artesanal e não contínuo, unido a crescente demanda do mercado. Existem, então, dois modos clássicos de adulteração de oleorresinas: [1] adição de óleo vegetal ou mineral, ou [2] adição de outro óleo vegetal com características físico-químicas semelhante as das oleorresinas autênticas, mas que pertencem a outro gênero ou família. Ressalta-se, que a mistura de oleorresinas de *Copaifera* de diferentes espécies não é considerado adulteração pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BARBOSA, YOSHIDA e SCUDELLER, 2009).

Assim, devido a essa variável e complexa composição química, inúmeros trabalhos científicos têm reportado as propriedades biológicas das diferentes espécies do gênero *Copaifera*, baseados inicialmente no seu uso tradicional (LEANDRO et al., 2012). Amostras de oleorresinas ou substâncias isoladas de diferentes espécies já apresentaram comprovada atividade biológica em ensaios *in vitro* e *in vivo*, podendo-se citar as ações: antimicrobiana, antiviral, anti-helmíntica, anti-inflamatória, gastroprotetora, cicatrizante, antitumoral, antinociceptiva, anestésica, entre outras (LEANDRO et al., 2012; ZIMMERMAM-FRANCO et al., 2013; VARGAS et al., 2015; LEMOS et al., 2016).

Somado as investigações de atividades biológicas citadas anteriormente, inúmeros estudos têm sido conduzidos com o intuito de reconhecer a segurança e possíveis efeitos tóxicos que esse produto natural pode apresentar. Ainda sob a ótica toxicológica, até a presente data, as publicações a respeito da segurança da aplicação terapêutica das oleorresinas não descrevem significativos riscos em sua utilização. Todavia, alguns trabalhos apontam efeitos tóxicos dependente da dose administrada, em modelos animais, atribuídos a algumas oleorresinas ou terpenos isolados, que comumente são descritos na composição destas oleorresinas, tornando então imperativamente necessários estudos toxicológicos adicionais em toda nova aplicabilidade desejada para esse produto (MAISTRO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2006; SACHETTI, et al., 2009; LEANDRO et al., 2012).

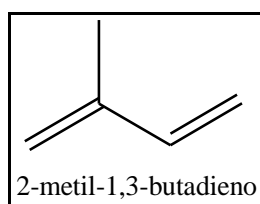
O foco das pesquisas relacionadas ao gênero *Copaifera* sejam relacionados a composição química e as propriedades biológicas das oleorresinas, é importante citar que a composição química e atividades biológicas dos componentes das folhas têm ganhado destaque, a exemplo dos trabalhos de investigação química do óleo volátil e extratos de folhas de *C. langsdorffi* realizados por Oliveira et al. (2017) e Motta et al. (2017), respectivamente, tornando um novo produto a ser explorado.

2.3 TERPENÓIDES

2.3.1 Considerações Gerais

Terpenóides compreendem um amplo e diversificado grupo de produtos naturais com mais de 50.000 compostos descritos, que podem ser encontrados em plantas, bactérias, fungos, algas, insetos e alguns animais (CHEN et al., 2009, DEWICK, 2009, GONZÁLEZ-BURGOS e GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012), sendo que nas plantas desempenham um importante papel nas interações plantas-insetos, plantas-patógenos e plantas-plantas (CHENG et al, 2007). Quimicamente suas estruturas básicas derivam de unidades do 2-metil-1,3-butadieno (Figura 7), conhecido como isopreno (C_5)_n (BREITMAIER, 2006, DEWICK, 2009).

Figura 7. Estrutura química básica do isopreno.



Na natureza, os terpenóides ocorrem predominantemente sob a forma de hidrocarbonetos, álcoois e seus heterosídeos, éteres, ésteres, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos (BREITMAIER, 2006). O número de unidades isoprênicas determina a classificação dos terpenos em distintas classes, conforme pode ser observado na Tabela 1.

No reino vegetal, os terpenóides são sintetizados em diferentes tecidos vegetais por meio de duas vias metabólicas independentes, localizadas em compartimentos intracelulares separados: a do ácido mevalônico (MVA) ou difosfato de metileritrol (MEP), as quais utilizam como precursores isopentanol difosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP). IPP e DMAPP são na prática as unidades ativas do isopreno (CHENG et al, 2007, DEWICK, 2009, GONZÁLEZ-BURGOS e GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012).

O aparato enzimático das vias do MVA e MEP estão localizadas no citosol e cloroplasto, respectivamente. Usualmente descreve-se que os sesquiterpenos, triterpenos e esteróides são formados na via do MVA, enquanto que monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos são

sintetizados na via do MEP conforme pode ser observado na Figura 8 (DEWICK, 2009); existindo exceções.

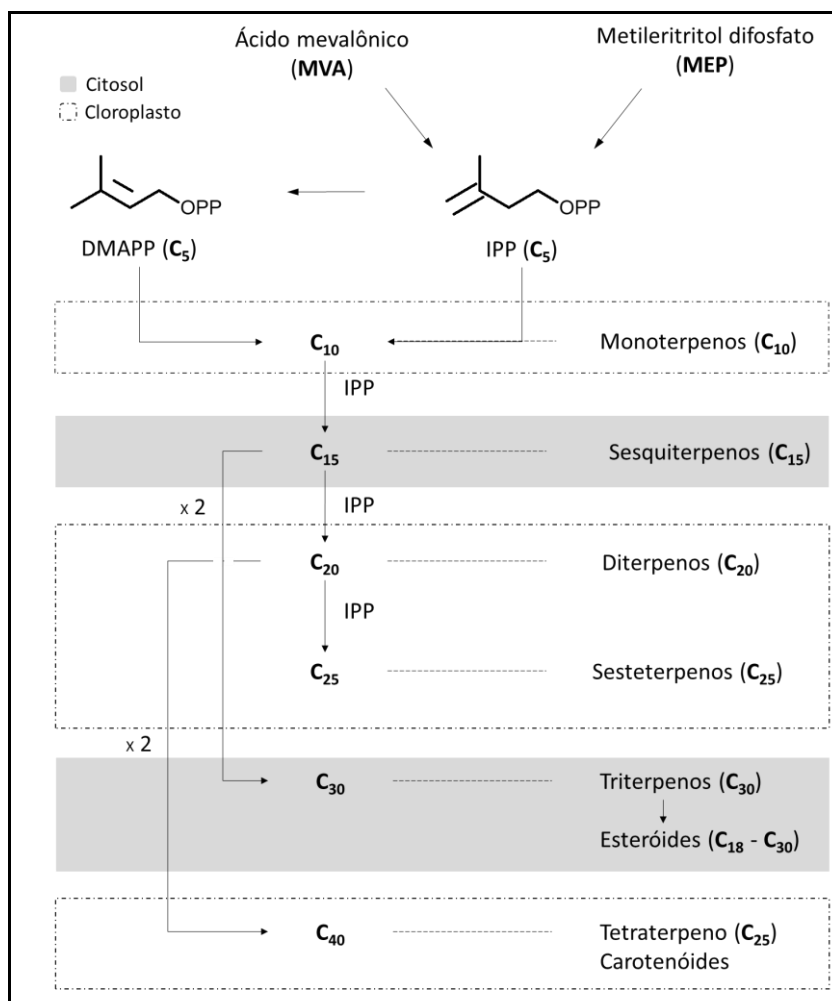
Tabela 1. Classificação dos terpenoides.

Nome	Nº unidades de Isopreno	Nº de átomos de Carbono	Estrutura básica (linear)
Hemiterpenos (C ₅ H ₈)	1	5	
Monoterpenos (C ₅ H ₈) ₂	2	10	
Sesquiterpenos (C ₅ H ₈) ₃	3	15	
Diterpenos (C ₅ H ₈) ₄	4	20	
Sesterterpenos (C ₅ H ₈) ₅	5	25	
Triterpenos (C ₅ H ₈) ₆	6	30	
Tetraterpenos (C ₅ H ₈) ₈	8	40	
Poliisoprenos (C ₅ H ₈) _n	>8	>40	

Fonte: Dados adaptados de Sell (2003), Breitmaier (2006) e Deiwck (2009).

No citosol, a unidade ativa do isopreno é derivada da via do ácido mevalônico, a qual inicia com condensações de unidades de acetil-Coa; diferentemente do que ocorre nos plastídios em que a unidade isoprênica é formada a partir do piruvato e gliceraldeído 3-fosfato. Entretanto, a via independente MVA deriva do metileritritol fosfato (MEP) (CHENG et al, 2007, DEWICK, 2009).

Figura 8. Esquema básico da biossíntese dos terpenoides, adaptado de Deiwck (2009).



É importante citar que trabalhos de investigação da biossíntese desses compostos indicam que animais e fungos carecem da via do MEP, utilizando exclusivamente a via do MVA, sendo que plantas e algumas bactérias apresentam as duas vias metabólicas (DEWICK, 2009).

Dentro do contexto do presente trabalho, destacam-se as classes dos mono-, sesqui- e diterpenoides.

2.3.2 Monoterpenos (C₁₀)

Os monoterpenos são substâncias formadas a partir de combinações de DMAPP e IPP que dão origem ao difosfato de geranila (GPP) ou seus isômeros. O GPP pode sofrer ação de diferentes ciclases originando sistemas acíclicos e cíclicos (DEWICK, 2009).

A diversidade estrutural dos monoterpenos é extensa, tendo sua categorização em mais de trinta diferentes tipos estruturais, sendo os mais frequentes: o mircano acíclico, o mentano monocíclico e os bicíclicos pinano, bornano, fenchano, caranos, turjanos (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997; DEWICK, 2009).

As características fundamentais dessas substâncias são a volatilidade e o odor intenso, sendo esses componentes comuns em plantas que apresentam fragrância e aroma, fazendo assim parte da constituição de óleos voláteis. Há exemplo de monoterpenos em drogas vegetais, podem-se citar: cânfora, cineol, mentol e timol que são encontrados respectivamente em *Cinnamomum camphora*, *Eucalyptus globus*, *Mentha arvensis* e *thimus vulgaris* (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997).

2.3.3 Sesquiterpenos (C₁₅)

Os sesquiterpenos compreendem a maior classe entre todos os terpenoides. São substâncias formadas a partir de três unidades de isopreno por meio da adição de uma unidade de IPP ao difosfato de geranila resultando na formação do difosfato de farnesila (FPP) ou seus isômeros, o qual é precursor fundamental de todos os sesquiterpenos. O FPP formado pode dar origem a sistemas acíclicos ou cíclicos, com esses últimos podendo ser mono-, bi- ou tricíclicos (DEWICK, 2009).

Essa classe de terpenoides apresenta características químicas semelhantes as monoterpenos. Contudo são menos voláteis e também podem fazer parte da composição de muitos óleos voláteis naturais (DEWICK, 2009).

Como exemplos de sesquiterpenos em drogas vegetais, podem-se citar: α -bisabolol (*Matricaria chamomilla*), zingiberene (*Zingiber officinale*), β -cariofileno (*Cinnamomim zeylanicum*) e o α -cadineno (*Juniperus communis*) (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997).

2.3.4 Diterpenos (C₂₀)

Os diterpenoides compreendem um grande grupo de compostos com vinte átomos de carbonos que são sintetizados a partir da adição de IPP a uma unidade de FPP gerando difosfato de geranilgeraniol (GGPP) de modo análogo como ocorre com terpenoides que possuem 10 ou 15 carbonos. São substâncias que de modo geral são cíclicas com cinco anéis, havendo descrição de poucas substâncias acíclicas (DEWICK, 2009).

Os diterpenoides são compostos não voláteis que de modo geral estão na forma de ácidos orgânicos, geralmente sólidos opticamente ativos, que podem existir tanto na forma normal (série normal) quanto na estereoquímica antipodal, denominada como série “*ent*” (DEWICK, 2009; ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997).

Os compostos forskolin, ginkgolido A, paclitaxel e o ácido caurenico são exemplos de diterpenos isolados das espécies *Coleus forskohlii* (Poir.) Briq., *Ginkgo biloba* Linné, *Taxus bevifolia* Nutt e *Copaifera lagsdorffii* Desf., respectivamente (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997; LEANDRO et al., 2012).

Os terpenoides apresentam diversas atividades biológicas na natureza. Nas plantas, apresentam respostas diretas e indiretas a fatores bióticos e abióticos (CHENG et al., 2007). Tais metabólitos apresentam papel importante como protetor contra estresse térmico, atração de polinizadores, proteção contra patógenos e herbívoros, transportadores de elétrons, reguladores de crescimento e desenvolvimento, participam da glicosilação de proteínas ou como elemento de membranas, entre outras funções (THOLL, 2015).

As observações dessas múltiplas funções nas plantas tornaram os terpenoides objeto de utilização na terapêutica de diversas doenças por comunidades tradicionais, tornando-se também foco de investigações científicas sobre seus potenciais efeitos biológicos e toxicológicos (CAVALCANTI et al., 2006; GARDNER, PANTER e STEGELMEIER, 2010; KANDI et al., 2015).

Desta forma, a diversidade de estruturas químicas e funções biológicas dos terpenoides provocou maior interesse em seu uso comercial. Os terpenoides são considerados úteis na prevenção e terapia de inúmeras doenças, incluindo câncer, e também com comprovadas propriedades medicinais, tais como: antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitas, antivirais, antialérgicas, antiespasmódicas, anti-hiperglicêmicas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras, entre outras (PADUCH et al., 2007). Todavia, efeitos adversos/tóxicos são também atribuídos a essa classe de produtos naturais ou derivados destes, os quais já foram reportados, tornando importante sua avaliação sobre todos os aspectos de segurança para sua utilização como alternativa terapêutica em animais e no ser humano (KANDI et al., 2015).

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS E VALIDAÇÃO

Os métodos analíticos são ferramentas da Química Analítica que têm por objetivo a identificação, separação e quantificação de componentes químicos de materiais naturais e artificiais, sendo que a natureza dos métodos analíticos podem ser: gravimétricos, volumétricos, eletroquímicos, espectroscópicos, cromatográfico, hifenado ou variado (PATHURI et al., 2013; SKOOG et al., 2014; CHAUHAN, MITTU e CHAUHAN, 2015). As medidas analíticas resultantes dessas ferramentas desempenham um papel fundamental em muitas áreas da química, bioquímica, medicina, biologia, geologia, física, entre outras áreas (SKOOG et al., 2014).

A seleção do método analítico é baseada em distintas considerações, tais como: propriedades químicas do analito de interesse e da matriz que o contem, concentração, tempo e custo do procedimento (viabilidade), tipo de aferição (qualitativa e/ou quantitativa), a quantidade de amostras a analisar, etc (CHAUHAN, MITTU e CHAUHAN, 2015).

Um procedimento analítico a ser utilizado deve testar características definidas da substância de interesse em relação aos critérios de aceitação estabelecidos para essa característica. Desta forma, no desenvolvimento de um novo método analítico, a escolha da instrumentação analítica e da metodologia deve basear-se nas exigências e finalidade pretendida, assim como em experiências anteriores por parte do(s) analista(s) (SKOOG et al., 2014; CHAUHAN, MITTU e CHAUHAN, 2015).

Toda a investigação por meio de métodos analíticos de amostra possui suas próprias características, que variam de analito à analito, e deve respeitar o contexto de sua aplicação e sua finalidade. Contudo algumas etapas em comum fazem parte de qualquer procedimento propostos, sendo estas (FDA, 1994; RUIZ-ANGEL et al., 2014; CHAUHAN, MITTU e CHAUHAN, 2015; FDA, 2015):

- A. Caracterização do padrão analítico (composto de interesse);
- B. Requisitos do método;
- C. Fundamentação literária (pesquisa de literatura científica);
- D. Seleção do método;
- E. Configuração do instrumento e estudos preliminares;
- F. Otimização dos parâmetros instrumentais;
- G. Documentação requerida do método;
- H. Avaliação do desenvolvimento do método;

- I. Determinação da recuperação de percentual da amostra testada; e
- J. Demonstração de análise quantitativa.

É importante salientar que em procedimentos de Química Analítica, a verificação da confiabilidade da análise proposta é conferida por meio do processo de validação (PATHURI et al., 2013; PATIL et al., 2014).

A validação de um método analítico trata-se de um conjunto de procedimentos definidos e executados que tem por objetivo demonstrar que o método proposto é adequado para a finalidade na qual foi elaborado e que é capaz de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, através da sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. É importante destacar que este procedimento deve seguir um plano que inclui escopo, característica de performance e limites de aceitação (GARCIA et al, 2011; NAZ et al., 2014).

O processo de validação de um determinado método inicia antes dos testes laboratoriais e prossegue após o desenvolvimento do mesmo. A validade de um procedimento específico deve ser comprovada por meio de experimentos laboratoriais usando amostras ou compostos-padrão que são semelhantes a amostras desconhecidas analisadas rotineiramente. O planejamento e a execução devem seguir um protocolo previamente definido e de preferência escrito em um formato de instrução passo a passo. Idealmente, o protocolo de validação deve ser escrito seguindo uma compreensão completa das capacidades do método e do uso pretendido (RUIZ-ANGEL et al., 2014). Portanto, a validação verifica se o método é adequado para ser usado como ferramenta de controle de qualidade e para suporte de pesquisa (PERIS-VICENTE, ESTEVE-ROMERO e CARDA-BROCH, 2015).

O processo de validação pode ser complexo e demorado, sendo dependente do objetivo proposto e das condições gerais de execução. Em termos gerais, a performance do método é segmentado nas seguintes etapas: definição do escopo do método (tipo de amostra e analito, equipamentos e local de aplicação), definição dos critérios de validação (parâmetros de aceitação e critérios de aceitação), testes de performance (desenvolvimento de casos-teste e testes para parâmetros de desempenho) e testes de rotina do método (procedimentos operacionais padrão – POP, testes de adequação do sistema e controle analítico de qualidade) (GARCIA et al, 2011; RUIZ-ANGEL et al., 2014).

A validação propriamente dita consiste na determinação de parâmetros de qualidade bem definidos, os quais são: seletividade, especificidade, curva analítica, linearidade, faixa de calibração, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Somado

a estes outros critérios como contaminação cruzada, simplicidade, tempo de análise, preço por análise, segurança para equipe de laboratório e impacto ambiental devem também ser considerados (PERIS-VICENTE, ESTEVE-ROMERO e CARDA-BROCH, 2015). As principais características de desempenho do processo de validação são conceituadas a seguir (PASCHOAL et al., 2008; SOBRINHO et al., 2008; NAZ et al., 2014; KRUBE et al., 2015ab):

- a. Seletividade: é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes.
- b. Linearidade: corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação, ou seja, significa uma correlação linear proporcional entre o sinal de resposta da medição analítica e a concentração do composto em estudo.
- c. Faixa de trabalho: Corresponde o intervalo entre a concentração mínima e máxima de cada composto de interesse, onde é possível correlacionar proporcionalmente o sinal medido e a concentração real da substância de interesse.
- d. Limite de detecção (LOD): Trata-se da menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificável.
- e. Limite de Quantificação (LOQ): representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida.
- f. Precisão: Trata-se da dispersão de resultados entre aferições independentes e repetidas de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A precisão pode ser avaliada pelo: desvio padrão absoluto (σ), intervalo de confiança da média ou coeficiente de variação/desvio padrão relativo (CV ou DPR).
- g. Exatidão: Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro.
- h. Robustez: Esta figura de mérito avalia a sensibilidade que o método apresenta em face de pequenas variações propositalmente realizadas, a fim de definir o grau de controle sobre os procedimentos operacionais do método proposto.

Diversas agências reguladoras, comitês e pesquisadores têm publicado revisões e relatórios técnicos sobre estratégias de validação, garantia de qualidade e objetivos regulatórios em diversas áreas do conhecimento (PERIS-VICENTE, ESTEVE-ROMERO e CARDA-

BROCH, 2015). É importante salientar, que os procedimentos que envolvem recomendações técnicas para o desenvolvimento do processo de validação são preconizados por agências reguladoras em diversos países. No Brasil, existem duas agências que disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos e também verificam as competências laboratoriais para tal finalidade, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) (RIBANI et al., 2004). Em âmbito internacional, podem ser citados: AOAC (Associação Oficial de Químicos Agrícolas), CEN (Comité Europeu de Normalização da Comissão Europeia), EMA (Agência Europeia de Medicamentos), FAO (Organização Alimentar e Agrícola), FDA (Food and Drug Administration), ICH (Conferência Internacional de Harmonização), ILAC (Cooperação Internacional de Acreditação de Laboratório), ISO (Organização Internacional de Normalização), IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), OMS (Organização Mundial da Saúde), e outras agências (PASCHOAL et al., 2008; PERIS-VICENTE, ESTEVE-ROMERO e CARDA-BROCH, 2015).

É importante citar, que no contexto em que o presente trabalho está inserido, poucas publicações têm investigado a composição química de oleorresinas de Copaiferas através de ferramentas analíticas validadas; podendo ser mencionados os trabalhos de Souza et al. (2011), que validou um método de cromatografia em fase gasosa acopada a detector de ionização de chamas (CG-DIC) para investigação de quatro sesquiterpenos em óleo volátil extraído de oleorresina de *C. langsdorffii*, e o de Motta et al. (2017) que validou um método empregado cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector de ultravioleta/Visível (CLAE-UV/Vis) para análise de ácidos galoilquínicos e flavonoides em estudo de composição química e sazonalidade de substâncias extraídas das folhas de *C. langsdorffii*. Não havendo, portanto, métodos analíticos validados que investiguem, por exemplo, a composição da fração resinosa, bem como a investigação ao mesmo tempo de oleorresinas de diferentes espécies desse importante gênero de plantas.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a composição química das oleorresinas e das folhas de espécies de *Copaifera*, a fim de determinar os principais constituintes químicos desse gênero, propondo métodos analíticos para a identificação e quantificação das principais substâncias presentes em espécies desse gênero de plantas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar coleta de amostras de folhas e oleorresinas de diferentes espécies do gênero *Copaifera* distribuídas no território brasileiro.
- Isolar e identificar/elucidar substâncias presentes na oleorresina *Copaifera duckei* para complementação do banco de padrões (isolados) vinculado ao Projeto Temático.
- Desenvolver e validar método analítico por cromatografia líquida (CL) e cromatografia gasosa (CG), visando a análise qualitativa/quantitativa de sesquiterpenos e diterpenos de oleorresinas das espécies de *Copaifeira* coletadas e amostras comerciais.
- Realizar análise qualitativa de extratos de folhas das espécies de *Copaifeira* coletadas utilizando CLUE-EM.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

4.1.1 Autorização para estudo das espécies

Inicialmente, no desenvolvimento do Projeto Temático intitulado “Validação química-farmacológica de extratos e princípios ativos de espécies de *Copaifera*”, ao qual esta Tese está vinculada, por meio do Coordenador Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos e do pesquisador Prof. Dr. Hervé Rogez, foram solicitadas autorizações para acesso ao patrimônio genético com fins de pesquisa científica através do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e para a coleta e o transporte do material vegetal por meio do Ministério do Meio Ambiente (MMA-SISBIO-ICMBio-IBAMA). Ambos os pedidos foram deferidos conforme documentos de números **010225/2014-5** e **35143** (ANEXOS I e II), respectivamente.

Tais autorizações permitiram que todas as etapas de execução do referido Projeto Temático, assim como o presente trabalho, fossem realizadas dentro dos preceitos legais vigentes no Brasil.

4.1.2 Coleta do material vegetal

Após as aquisições das autorizações emitidas pelos órgãos competentes eu, juntamente com outros colaboradores, realizei as coletas de espécies de *Copaifera* distribuídas ao longo do território brasileiro.

Inicialmente, foram feitas consultas na literatura científica, *websites* especializados, assim como nas coleções biológicas do Laboratório de Botânica da EMBRAPA – Amazônia Oriental e do Herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, ambos na cidade de Belém-PA, para a seleção das possíveis localidades de coletas aonde seria possível adquirir diferentes de espécies de *Copaifera*. Na Tabela 2 estão resumidamente apresentados dados integrados das regiões mapeadas que poderiam ser visitadas dentro desse Projeto de pesquisa (MARTINS-DASILVA, PEREIRA e LIMA, 2008; FORA DO BRASIL 2020, 2016).

É importante esclarecer que foi priorizada a coleta das espécies que possuíam descrição de produção de oleorresina, uma vez que as oleorresinas foram os objetos de estudo do Projeto Temático.

Também foram levados em consideração os seguintes pontos: custo e logística para o acesso as localidades, contratação do técnico de coleta (mateiro) e auxiliares de coleta com conhecimento da flora local, estrutura para coletar e meios de conservação do material vegetal até o envio para os laboratórios.

Tabela 2. Distribuição das principais espécies de *Copaifera* no território brasileiro.

#	Espécie	Forma evolutiva*	Domínio fitogeográfico	Distribuição geográfica no Brasil**	
				Região	Estados
1	<i>C. arenicola</i> Ducke.	Árvore	Caatinga e Cerrado	Nordeste	BA, CE, PE e RN
2	<i>C. coriacea</i> Mart.	Árvore	Caatinga e Cerrado	Nordeste	BA e PI
3	<i>C. depilis</i> Dwyer.	Arbusto	Cerrado	Nordeste e Centro-Oeste	BA e MT
4	<i>C. duckei</i> Dwyer.	Árvore	Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica	Norte, Nordeste e Sudeste	PA, TO, BA, CE, MT, MA, PB, PI e RJ
5	<i>C. elliptica</i> Mart.	Arbusto	Cerrado	Centro-Oeste	GO e MT
6	<i>C. glycyicarpa</i> Ducke.	Árvore	Amazônia	Norte e Centro-Oeste	AM, PA, RO e MT
7	<i>C. guyanensis</i> Desf.	Árvore	Amazônia	Norte	AM e AP
8	<i>C. langsdorffi</i> Desf.	Árvore	Amazonas, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica	Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul	AC, AM, PA, BA, GO, MS, MG, SP, PR e RS
9	<i>C. lucens</i> Dwyer.	Árvore	Mata Atlântica	Nordeste e Sudeste	BA, ES, MG, RJ e SP
10	<i>C. luetzelburgii</i> Harms.	Arbusto	Cerrado	Norte, Nordeste e Centro-Oeste	TO, BA, PI e GO
11	<i>C. magnifolia</i> Dweyr.	Arbusto	Cerrado	Nordeste e Centro-Oeste	BA e MT
12	<i>C. majorina</i> Dweyr.	Árvore	Mata Atlântica	Nordeste	BA
13	<i>C. malmei</i> Harms.	Arbusto	Cerrado	Centro-Oeste	GO e MT
14	<i>C. marginata</i> Benth.	Arbusto	Cerrado	Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste	TO, BA, MA, GO, MT, MS e MG
15	<i>C. martii</i> Hayne.	Árvore	Amazônia, Caatinga e Cerrado	Norte e Nordeste	PA, TO, CE, MA e PI
16	<i>C. multijulga</i> Hayne.	Árvore	Amazônia	Norte, Nordeste e Centro-Oeste	AM, AC, PA, RO, BA e MT
17	<i>C. nana</i> Rizzini.	Arbusto	Cerrado	Centro-Oeste	GO e MT
18	<i>C. oblongifolia</i> Mart.	Árvore	Cerrado	Norte, Nordeste e Centro-Oeste, Sudeste	PA, RO, TO, BA, MA, PI, DF, GO, MT e MG
19	<i>C. paupera</i> (Herzog) Dwyer.	Árvore	Amazônia	Norte	AC
20	<i>C. piresii</i> Ducke.	Árvore	Amazônia	Norte e Centro-Oeste	PA, AM, RO e MT
21	<i>C. pubiflora</i> Benth.	Árvore	Amazônia	Norte	RO
22	<i>C. reticulata</i> Ducke.	Árvore	Amazônia	Norte e Centro-Oeste	AM, PA, RR e MT
23	<i>C. sabulicola</i>	Árvore	Cerrado	Nordeste e Sudeste	BA e MG
24	<i>C. trapezifolia</i> Hayne.	Árvore	Mata Atlântica	Nordeste, Sudeste e Sul	BA, PE, MG, RJ, SP, PR e SC

Onde: *forma de vida predominante na fase adulta do vegetal; **ocorrências confirmadas na literatura e no banco de dados da Flora do Brasil 2020 (2016).

Em seguida ao levantamento da distribuição geográfica das espécies do gênero *Copaifera* no Brasil, os pesquisadores Prof. Dr. Jairo Bastos, Prof. Dr. Hervé Rogez, Prof. Dr. Rodrigo Veneziani, Prof. Dr. Sérgio Ambrósio, doutorandos Marivane Lemos e Jonas Mangabeira, mestrando Erick Motta e o técnico Mário Ogasawara visitaram cidades das regiões norte, centro-oeste e sudeste do Brasil (Figura 9); tendo como objetivo a coleta de folhas e oleorresinas do maior número possível de espécies do gênero.

Figura 9. Locais pré-selecionados para coleta das espécies do gênero *Copaifera*, onde: (A) Cajuru-SP e Ribeirão Preto-SP, (B) Pirajuba-MG (C) Rio de Janeiro-RJ, (D) São Miguel Arcanjo-SP, (E) Nova Ubitatã-MT, (F) Belém-PA, (G) Brasil Novo-PA, (H) Belterra-PA, (I) Manacapuru-AM, (J) Mucajaí-RR e (K) Xapuri-AC.



Os procedimentos de coleta do material vegetal foram realizados do seguinte modo:

As partes aéreas foram coletadas através de podas de galhos. Em seguida, as folhas foram selecionadas, higienizadas em água potável e corrente, e refrigeradas ou congeladas. Posteriormente, o material vegetal foi seco em estufa com circulação forçada de ar da marca Fabbe (São Paulo-SP, Brasil) modelo 170 a 45°C e moído em moinho de facas SL 20 Solab

(Piracicaba-SP, Brasil) previamente higienizado, acondicionados em sacos plásticos de poliestireno de baixa densidade e mantido a -20°C.

As oleorresinas foram coletadas de modo tradicional, perfurando, com auxílio de um trado de 2", as árvores a 1 m do solo e até o centro do tronco. Nesta perfuração foi inserido um cano de aço inox ou um funil de coleta, por onde escorreu a oleorresina até o frasco coletor. As oleorresinas coletadas foram filtradas com filtro sintético de 120 µm, acondicionadas em frascos de vidro âmbar e mantidas sob refrigeração.

Ressalta-se que para as amostras coletadas na região amazônica, as etapas de preparo do material vegetal descritas nos dois parágrafos anteriores foram realizadas nas instalações do Centro de Valorização Agroalimentar de Compostos Bioativos da Amazônia da Universidade Federal do Pará (CVACBA-UFPA), sob supervisão do Prof. Dr. Hervé Rogez.

O material coletado (oleorresinas e folhas) foi enviado para o Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto USP (FCFRP-USP) para o desenvolvimento do Projeto Temático e das demais etapas de trabalho desta tese.

Por fim, todos os indivíduos coletados tiveram suas exsiccatas montadas em campo e enviadas para identificação taxonômica nas seguintes instituições: Laboratório de botânica da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária (EMBRAPA – Amazônia Oriental), Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Herbário SPFR - FFCLRP) ou Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ), onde cada espécie identificada recebeu um número de registro igual a de exemplares existente nos respectivos herbários. Os pesquisadores Dr^a. Regina Celia Viana Martins da Silva e MSc. Silvane Tavares Rodrigues (EMBRAPA), Dr. Milton Groppo Junior (Herbário SPFR) ou Haroldo Cavalcante de Lima (JBRJ) foram os profissionais responsáveis pela identificação taxonômica.

4.2 ESTUDO DAS OLEORRESINAS

4.2.1 Hidrodestilação das oleorresinas

A fração volátil (óleo volátil) das diferentes oleorresinas foi obtida por meio do processo de hidrodestilação, utilizando aparelho do tipo *Clevenger* de acordo com método descrito em *Métodos de Controle de Qualidade de Plantas Medicinais* (WHO, 2013), com adaptações.

Aproximadamente 50 g de cada oleorresina foram transferidas para um balão de fundo redondo contendo 500 mL de água destilada, o qual foi acoplado ao aparelho de *Clavenger* e ao condensador. O tempo de destilação foi de aproximadamente 12 horas ou até recuperação total do óleo volátil no hidrolato. O hidrolato resultante foi centrifugado a 3000 rpm por 5 min, separado da água residual, acondicionado em frasco âmbar de 30mL e pesados.

O rendimento de fração volátil em relação a cada oleorresina foi calculado por meio da Equação 1:

$$\text{Fração Volátil (\%)} = \left(\frac{m_{\text{FV}}}{m_{\text{OR}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde: m_{FV} e m_{OR} correspondem a massa da fração volátil extraída e a massa de oleorresina, respectivamente, utilizada no processo de hidrodestilação.

A mistura de resina e água que ficou no balão sofreu partição líquido:líquido com 100 mL (3x) acetato de etila destilado. A fração orgânica foi separada, filtrada na presença de sulfato de sódio anidro e concentrada com auxílio de evaporar rotativo da marca Fisatom (São Paulo-SP, Brasil), e por fim pesadas para o cálculo de rendimento. A fração resinosa foi disponibilizada para ensaios de atividade biológica realizados por outros membros do Projeto Temático.

4.2.2 Fracionamento das oleorresinas de *Copaifera*

O Núcleo de Pesquisa em Ciência e Tecnologia da Universidade de Franca ficou responsável pelo isolamento dos componentes das oleorresinas de copaíferas. Todavia, foi necessário o auxílio nesta etapa para assegurar o fornecimento de substâncias para o presente trabalho e demais estudos do nosso grupo de pesquisa, tendo em vista o grande volume de trabalhos desenvolvidos no Projeto Temático.

Em virtude do volume coletado, a oleorresina da espécie *C. duckei* Dwyer (**ORCd**) foi selecionada para as etapas de fracionamento e isolamento de metabólitos secundários utilizando cromatografia em fase líquida empregando-se coluna de vidro (coluna clássica) com dimensões 8,5 cm de diâmetro e 150 cm de altura, a qual empacotada com 400 g de sílica gel 60H (60-

230 mesh) Sigma-Aldrich (Steinhein, Alemanha), utilizando mistura de hexanos como veículo de empacotamento da fase estacionária.

Em uma cápsula de porcelana, 51,2 g de **ORCd** foram solubilizados em 50 mL acetato de etila, seguido de adição de 50 g de sílica gel 60H e homogeneizados. A mistura foi aquecida em placa de aquecimento para a remoção do solvente e a sílica seca incorporada com amostra foi aplicada no topo da coluna cromatográfica empacotada. Por fim, acima da sílica incorporada com a amostra foi colocada uma porção de algodão, a fim de se evitar suspensão da amostra de **ORCd** durante a adição da fase móvel (sistema de solventes).

O fracionamento de **ORCd** foi realizado conforme a sequência de eluição descrito na Tabela 3. Todas as frações obtidas ao fim do processo foram concentradas com auxílio de evaporador rotativo e suas respectivas massas resutantes foram aferidas para posterior cálculo de rendimento.

Tabela 3. Sistema de solventes utilizados no fracionamento da oleorresina de *Copaifera duckei* (**ORCd**).

Sistema de solvente*	Frações	Volume (mL)**
hexanos	ORCd-1	500
hexanos : acetato de etila (9:1)	ORCd-2	500
hexanos : acetato de etila (4:1)	ORCd-3	500
hexanos : acetato de etila (7:3)	ORCd-4	500
hexanos : acetato de etila (3:2)	ORCd-5	500
hexanos : acetato de etila (1:1)	ORCd-6	500
hexanos : acetato de etila (2:3)	ORCd-7	500
hexanos : acetato de etila (3:7)	ORCd-8	500
hexanos : acetato de etila (1:4)	ORCd-9	500
hexanos : acetato de etila (1:9)	ORCd-10	500
acetato de etila	ORCd-11	500
metanol	ORCd-12	500

Onde: *entre parênteses estão descritas as proporções aplicadas no fracionamento, ** o volume aplicado aplicado três vezes na coluna cromatográfica.

As frações obtidas foram analisadas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo analítico acoplado a detector de aerossol carregado (CORONA CAD) em fase reversa composto por: cromatógrafo de fase líquida Waters (Milford-MA, EUA) com bomba binária modelo 1525, pré-coluna e coluna Phenomenex Kinetex Biphenyl (100 mm x 4,6 mm x 2,6 µm) e detector CORONA CAD Thermo (Waltham-MA, EUA). A fase móvel foi composta por água acidificada a 0,1% (v/v) com ácido fórmico (Solução A) e acetonitrila adicionada com 3% (v/v) de éter metil terc-butílico (Solução B). O gradiente de eluição

empregado foi de 60 a 100% em 30 min, com vazão de 0,5 mL.min⁻¹ a 25°C e volume de injeção de 20 µL. Todo sistema foi controlado por meio do *software* Empower 3.

O detector CORONA CAD foi selecionado uma vez que as substâncias a serem investigadas são da classe dos terpenos (diterpenos), que não possuem grupo cromóforo; não sendo, então, indicado o emprego do detector de ultravioleta/visível. O CORONA CAD é um detector de aerossol que tem como característica principal a detecção de substâncias que são capazes de ionizar por meio ionização química e que possuem pressão de vapor superior aos solventes que compõe a fase móvel.

Soluções na concentração 1 mg.mL⁻¹ de cada fração foram preparadas, em acetonitrila, filtradas em membrana de 0,45 µm e injetada automaticamente no sistema cromatográfico.

4.2.3 Isolamento de constituintes das oleorresinas de *Copaifera*

As frações oriundas do processo de fracionamento (item 4.2.2) com perfil promissor foram selecionadas para o processo de isolamento dos principais constituintes químicos.

Diferentes técnicas de separação foram empregadas para o isolamento das substâncias contidas na oleorresina, tais como:

- a. Cromatografia em fase líquida em coluna de vidro clássica com maior proporção de fase estacionária em relação à amostra aplicada (1:100 amostra:sílica). A fase estacionária utilizada foi sílica-gel 60 H ou com menor tamanho de partícula e fase móvel composta de hexanos:acetato de etila em proporções de menor grandeza na mistura, por exemplo 2:98 ou 5:95; sendo coletado sub-frações em frasco de ampicilina de aproximada de 12 mL. Apesar da simplificação do perfil das frações, não foi possível isolar com pureza aceitável (> 90%) nenhum componente da oleorresina estudada.
- b. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCD) em placa de vidro 20 cm x 20 cm empregando fase móvel com composição de hexanos:acetato de etila:ácido fórmico (91,5:8:0,5), a qual foi previamente definido em teste com CCD analítica. A revelação foi realizada em uma faixa lateral delimitada com iodo sublimado, anilina sulfúrica ou anisaldeído; em ambos os casos, os reveladores não destacaram os locais nas placas cromatográficas onde se encontravam as substâncias presentes nas frações, logo não permitiu isolamento das substâncias de interesse.
- c. Cromatografia em camada delgada centrífuga utilizando o equipamento *Chromatotron*. Aproximadamente 200 mg diluídos em acetato de etila foram aplicados no centro do disco

cromatográfico com 4 mm de espessura e diâmetro do disco de 30 cm. O fluxo utilizado de fase móvel foi de aproximadamente 2 mL.min⁻¹ e a composta por hexanos:acetato de etila:ácido fórmico (91,5:8:0,5); frações de 12 mL foram coletadas e analisadas em CCD analítica. Assim como na técnica de CCD preparativa, não foi possível separar satisfatoriamente os componentes químicos das frações testadas; e.

d. Cromatografia líquida de alta eficiência em modo semipreparativa acoplado a detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD); sendo esta técnica capaz de auxiliar nessa etapa do trabalho de modo satisfatório. A análise do perfil cromatográfico de cada uma das frações obtidas foi comparada com a amostra de ORCd bruta para a seleção das frações que continham substâncias de interesse a serem isoladas.

A etapa de isolamento das substâncias das frações foi realizada em sistema semi-preparativo CLAE-UV/Vis equipado com cromatógrafo líquido Shimadzu (Quioto, Japão) com bomba binária modelo LC-6AD, degaseificador modelo DGU-20A₅, pré-coluna (10 mm x 10 mm x 4 µm) e coluna (250 mm x 10 mm x 4 µm) Synergi Polar RP Phenomenex (Torrance-CA, EUA), detector UV/Vis modelo SPD-20A Shimadzu com monitoramento a 205 nm e coletor automático modelo FCR-10A. A fase móvel empregada foi composta por água ultrapura (Solução A) e acetonitrila (Solução B) Merck (Darmstadt, Alemanha) ambas acidificadas com ácido fórmico a 0,1% (v/v). O gradiente de eluição empregado foi de 60 a 100% da solução B em 30 min com vazão de 7 mL.min⁻¹ a 25°C e volume de injeção de 100 µL. Todo sistema foi controlado por meio do *software* LCsolution Shimadzu.

As frações selecionadas para o isolamento foram diluídas em acetonitrila na concentração de aproximadamente 200 mg.mL⁻¹, filtradas em membrana de 0,45 µm e injetadas manualmente no sistema cromatográfico. Cada componente eluído da coluna foi recolhido separadamente em tubos de ensaio. As subfrações foram concentradas em evaporador rotativo modelo R-210 (com chiller modelo F-105 e bomba de vácuo modelo V-700) de marca Buchi (Flawil, Suíça) e por fim massas foram aferidas.

4.2.4 Purificação dos compostos isolados por cristalização

Utilizando balão de fundo redondo de 50 mL, cada substância isolada foi solubilizada em volume suficiente de acetona grau cromatográfico para solubilização total da amostra, seguida de adição de hexanos grau cromatográfico em pequenas quantidades até turvação da solução. A solução foi aquecida a 40°C até solubilização total do material suspenso. O balão

contendo a solução foi tampado e mantido a temperatura ambiente até a formação dos cristais. Por fim, o sobrenadante foi removido e os cristais recuperados, secos e tiveram suas massas pesadas.

4.2.5 Identificação estrutural das substâncias isoladas

As estruturas químicas das substâncias isoladas e purificadas da oleorresina de *C. duckei* foram identificadas por meio das técnicas de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) realizadas no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP).

Foram realizados experimentos de RMN unidimensional de ^1H e ^{13}C e bidimensional por meio das técnicas de *Heteronuclear Single-Quantum Correlation* (HSQC) e *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation* (HMBC) para identificação estrutural dos isolados; sendo os experimentos realizados em espectrômetro Bruker (Billerica, MA, EUA) modelo Avance DRX₅₀₀ operando 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C e DEPT 135.

A massa utilizada nos experimentos foi de aproximadamente 10 mg de cada substância isolada e o solvente utilizado foi clorofórmio deuterado (CDCl_3) Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, EUA).

Os espectros gerados foram tratados com auxílio do software Metrenova versão 6.2.0 Mestre Lab Research.

4.2.6 Análise das oleorresinas por CG-EM

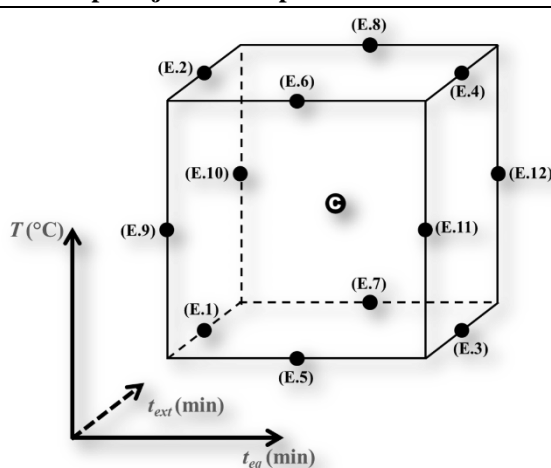
Os componentes voláteis das oleorresinas de *Copaifera* foram captados utilizando fibra de micro extração em fase sólida (MEFS, do inglês *Solid Phase Micro Extraction - SPME*) e analisados individualmente por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) no laboratório de espectrometria de massas do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP), de acordo com metodologia descrita por Adams (2007) com adaptações.

As melhores condições de extração dos componentes voláteis das amostras das oleorresinas foram definidas através de experimento estatístico empregando o *design* do tipo Box-Benhken (FERREIRA et al., 2015; D'AGOSTINO et al., 2015) para os seguintes fatores

independentes: tempo de equilíbrio da amostra nas condições de extração antes da extração (t_{eq}) em 5, 10 ou 15 min; tempo de extração (t_{ext}) em 15, 30 ou 45 min; e temperatura de extração da amostra (T) a 40, 50 ou 60°C. O total de 15 experimentos (Tabela 4), incluindo triplicata no ponto central, foram realizados aleatoriamente e as respostas consideradas foram número de picos (sinais cromatográficos) e área total dos picos dos cromatogramas em cada experimento realizado (D'AGOSTINO et al., 2015).

Tabela 4. Planejamento experimental do tipo Box-Benhken para um sistema de três variáveis empregado na análise dos componentes voláteis por MEFS-CG-EM das oleorresinas.

Desenho cúbico do planejamento experimental Box-Behnken empregado



Experimentos	t_{eq} (min)	t_{ext} (min)	T (°C)
E.1	-1 (5)	0 (30)	-1 (40)
E.2	-1 (5)	0 (30)	1 (60)
E.3	1 (15)	0 (30)	-1 (40)
E.4	1 (15)	0 (30)	1 (60)
E.5	0 (10)	-1 (15)	-1 (40)
E.6	0 (10)	-1 (15)	1 (60)
E.7	0 (10)	1 (45)	-1 (40)
E.8	0 (10)	1 (45)	1 (60)
E.9	-1 (5)	-1 (15)	0 (50)
E.10	1 (15)	-1 (15)	0 (50)
E.11	-1 (5)	1 (45)	0 (50)
E.12	1 (15)	1 (45)	0 (50)
C	0 (10)	0 (30)	0 (50)
C	0 (10)	0 (30)	0 (50)
C	0 (10)	0 (30)	0 (50)

Entre parênteses estão descritos os valores reais utilizados nos experimentos para cada um dos fatores.

Inicialmente foram testadas fibras MEFS dos tipos polidimetilsiloxano – PDMS (100 μm x 1,0 cm), carboxen-polidimetilsiloxano – CAR-PDMS (75 μm x 1,0 cm) e polidimetilsiloxano-divinibenzeno – PDMS-DVB (65 μm x 1,0 cm) todas da marca Supleco

Inc. (Bellefonte-PA, EUA) nas condições do ponto central do *design* experimental Box-Banhen ($t_{eq} = 10$ min, $t_{ext} = 30$ min e $T = 50^{\circ}\text{C}$), para a escolha da melhor fibra extratora dos compostos voláteis das amostras de oleorresinas. A amostra testada foi constituída de uma mistura (*Pool*) de cada oleorresina autêntica adquirida em campo. Cem miligramas do *Pool* foram transferidos para um frasco de 4 mL com tampa contendo septo de teflon e mantidos nas condições do ponto central experimental e sob agitação constante (400 rpm). Todas as fibras testadas foram previamente condicionadas antes do uso seguindo recomendações do fabricante até que não houvesse mais sinais cromatográficos após o condicionamento das fibras.

Em seguida, cada fibra foi inserida manualmente no injetor do cromatógrafo de fase gasosa para dessorção térmica dos compostos voláteis por um período padronizado de 3 min e transferência para o sistema cromatográfico equipado com: cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu modelo GC-2010 (Tokyo, Japão), coluna RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) Restek Corporation (Bellefonte-PA, USA), acoplado a um espectrômetro de massas equipado com uma fonte de ionização por elétrons e um analisador de massas do tipo quadrupolo GCMS-Q P2010 Plus Shimadzu. A injeção foi realizada no modo Split na razão de 1:100. O gás Hélio (99,999%) foi utilizado como gás de arraste na vazão de 1 mL.min⁻¹. A programação da rampa de temperatura da coluna foi: 60°C a 300°C com taxa de 3°C.min⁻¹, sendo 250°C a temperatura do injetor e detector.

Após a definição do tipo de fibra e das melhores condições experimentais empregando a microextração em fase sólida; aproximadamente 100 mg de cada oleorresina, autênticas e amostras comerciais, foram analisadas separadamente nas condições cromatográficas descritas anteriormente.

A aquisição e tratamento dos resultados experimentais foram realizadas por meio do programas GC Solution (Kyoto, Japão) e Microsoft Excel (Albuquerque-NM, EUA). A identificação dos compostos voláteis foi feita por comparações dos espectros de massas existentes nas bibliotecas espectrais *Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds* (FFNSC), *Wiley Library*, *National Institute of Standards and Technology* (NIST Webbook), com o índice de retenção calculado (Equação 2) experimentalmente utilizando mistura de série homóloga de hidrocarbonetos de C8-C40 (misturas de C8-C20 e C21-C40, Sigma-Aldrich) (CLEMENT, 1990) e comparação com os valores de índice de retenção descritos na literatura disponível *online* no *National Institute of Standards and Technology* – NIST e *The Pherobase*. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa de cada substância em relação a área total do cromatograma de cada amostra.

$$IR = \left[\frac{100 \times \text{Log}(tr_x - tr_{cn-1})}{\text{Log}(tr_{cn} - tr_{cn-1})} \right] + 100 \times C_{n-1} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde: tr_x é o tempo de retenção do analito de interesse, tr_{cn} é o tempo de retenção do hidrocarboneto com maior tempo, tr_{cn-1} é o tempo de retenção do hidrocarboneto com menor tempo, C_n é o número de carbono do hidrocarboneto com maior tempo, e C_{n-1} é o número de carbono do hidrocarboneto com menor tempo.

4.2.7 Análise das frações voláteis por CG-EM

As frações voláteis obtidas na hidrodestilação (seção 4.2.1) das oleorresinas das espécies de *Copaifera* foram analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) no laboratório de espectrometria de massas da FFCLRP-USP, de acordo com metodologia descrita por Adams (2007) com adaptações.

O volume de 1 μL de fração volátil de cada oleorresina (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em acetato de etila grau cromatográfico Sigma-Aldrich foi analisado em cromatógrafo de fase gasosa modelo GC-2010 equipado com injetor automático AOC-20i ambos da marca Shimadzu, coluna cromatográfica RTX-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) Restek (Bellefonte-PA, USA), acoplado a um espectrômetro de massas equipado com uma fonte de ionização por elétrons e um analisador de massas triplo quadrupolo (GCMS-Q P2010 Plus Shimadzu). A injeção foi realizada no modo Split na razão de 1:70. O gás Hélio (99,999%) foi utilizado como gás de arraste na vazão de 1 mL.min^{-1} . A programação da rampa de temperatura da coluna foi da seguinte forma: 60°C a 300°C com taxa de 3°C.min⁻¹, sendo 250°C a temperatura do injetor e detector.

Os resultados experimentais foram tratados conforme a análise das frações voláteis descrita na seção 4.2.6.

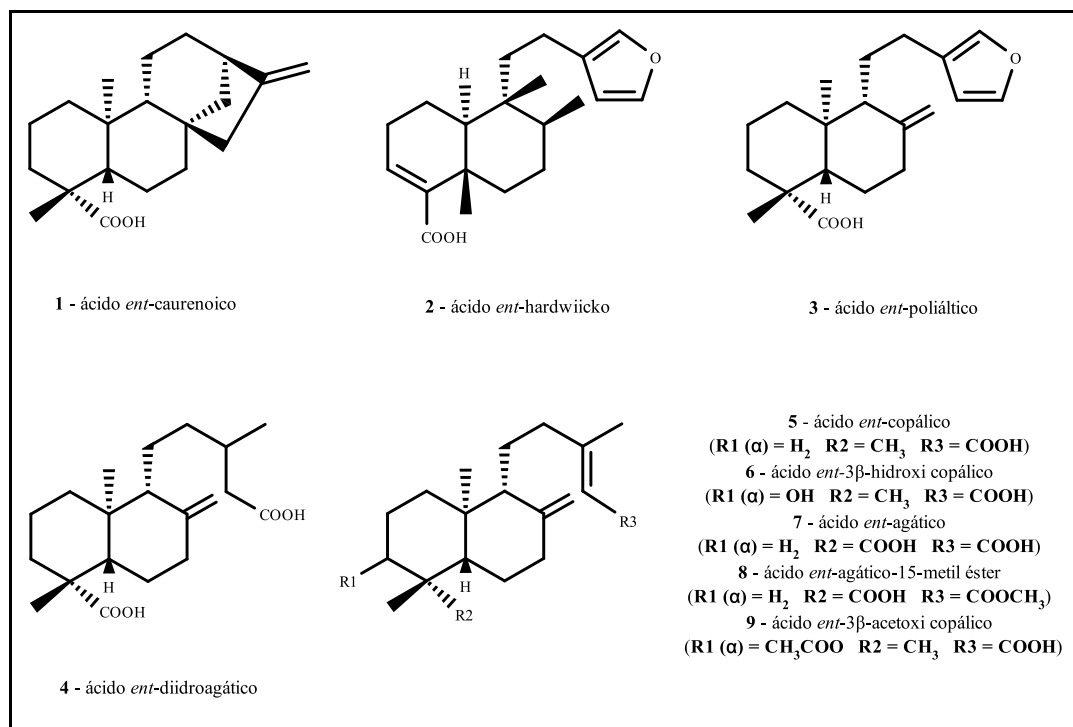
4.2.8 Desenvolvimento do método CLUE-EM/EM para análise de diterpenos em oleorresinas de *Copaifera*

O desenvolvimento do método analítico utilizando cromatógrafo em fase líquida de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas (CLUE-EM) teve por objetivo fornecer uma ferramenta analítica para identificar e quantificar diterpenos ácidos presentes em diferentes oleorresinas coletadas e comercializadas no Brasil.

Nove ácidos diterpênicos (Figura 10) foram isolados de diferentes oleorresinas e utilizados para desenvolvimento do método, sendo eles: [1] ácido *ent*-caur-16-en-18-óico (ácido *ent*-caurenoico), [2] ácido *ent*-15,16-epoxi-3,13(16),14-clerodatrieno (ácido *ent*-hardwiicko), [3] ácido *ent*-15,16-epoxi-8(17),13(16),14-labdatrien-19-óico (ácido *ent*-poliáltico), [4] ácido *ent*-8(17),labden-15,19-dióico (ácido *ent*-diidroagático), [5] ácido *ent*-8(17),13-labdadien-15-óico (ácido *ent*-copálico), [6] ácido *ent*-3 β hidroxi-labda-8(17),13-dien-15-óico (ácido *ent*-3 β -hidroxi copálico), [7] ácido *ent*-8(17),labden-15,19-dióico (ácido *ent*-agático), [8] ácido *ent*-8(17),13-labdadien-15,19-dióico-15-metil éster (ácido *ent*-agático-15-metil éster), e [9] ácido *ent*-3 β -acetoxi-labda-8(17),13-dien-15-óico (ácido *ent*-3 β -acetoxi copálico). Ressalta-se que os compostos 3, 4 e 8 foram adquiridos segundo descrição nas seções 4.2.3 e 4.2.4; e as demais substâncias presentes nas outras oleorresinas coletadas foram gentilmente fornecidas pela equipe dos Professores Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio e Dr. Vladimir Constantino Gomes Heleno da Universidade de Franca (UNIFRAN).

A seguir são descritas as etapas do desenvolvimento do referido método, destacando que os parâmetros de verificação do método proposto foram balizados através de instruções e procedimentos contidos em guias de validação de procedimentos analíticos de agências reguladores nacionais e internacionais, bem como a literatura científica apropriada (BRASIL, 2003; ICH, 2005; KRUIVE et al., 2015a,b).

Figura 10. Estrutura química dos nove ácidos diterpênicos utilizados para desenvolver o método CLUE-EM/EM.



4.2.8.1 Condições Cromatográficas

As substâncias isoladas e as oleorresinas foram analisadas em sistema Acquity CLUE acoplado ao espectrômetro de massas tandem quadrupolo Xevo[®] TQ-S ambos da marca Waters (Milford, MS, USA), equipado com fonte de ionização Z-spray operando em modo negativo de análise, pré-coluna (5 x 4,6 mm, 2,7 μm) e coluna analítica (100 x 4,6 mm, 2,7 μm) Ascentis[®] Express C18 da marca Sulpeco (Bellefonte, PA, USA).

Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização Z-spray foram: voltagem do capilar = -2,5 kV, temperatura da fonte Z-spray = 150°C, temperatura de dessolvatação do gás N₂ = 350°C, e vazão do gás de dessolvatação = 600 L.h⁻¹; sendo o sistema controlado através do *software* MassLynx (versão 4.1).

A fase móvel foi composta por água ultrapura com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (Solução A), metanol Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha) com 0,1% (v/v) de NH₄OH (Solução B) e acetonitrila Merck Millipore com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (Solução C). O modo de eluição foi em gradiente conforme Tabela 5, com vazão de 0,5 mL.min⁻¹, volume de injeção de 10 μL, temperatura de 40°C e o tempo total do desenvolvimento cromatográfico de 12 min.

Tabela 5. Gradiente da fase móvel estabelecido para análise cromatográfica.

Tempo (min)	Vazão (mL.min ⁻¹)	Solução A	Solução B	Solução C
0:00	0,50	40,0	55,0	5,0
5:00	0,50	5,0	92,0	3,0
12:00	0,50	5,0	92,0	3,0
13:00*	0,50	40,0	55,0	5,0
18:00*	0,50	40,0	55,0	5,0

Onde: *Tempo de condicionamento do sistema cromatográfico para novas injeções.

As respostas do sistema foram obtidas por meio de experimentos no sistema CLUE-EM/EM realizados nos modos *single ion reaction* (SIR) e *multiple reation monitoring* (MRM) por dissociação induzida por colisão (*colision induced dissociation* – CID) e utilizando argônio como gás de colisão para os íons precursores de interesse. As energias de colisão e as voltagens do cone foram otimizadas a fim de obter a melhor sensibilidade para cada diterpeno ácido de interesse, sendo os resultados dos experimentos sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros do espectrômetro de massas para análise de nove diterpenos.

Analito	t _r (min)	Massa nominal (u)	Modo EM	Íon Precursor (m/z)	Canal	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
Ácido <i>ent</i> -caurenoico	8,82	302,2	SIR	301	301	98	-
Ácido <i>ent</i> -hardwiicko	7,26	316,2	MRM	315	315 > 271	50	20
Ácido <i>ent</i> -poliáltico	7,30	316,2	MRM	315	315 > 205	45	35
Ácido <i>ent</i> -diidroagático	6,63	336,2	MRM	335	335 > 317	40	25
Ácido <i>ent</i> -copálico	7,90	304,2	SIR	303	303	82	-
Ácido <i>ent</i> -3β-hidroxi-copálico	6,79	320,2	MRM	319	319 > 217	50	25
Ácido <i>ent</i> -agático	6,52	334,4	MRM	333	333 > 273	40	25
Ácido <i>ent</i> -agático-15-metil-éster	7,18	348,2	MRM	347	347 > 273	50	25
Ácido <i>ent</i> -3β-acetoxi-copálico	7,20	362,2	MRM	361	361 > 319	50	20
PI	2,41	194,1	MRM	193	193 > 134	50	15

Onde: **tr** é o tempo de retenção, **EM** é o espectrômetro de massa, e **PI** é o padrão interno (ácido ferúlico).

4.2.8.2 Curvas analíticas

Foram preparadas soluções na concentração de 1 mg.mL⁻¹ de cada diterpeno e a partir destas produziu-se uma mistura com as nove substâncias (*Pool*) em diferentes concentrações, que dependeram da sensibilidade dos mesmos às condições analíticas propostas. O *Pool* sofreu diluições de modo que as soluções resultantes apresentavam concentrações equidistantes. Por fim, cada solução diluída gerada, *pontos da curva analítica*, foi acrescida de padrão interno (PI), o ácido ferúlico, na concentração de 0,25 µg.mL⁻¹.

As curvas analíticas foram descritas correlacionando a concentração de cada *ponto* (nível de concentração) com sua respectiva resposta analítica, que foi a razão entre a área da substância de interesse no determinado *ponto* da curva pela área do padrão interno. As curvas seguiram o modelo de equação linear (Equação 3). Os dados experimentais foram coletados, tratados e analisados utilizando os programas MassLynx (versão 4.1), Target Lynx (versão 4.1), Microsoft Excel (versão 2013) e Statistica (versão 13).

$$y = ax + b \quad \text{Equação (3)}$$

Onde: **y** foi a resposta, **a** coeficiente angular (inclinação), **x** concentração em microgramas por mililitros (µg.mL⁻¹) e **b** o coeficiente linear (intersecção).

4.2.8.3 Preparo das amostras

As amostras analisadas foram oleorresinas autênticas de *C. langsdorffi* Desf., *C. duckei* Dwyer, *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. paupera* (Herzog) Dwyer, *C. pubiflora* Benth, *C. trapezifolia* Hayne, *C. oblongifolia* Mart, *C. lucens* Dwyer e *Copaifera sp.* coletada na cidade de Belterra-PA, bem como seis amostras de oleorresinas comercializadas no mercado brasileiro, codificadas de C-I a C-VI.

Soluções de 1 mg.mL⁻¹ de cada oleorresina foram preparadas em metanol grau cromatográfico. Em seguida, as soluções foram diluídas para as concentrações de 10, 100 e 250 µg.mL⁻¹, as quais foram filtradas com membrana de 0,22 µm de porosidade, adicionadas com padrão interno na concentração de 0,25 µg.mL⁻¹ e acondicionadas em frascos de 1,5 mL (vial) sob refrigeração até o momento das injeções no sistema cromatográfico.

4.2.8.4 Parâmetros de verificação do método CLUE-EM/EM

O método desenvolvido CLUE-EM/EM para identificação e quantificação de nove ácidos diterpenos em oleorresinas das espécies de *Copaifera* teve a sua confiabilidade verificada por meio dos seguintes parâmetros recomendados por guias de validação de métodos analíticos de agências nacionais e internacionais (ANVISA, 2003; ICH, 2005; FDA, 2015; KRUYE et al., 2015a,b):

4.2.8.4.1 Especificidade/Seletividade

A seletividade do método foi verificada definindo-se os parâmetros operacionais do espectrômetro de massas por meio dos experimentos de EM no modo SIR e de EM/EM no modo MRM, sendo ambos realizados em modo de ionização negativo.

Soluções de trabalho na concentração de 100 ng.mL⁻¹ de cada uma das substâncias investigadas foram injetadas separadamente nas condições cromatográficas descritas no item 4.2.8.1. Os parâmetros de operação do espectrômetro de massas foram: voltagem do cone de ionização, razão massa carga (m/z) das substâncias ionizadas, energia de colisão para o modo MRM e m/z dos íons precursor e produto para os distintos canais de monitoramento; como sendo os fatores que permitiram o diagnóstico dos diferentes ácidos diterpenos pesquisados nas amostras de oleorresinas de espécies *Copaifera*. Os dados utilizados para o diagnóstico e identificação das nove substâncias estão descritos na Tabela 6 (página 61).

4.2.8.4.2 Linearidade

A linearidade do método para cada substância foi verificada por meio das curvas analíticas construídas a partir de diferentes níveis de concentração, que dependeram da sensibilidade de cada substância às condições analíticas propostas; sendo cada nível de concentração da curva analisado em triplicada em três dias consecutivos. As curvas seguiram o modelo de equação linear conforme descrito no item 4.2.8.2 e sem o uso de fator de peso/ponderação para as respostas analíticas.

É importante salientar que para melhor ajuste das equações matemáticas para as distintas substâncias foi necessário, em alguns casos, a remoção de algumas replicatas ou níveis de concentração das curvas. Contudo, todas as curvas analíticas apresentaram número de pontos igual ou superior a seis ($n \geq 6$).

As medidas de avaliação da linearidade foram: o coeficiente de correlação (r) e o valor percentual dos resíduos das repetições nos *pontos* para cada curva, sendo este último estimado com auxílio dos programas computacionais Microsoft Excel (versão 2013) e Statistica (versão 13). (KRUVE et al., 2015).

4.2.8.4.3 Faixa de trabalho

A faixa linear de trabalho adotada para todas as substâncias investigadas compreendeu o intervalo de concentração entre o limite de quantificação e o nível de maior concentração ou limite superior de quantificação das curvas analíticas construídas.

4.2.8.4.4 Limite de detecção (LOD)

O limite de detecção (LOD) foi estimado por meio dos dados obtidos nas curvas analíticas de cada uma das substâncias estudadas, uma vez que não se realizou aferições dos analitos até o menor nível de concentração detectável nas condições analíticas empregadas. Desta forma, os **LOD** foram calculados por meio da seguinte Equação (4) descrita por ICH, (2005) e KRUVE et al. (2015a).

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{s}{b} \qquad \text{Equação (4)}$$

Onde: **s** é o desvio padrão do coeficiente linear (interseção da curva), e **b** é a média dos valores do coeficiente angular (inclinação) de três repetições das curva analíticas.

4.2.8.4.5 Limite de quantificação (LOQ)

Os menores níveis de concentração quantificáveis dos analitos foram estimados também a partir dos dados obtidos nas curvas analíticas e calculados por meio da Equação 5 (ICH, 2005; KRUVE et al., 2015a).

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{s}{b} \quad \text{Equação (5)}$$

Onde: s é o desvio padrão do coeficiente linear (interseção da curva), e b é a média dos valores do coeficiente angular (inclinação) de três repetições das curva analíticas.

4.2.8.4.6 Precisão

Esta figura de mérito foi estimada em termos de repetitividade (precisão intra-dias) e precisão intermediária (precisão inter-dias). Para tanto, foram adotados três níveis de concentração das curvas analíticas, denominados de níveis *baixo*, *médio* e *alto*, os quais foram definidos individualmente para cada substância em estudo e analisados no sistema CLUE-EM com cinco repetições em três dias consecutivos.

As precisões intra-dias e inter-dias foram expressas individualmente para cada ponto de controle (nível de concentração) por meio do desvio padrão relativo [DPR (%)], segundo a Equação 6 (PACHOAL et al., 2008; KRUIVE et al., 2015b).

$$\text{DPR (\%)} = \left(\frac{s}{\bar{X}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

Onde: s é o desvio padrão e \bar{X} a média dos valores experimentais das repetições em cada nível de concentração.

4.2.8.4.7 Exatidão

A exatidão do método CLUE-EM/EM desenvolvido foi estimada utilizando o recurso da adição de padrão conforme sugerido por Ribani et al. (2004), uma vez que não havia amostras de oleorresinas isentas de todos os diterpenos ácidos investigados neste trabalho.

Desta forma, realizou-se o seguinte experimento para estimativa deste parâmetro dentro do contexto apresentado no parágrafo anterior. Inicialmente, foram preparadas soluções contendo todos os diterpenos ácidos em três níveis de concentrações diferentes, que

deponderam da sensibilidade de cada uma das substâncias ao método proposto. Em seguida, selecionaram-se três oleorresinas de espécies que em análises prévias apontaram em conjunto a presença das nove substâncias estudadas, sendo estas *C. reticulata*, *C. multijulga* e *C. paupera*. Então, cada oleorresina foi diluída e acrescida separadamente de solução com a mistura dos diterpenos ácidos e mais solução de padrão interno na mesma concentração dos pontos das curvas analíticas. Por fim, as oleorresinas fortificadas com cada uma das soluções foram então analisadas em triplicata nas condições metodológicas desenvolvidas.

A exatidão foi mensurada de acordo com a Equação 7 e os resultados foram expressos em porcentagem adotando como referência o valor teórico calculado das respostas analíticas:

$$\text{Exatidão (\%)} = \left(\frac{\text{RE}}{\text{RT}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

Onde: **RE** é a resposta experimental e **RT** é a resposta teórica calculada a partir das equações das curvas analíticas.

4.2.8.4.8 Robustez

O parâmetro da robustez do método foi determinado variando os seguintes fatores e condições: temperatura de eluição das amostras no sistema cromatográfico de 37 a 40°C, e teor dos aditivos (ácido fórmico e hidróxido de amônio) das soluções da fase móvel de 0,05 a 0,10%.

Para cada condição foram realizadas análises, em triplicata, com a mistura das nove substâncias de interesse em três níveis de concentrações: 0,125, 0,275 e 0,350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o ácido *ent*-caurenoico, 0,625, 1,375 e 1,75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para os ácidos *ent*-copálico e *ent*-agático-15-metil éster, e 1,25, 2,75 e 3,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para as demais analitos.

As mudanças propostas para os fatores foram avaliadas por meio do tempo de retenção e das respostas analíticas para cada um dos diterpenos ácidos. Os dados experimentais coletados foram tratados por meio de análise de variância ANOVA e teste *t* com valor de $p < 0,05$ para resultados considerados significativos usando o programa Statistica (versão 13), sendo os resultados apresentados na forma de média das respostas \pm desvio padrão com categorização por letras minúsculas para cada resposta.

4.2.8.5 Aplicação do método

Em seguida ao desenvolvimento, otimização e validação do método, dezesseis amostras de oleorresinas de *Copaifera*, sendo 10 oleorresinas autênticas e seis comerciais, foram analisadas no sistema CLUE-EM/EM.

Os resultados qualitativos e quantitativos obtidos de todas as amostras foram analisadas aplicando métodos estatísticos e análise multivariada utilizando o *software* Statistica 13 (Tulsa-OK, EUA). Para tanto, inicialmente, os resultados de concentração de cada analito em cada amostra de oleorresina foram combinados em uma matriz com 48 casos e normalizados pelo método de Pareto, conforme recomendações descritas por Van den Berg et al. (2006). Por fim, os dados padronizados foram analisados com Análise de Componentes Principais (PCA) para comparação entre as amostras investigadas.

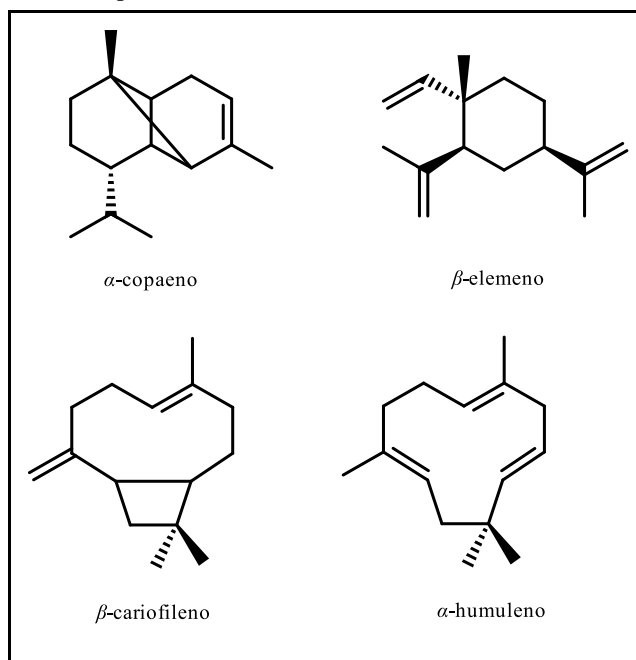
O objetivo do uso da PCA foi determinar as semelhanças químicas e o conteúdo de diterpenos entre as amostras de oleorresina estudadas. Além disso, os dados experimentais adquiridos de todas as amostras foram analisados utilizando a análise de variância unidirecional (ANOVA), seguido do teste pós-teste de Tukey para determinar diferenças significativas entre as amostras de oleorresina, sendo valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

4.2.9 Desenvolvimento do método CG-DIC para análise de sesquiterpenos em oleorresinas de *Copaifera*

O desenvolvimento do método analítico empregando cromatógrafo de fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) para determinação de quatro importantes sesquiterpenos na oleorresina de *Copaifera* foi uma segunda proposta de ferramenta analítica para investigação desse produto natural, tendo agora como objetivo a investigação dos componentes voláteis.

Inicialmente foram adquiridos padrões analíticos comerciais de β -cariofileno e α -humuleno da empresa Sigma-Aldrich (Steinhein, Alemanha). Os demais sesquiterpenos, α -copaeno e β -elemeno (Figura 11), foram gentilmente cedidos pelo mestrando Victor Pena Ribeiro, uma vez que o mesmo isolou diferentes sesquiterpenos de óleos voláteis extraídos de oleorresinas de *C. multijuga* e *C. paupera*.

Figura 11. Estrutura química dos quatro sesquiterpenos utilizados para desenvolver o método CG-CID.



As etapas de desenvolvimento do método CG-DIC são descritas nas próximas seções, adotando como referências procedimentos analíticos sugeridos por agências reguladoras nacionais e internacionais, bem como a literatura científica apropriada (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

4.2.9.1 Condições cromatográficas

O desenvolvimento do método CG-DIC e análise das amostras de oleorresinas de *Copaifera* foram realizadas utilizando cromatógrafo de fase gasosa da Agilent Technologies (Santa Clara-CA, EUA) modelo 6890N equipado com: injetor manual operado em modo split com razão 1:40, coluna capilar HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m) também de marca Agilent e detector por ionização em chama. A mistura de gases foi composta por ar sintético, $N_{2(g)}$ e $H_{2(g)}$ e a evolução da temperatura foi programada conforme descrito na Tabela 7, sendo a temperatura do injetor e do detector 250°C e fluxo de fase móvel de 1 mL.mL⁻¹. Todo o sistema foi operado por meio do *software* HPCORE ChemStation.

O volume de injeção dos níveis de concentração de cada curva analítica e das soluções de amostras foi de 1 μ L.

Tabela 7. Programação da temperatura utilizada no método CG-DIC.

Taxa (°C.min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Manutenção (min)	Tempo (min)
-	120	0,00	0,00
3,00	146	1,00	9,67
3,00	149	1,00	11,67
1,00	150	1,00	13,67
3,00	170	0,00	20,34
5,00	205	0,00	27,34
Post run*	300	2,00	29,34

Onde: *Tempo de condicionamento do sistema cromatográfico para novas injeções.

4.2.9.2 Curvas analíticas

Soluções 5 mg.mL⁻¹ em hexanos grau cromatográfico Tedia (New York, EUA) de cada sesquiterpeno foram preparadas. Em seguida, alíquotas de cada uma destas soluções foram reunidas (*Pool*) e diluídas, gerando soluções nas concentrações de 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 µg.mL⁻¹, as quais foram acrescida de 100 µg.mL⁻¹ de padrão interno 1,2,4,5-tetrametilbenzeno 98% (TMB) Sigma-Aldrich (Steinhein, Alemanha).

As curvas analíticas foram descritas correlacionando a concentração de cada *ponto* com sua respectiva resposta analítica, que foi a razão entre a área da substância de interesse no determinado *ponto* da curva pela área do padrão interno. As curvas seguiram o modelo de equação linear do tipo $y = ax + b$, onde y foi a resposta analítica (área do analito/área do TMB), a coeficiente angular (inclinação), x concentração em micrograma por mililitros (µg.mL⁻¹) e b o coeficiente linear (interseção). Os dados experimentais foram coletados, tratados e analisados utilizando os programas HPCORE ChemStation, Microsoft Excel (versão 2013) e Statistica (versão 7.1).

4.2.9.3 Preparo das amostras

Soluções nas concentrações de 1, 2 e 3 mg.mL⁻¹ de cada oleorresina autêntica ou comercial foram preparadas em mistura de hexanos:acetato de etila (9:1) grau cromatográfico. Em seguida, as soluções foram filtradas com membrana de 0,22 µm de porosidade, adicionadas com padrão interno na concentração de 100 µg.mL⁻¹ e acondicionadas em frascos de 1,5 mL (vial) sob refrigeração até o momento das injeções.

As amostras analisadas foram oleorresinas de *C. langsdorffi* Desf., *C. duckei* Dwyer, *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. paupera* (Herzog) Dwyer, *C. pubiflora* Benth, *C. trapezifolia* Hayne, *C. oblongifolia* Mart e *Copaifera sp.*; além de seis amostras comerciais

adquiridas no mercado brasileiro. Infelizmente a amostra de oleorresina de *C. lucens* sofreu contaminação durante o armazenamento, e desta forma foi descartada; não sendo avaliada quanto ao teor α -copaeno e β -elemeno, β -cariofileno e α -humuleno.

4.2.9.4 Parâmetros de validação

Os parâmetros de desempenho do método CG-DIC para análise de quatro sesquiterpenos em oleorresinas das espécies de *Copaifera* foram os seguintes:

4.2.9.4.1 Seletividade

A seletividade para o método CG-DIC desenvolvido foi definida através da comparação do perfil cromatográficos dos quatro padrões de sesquiterpenos individualmente com as amostras de oleorresinas, somado a avaliação das seguintes respostas: tempo de retenção (t_r), largura da base (w_b), número de pratos teóricos de cada sinal cromatográfico (N), fator de separação (α) e resolução cromatográfica (R_s), sendo os três últimos calculados aplicando as Equações 8, 9 e 10, respectivamente (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; KRUIVE et al., 2015a).

$$N = 16 \times \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2 \quad \text{Equação (8)}$$

$$\alpha = \frac{t_{r2}}{t_{r1}} \quad \text{Equação (9)}$$

$$R_s = \frac{2 \times (t_{r2} - t_{r1})}{(w_{b1} + w_{b2})} \quad \text{Equação (10)}$$

4.2.9.4.2 Linearidade

A linearidade para os quatro sesquiterpenos foi determinada por meio das curvas analíticas construídas a partir de diferentes níveis de concentração adicionadas do padrão interno TMB, onde cada nível de concentração foi injetado em triplicada em três dias consecutivos. As curvas seguiram o modelo de equação linear conforme descrito na seção 4.2.9.2, e sem o uso de fator de peso/ponderação para as respostas analíticas.

As medidas de avaliação da linearidade foram: o coeficiente de regressão (r) e o valor percentual dos resíduos das repetições nos pontos das curvas (KRUIVE et al., 2015b).

4.2.9.4.3 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho para o método CG-DIC foi definida como a amplitude de concentração entre o limite de quantificação e o nível de maior concentração ou limite superior de quantificação das curvas analíticas construídas.

4.2.9.4.4 Limite de detecção (LOD)

O limite de detecção para cada sesquiterpeno foi calculado a partir dados das curvas analíticas utilizando a Equação 4 (ICH, 2005 e KRUIVE et al., 2015a), descrita na seção 4.2.8.4.4.

4.2.9.4.5 Limite de quantificação (LOQ)

O limite de quantificação (LOQ) para cada analito foi calculado a partir dados das curvas analíticas empregando a Equação 5 (ICH, 2005 e KRUIVE et al., 2015a), descrita na seção 4.2.8.4.5.

4.2.9.4.6 Precisão

A precisão foi estimada através da repetitividade (precisão intra-dias) e precisão intermediária (precisão inter-dias) entre três nível de concentração das curvas analíticas: *baixo*, *médio* e *alto* com 100, 300 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentração, respectivamente. Cada nível de concentração foi injetado no CG-DIC em cinco repetições por três dias consecutivos.

As precisões intra- e inter-dias foram expressas individualmente para cada ponto (nível de concentração) por meio do desvio padrão relativo [DPR (%)], de acordo com Equação (6) apresentada na seção 4.2.8.4.6 (PACHOAL et al., 2008; KRUBE et al., 2015b).

4.2.9.4.7 Exatidão

A exatidão do método CG-DIC foi estimada através do procedimento de fortificação (adição de padrão interno) de uma amostra contendo mistura de oleorresinas autênticas (*Pool*) com três níveis crescente de concentração da mistura de padrões de sesquiterpenos, adicionado também com padrão interno na mesma concentração aplicada nos *pontos* da curva (RIBANI et al., 2004).

A exatidão foi mensurada conforme cálculos descritos na seção 4.2.8.4.7 (Equação 7), e os resultados foram expressos em porcentagem tomando como referência o valor teórico calculado das respostas analíticas.

4.2.9.4.8 Robustez

A figura de mérito robustez do método CG-DIC para análise de α -copaeno e β -elemeno, β -cariofileno e α -humuleno em amostras oleorresina de *Copaifera* foi determinada seguindo planejamento experimental fatorial proposto por Plackett-Burman e descrito por Heyden et al. (2001) nas concentrações de 100, 300 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, avaliando os seguintes fatores: temperatura do injetor ($^{\circ}\text{C}$), *split* – divisão da amostra no injetor, temperatura inicial e final do forno ($^{\circ}\text{C}$), temperatura do detector ($^{\circ}\text{C}$), vazão da fase móvel ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e vazão do $\text{N}_{2(\text{g})}$ ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) em dois níveis (-1 e +1) (Tabela 8).

Tabela 8. Fatores e planejamento experimental tipo Plackett-Burman usado para robustez do método CG-DIC.

Fator	Descrição do fator	Variação	Nível (-1)	Nominal (0)	Nível (+1)
A	Temperatura do injetor (°C)	± 5	245	250	255
B	Split (divisão de amostra)	± 2	1:38	1:40	1:42
C	Temperatura inicial do forno (°C)	± 5	115	120	125
D	Temperatura final do forno (°C)	± 5	205	210	215
E	Temperatura do detector (°C)	± 5	245	250	255
F	Fluxo de fase móvel (mL.min ⁻¹)	± 0,1	1,9	2,0	2,1
G	Vazão de N _{2(g)} (mL.min ⁻¹)	± 2	38	40	42

Experimento	Fatores							Resposta
	A	B	C	D	E	F	G	
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	R ₁
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	R ₂
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	R ₃
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	R ₄
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	R ₅
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	R ₆
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	R ₇
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	R ₈

Oito experimentos foram realizados (em triplicata) e ao término dos mesmos foram consideradas as respostas (*R*): tempo de retenção e resposta analítica para cada sesquiterpeno separadamente. A partir das respostas, calculou-se o efeito para cada fator conforme Equação 11:

$$E_x = \left(\frac{\sum y(+)}{n/2} - \frac{\sum y(-)}{n/2} \right) \quad \text{Equação (11)}$$

Onde: E_x é o valor do efeito para o fator “x”, $\sum y (+)$ é somatório das respostas no nível positivo, $\sum y (-)$ é somatório das respostas no nível negativo, e n é o número de experimentos definidos no planejamento.

4.2.9.5 Aplicação do método

Após o desenvolvimento, otimização e validação, quinze amostras de oleorresinas foram analisadas no sistema CG-DIC para quantificação de α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno e α -humuleno.

Os dados experimentais adquiridos de todas as amostras foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido do teste pós-teste de Tukey para determinar diferenças significativas entre as amostras de oleorresina, sendo valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

4.3 ESTUDO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS

4.3.1 Obtenção dos extratos

Inicialmente as folhas moídas de cada espécie coletada tiveram sua granulometria de partícula uniformizada com auxílio de Tamis com malha de 45 mesh (355 μm). Em seguida, aproximadamente 100 mg do pó das folhas foram transferidos para erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL de solução de etanol 70% com padrão interno ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). O processo extrativo ocorreu em incubadora TE-420 de marca Tecnal (Piracicaba-SP, Brasil) a 30°C com agitação de 120 rpm durante 1 h. Os extratos foram filtrados em papel tipo qualitativo (MOTTA, 2014).

Dez mililitros do filtrado de cada extrato hidroalcólico foram transferidos para tubos de ensaio com tampa e particionados com 5 mL de hexanos grau cromatográfico para remoção de ceras e outras substâncias de baixa polaridade. Uma alíquota de 1,8 mL de cada extrato foi transferida para um microtubo de 2 mL Eppendorff (Hamburgo, Alemanha) e secas em *SpeedVac* Savant SPD 2010 Thermo (Milford, MA, EUA) durante 24 h. O material seco foi ressuspenso em solução de metanol grau LC-MS Avantor (Center Valley, PA, EUA) 70% até a concentração de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em seguida, as soluções foram filtradas em membrana de $0,22 \mu\text{m}$, colocadas em frascos do tipo vial de 1,5 mL e acondicionadas sob refrigeração até futuras análises no sistema CLUE-EM.

4.3.2 Condições cromatográficas e análise dos extratos das folhas por CLUE-EM

A análise da composição química dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Copaifera* coletadas foi realizada de acordo com o método descrito por Motta (2014) com adaptações.

As análises qualitativas foram realizadas em sistema CLUE-EM marca Thermo Fisher Scientific (Waltham-MA, USA) equipado com cromatógrafo líquido de ultra eficiência modelo Accela, bombas modelo Accela 1250, detector de arranjo diodos modelo Accela PDA detector, pré-coluna (5 x 4,6 mm, 2,7 μm) e coluna analítica (100 x 3,0 mm, 2,5 μm) Synergi Polar RP da marca Phenomenex (Torrance-CA, EUA), e acoplado a um espectrômetro de massas modelo Exactive Plus com analisador do tipo Orbitrap[®] operando nos modos positivo e negativo, concomitantemente.

Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização por *eletrospray* foram: temperatura do capilar e da fonte em 300 °C, diferença de potencial do spray em 3,6 kV (modo positivo) e 3,2 kV (modo negativo), faixa de detecção do *scan*: m/z 100 a 1.000 e resolução *full scan* igual a 70.000 (200 m/z). Todo sistema citado foi controlado com auxílio do *software* Xcalibur versão 2.2.2011.

A fase móvel foi composta por água ultrapura com 0,1% (v/v) ácido fórmico (Solução A), metanol-acetonitrila Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha) com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (Solução B). O modo de eluição foi em gradiente conforme Tabela 9, apresentando vazão de 0,4 mL.min⁻¹, volume de injeção de 5 μL e temperatura de 40°C.

Tabela 9. Gradiente da fase móvel estabelecido para análise cromatográfica CLUE-EM.

Tempo (min)	Vazão (mL.min ⁻¹)	Solução A	Solução B
0,00	0,40	90	10
8,33	0,40	85	15
29,17	0,40	64	36
31,25	0,40	0	100
33,33	0,40	0	100
35,42*	0,40	90	0
37,50*	0,40	90	0

Onde: * Tempo de condicionamento do sistema cromatográfico para novas injeções.

Os extratos das folhas foram injetados em triplicata nas condições analíticas descritas anteriormente, a fim de se obter os tempos de retenção relativos de cada sinal cromatográfico. Além disso, foram injetadas soluções de ácido galoilquínicos e flavonoides isolados de folhas *C. langsdorffii* gentilmente cedidas pelo Mestre Erick Motta para comparação com os dados obtidos experimentalmente.

Para processar os dados obtidos do sistema CLUE-EM em formato *.raw*, primeiramente foi necessário separar os dados dos modos: positivo e negativo. Para extrair os

dados em cada modo de ionização e transformá-los em formato *.mzXML* foi utilizado o software MsConvert do pacote ProteoWizard (CHAMBERS, 2012; KESSNER et al., 2008). Em seguida, os dados foram analisados com auxílio do *software* MZmine[®] em um modo de ionização de cada vez e processando os dados realizando as seguintes etapas: I) detecção e seleção dos sinais cromatográficos (pico), II) construção dos cromatogramas, III) alinhamento dos cromatogramas, IV) preenchimento das falhas dos cromatogramas; V) comparação com os dados das soluções dos isolados, e VI) atribuição/sugestão para os sinais cromatográficos. Para esta última etapa, foram adotados os seguintes parâmetros no MZmine[®]: nível de ruído de 1×10^6 ; altura mínima do pico 1.5×10^6 , e tolerância de *m/z* de 5,0 ppm.

Os dados processados no software *mzMine* foram exportados na forma de tabelas (Microsoft Excel) contendo as áreas, tempo de retenção e massa/carga de cada cromatograma dos extratos analisados. Por fim, os dados processados foram convertidos em gráficos em barras para melhor visualização e comparação das amostras.

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Munido das autorizações para coleta, transporte e estudo científico das espécies que por ventura fossem coletadas, no período entre os anos de 2012 a 2014 foram coletadas diferentes espécies distribuídas no território brasileiro, sendo os dados de localização e rendimento de cada coleta apresentados na Tabela 10. Os indivíduos visitados estavam na floresta amazônica, mata atlântica e florestas estacionais, sendo que os locais de aquisição estão de acordo com a distribuição geográfica descrita na literatura para o Brasil (VEIGA-JUNIOR e PINTO, 2002; MARTINS-DA-SILVA, PEREIRA, LIMA, 2008).

Aproximadamente 70 indivíduos foram visitados nas regiões norte, centro oeste e sudeste do Brasil, onde 10 espécies diferentes adquiridas: *C. langsdorffii* Desf., *C. duckei* Dwyer, *C. reticulata* Ducke, *C. oblongifolia* Mart, *C. lucens* Dwyer, *C. trapezifolia* Hayne, *C. multijuga* Hayne, *C. paupera* (Herzog) Dwyer, *C. pubiflora* Benth e *Copaifera sp.* Todavia, a identificação taxonômica de alguns indivíduos visitados não pode ser atribuída, devido as exsiccatas montadas em campo não permitirem a uma análise completa; deste modo estes indivíduos receberam a denominação de *Copaifera sp.*

A etapa de coleta das amostras de folhas e oleorresinas demandou bastante empenho organizacional e físico por parte dos pesquisadores envolvidos, uma vez que fatores como: [1] pouca experiência na atividade de coleta da oleorresina e folhas, [2] dificuldade de acesso as localidades de coleta, sendo necessário por vezes o uso de transporte rodoviário, marítimo e aéreo, [3] disponibilidade de mateiros/coletadores/agricultores para auxílio na aquisição do material vegetal, [4] disponibilidade de meios de conservação das folhas, pois processo de secagem das partes aéreas não se realizaria em campo, e [5] custos; foram determinantes para o sucesso na aquisição das amostras.

Observando os dados apresentados na Tabela 10, pode-se notar que as amostras coletadas na região norte do Brasil foram as que apresentaram maior rendimento em material vegetal coletado, tanto de óleo resina quanto de folhas, onde se destacaram os indivíduos das espécies *C. duckei* Dwyer, *C. reticulata* Ducke, *C. paupera* (Herzog) Dwyer e *C. pubiflora* Benth, localizados em Belém-PA, Brasil Novo-PA, Xapuri-AC e Mucajaí-RR, respectivamente. Entretanto as amostras coletadas nas outras duas regiões, de modo geral, forneceram pouca quantidade de material, sobretudo em relação a oleorresina.

Tabela 10. Espécies do gênero *Copaifera* coletadas no território brasileiro.

Espécies	Rendimento		Localidade	Dados de GPS**	Identificação***	Número de Registro****
	Folhas*	Oleoresina				
<i>Copaifera langsdorffii</i>	8,0 kg	25 mL	Cajuru-SP	-	SPFR	14438
<i>Copaifera duckei</i>	3 kg	4 L	Belém-PA	S01°06.933' O48°19.781'	EMBRAPA	175206
<i>Copaifera reticulata</i>	1,5 kg	2 L	Brasil Novo-PA	S03°22.028' W052°29.947'	EMBRAPA	175266
<i>Copaifera oblongifolia</i>	3,5 kg	30 mL	Pirajuba-MG	-	SPFR	14437
<i>Copaifera lucens</i>	3,2 kg	2 mL	Vista Chinesa-RJ	-	JBRJ	474303
<i>Copaifera trapezifolia</i> (1)	3,0 kg	-	Jd. Botânico-RJ	-	EMBRAPA	178494
<i>Copaifera trapezifolia</i> (2)	-	80 mL	Pq Est. Carlos Botelho S Miguel Arcanjo-SP	S24°03.421' W47°59.340'	EMBRAPA	178494
<i>Copaifera multijuga</i> (1)	1,62 kg	250 mL	Manacapuru-AM	S03°11.858' W060°35.437'	EMBRAPA	180069
<i>Copaifera multijuga</i> (2)	1,61 kg	220 mL	Manacapuru-AM	S03°11.858' W060°35.466'	EMBRAPA	180069
<i>Copaifera multijuga</i> (3)	-	500 mL	Manacapuru-AM	S03°12.109' W060°35.193'	EMBRAPA	180069
<i>Copaifera paupera</i> (1)	1,15 kg	3 L	Xapuri-AC	S010°27.861' W068°35.815'	EMBRAPA	175983
<i>Copaifera paupera</i> (2)	0,32 kg	1 L	Xapuri-AC	N02°36.213' W060°56.767'	EMBRAPA	175983
<i>Copaifera pubiflora</i> (1)	2,05 kg	1 L	Mucajá-RR	N02°36.213' W060°56.767'	EMBRAPA	180231
<i>Copaifera pubiflora</i> (2)	1,35 kg	1,8 L	Mucajá-RR	N02°36.205' W060°56.767'	EMBRAPA	180231
<i>Copaifera pubiflora</i> (3)	1,65 kg	200 mL	Mucajá-RR	N02°36.272' W060°56.775'	EMBRAPA	180231
<i>Copaifera sp.</i>	0,4 kg	2 L	Belterra-PA	-	EMBRAPA	-
<i>Copaifera sp.</i>	-	15 mL	Nova Ubiratã-MT	S 13° 6'58.94' W 54°50'57.30'	-	-
<i>Copaifera sp.</i>	-	30 mL	Nova Ubiratã-MT	S 13°7'6.55' W 54°50'23.15'	-	-
<i>Copaifera sp.</i>	-	60 mL	Nova Ubiratã-MT	S13° 7'7.11' W54°50'18.13'	-	-

Onde: *rendimento em material seco, **são as coordenadas geográficas aproximadas geradas em campo com auxílio de aparelho de GPS modelo eTrex® 30 Garmin (Schaffhausen, Suíça), ***Instituições responsáveis pela identificação do material coletado, **** Número de registro baseado no número das exsiccatas dos herbários.

Em relação a quantidade de oleorresina adquirida, Plowden (2003) e Silva et al. (2012) apontam que a disponibilidade deste produto é demasiadamente variável, fato que pode ser justificado entre outros fatores pelo: condições fisiológicas, porte e idade dos indivíduos visitados, período do ano em que os indivíduos foram visitados, índice pluviométrico das regiões, variabilidade de produção da oleorresina por cada espécie, entre outros fatores.

5.2 ESTUDO DAS OLEORRESINAS

5.2.1 Hidrodestilação

Amostras de oleorresinas autênticas coletadas foram submetidas ao processo de hidrodestilação para a verificação do teor das suas respectivas frações volátil e resinosa.

Em virtude dos diferentes rendimentos na coletada das oleorresinas, foi possível realizar o processo de extração do óleo volátil das seguintes espécies: *C. langsdorffii* Desf., *C. duckei* Dwyer, *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. paupera* (Herzog) Dwyer, *C. pubiflora* Benth, *C. lucens* Dwyer e de *Copaifera sp.*, que foi coletada no município de Belterra-PA. As demais espécies não possuíam quantidade suficiente para realização da extração. Na Tabela 11 estão apresentados os resultados, em percentual, de fração volátil e fração fixa das oleorresinas obtidas pelo processo de hidrodestilação.

Tabela 11. Percentual da fração volátil e fração fixa das oleorresinas coletadas.

Espécies	Rendimento (%)	
	Fração volátil (OV)	Fração Fixa (R)
<i>C. langsdorffii</i> Desf.	72,4	27,6
<i>C. duckei</i> Dwyer	27,4	72,6
<i>C. reticulata</i> Ducke	41,0	59,0
<i>C. multijuga</i> Hayne	92,7	7,3
<i>C. paupera</i> (Herzog) Dwyer	31,2	68,8
<i>C. pubiflora</i> Benth	34,5	65,5
<i>C. trapezifolia</i>	45,2	54,8
<i>Copaifera sp.</i> (Belterra-PA)	53,5	46,5

Onde: **OV** é óleo volátil e **R** é resina.

Os resultados percentuais das frações resultantes da hidrodestilação revelaram que as amostras de oleorresinas de *C. multijuga* e *C. langsdorffii* apresentaram maiores rendimentos em óleo volátil, com 92,7 e 72,4%, respectivamente; valores superiores aos descritos na

literatura (CASCON E GILBERT, 2000; PAIVA et al., 2004; GELMINI et al., 2013; TRINDADE et al., 2013). A oleorresina de *Copaifera sp.* demonstrou ter rendimento na fração volátil em torno de 50%. A fração resinosa teve maior percentual nas demais espécies estudadas. Cascon e Gilbert (2000) descreveram diferentes quantidades de óleo volátil para amostras de oleorresina de *C. multijuga* (80%), *C. duckei* (~ 40%) e *C. guianensis* Desf. (20%).

Após a separação da resina e do óleo volátil foi possível constatar que a fração fixa (resina) é a fração que confere cor a oleorresina, pois todos os óleos voláteis extraídos apresentaram aspecto incolor.

Os resultados experimentais mostraram que a quantidade de óleo volátil presente nas amostras de oleorresinas de *Copaifera* coletadas foi variável entre as diferentes espécies, dados que podem ser justificados pela influência dos fatores bióticos e ambientais de cada região aonde esse foi coletado (PLOWDEN, 2003). Souza de Oliveira et al. (2017) ao investigar a variabilidade química e de rendimento de oleorresina de *C. langsdorffii* indicam que os fatores idade, porte, períodos sazonais e índice pluviométrico foram fatores que influenciaram diretamente no rendimento de óleo volátil extraído da oleorresina; fatores estes que podem interferir na produção dessa fração em outras espécies.

Por fim, os óleos voláteis produzidos foram disponibilizados a outros membros do Projeto Temático para isolamentos dos principais componentes e para teste de avaliação de atividade biológica, a exemplo da atividade leishmanicida.

5.2.2 Fracionamento da oleorresina de *Copaifera duckei*

A oleorresina de *Copaifera duckei* coletada no município de Belém-PA foi submetida ao processo de fracionamento por meio de cromatografia em coluna clássica utilizando sílica gel 60 H como fase estacionária, resultando em 12 frações. Na Tabela 12 são apresentadas as massas obtidas para cada fração e seu respectivo rendimento em relação a massa inicial de oleorresina bruta empregada.

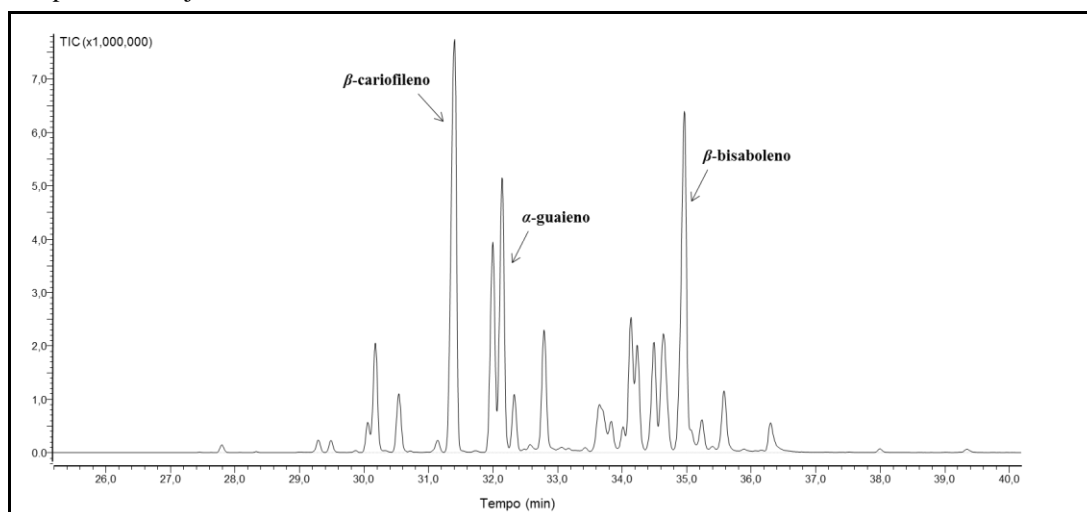
Tabela 12. Fracionamento em coluna clássica da oleorresina de *C. duckei*.

Frações	Descrição*	Massa (g)	Rendimento (%)
ORCd-1	hexanos	14,3123	27,5
ORCd-2	hexanos : acetato de etila (9:1)	24,1529	47,1
ORCd-3	hexanos : acetato de etila (4:1)	4,0686	7,9
ORCd-4	hexanos : acetato de etila (7:3)	1,8080	3,5
ORCd-5	hexanos : acetato de etila (3:2)	4,9688	9,7
ORCd-6	hexanos : acetato de etila (1:1)	0,7814	1,5
ORCd-7	hexanos : acetato de etila (2:3)	0,1388	0,3
ORCd-8	hexanos : acetato de etila (3:7)	0,0898	0,2
ORCd-9	hexanos : acetato de etila (1:4)	0,0255	0,0
ORCd-10	hexanos : acetato de etila (1:9)	0,0510	0,1
ORCd-11	acetato de etila	0,0088	0,0
ORCd-12	metanol	0,0004	0,0

Onde: *entre parênteses estão descritas as proporções dos solventes aplicadas no fracionamento.

As frações ORCd-1 e ORCd-2 foram as que apresentaram maiores rendimentos do processo de fracionamento, com 27,5 e 47,1%, respectivamente. A fração ORCd-1, composta por óleo volátil incolor (Figura 12), apresentou rendimento similar ao encontrado no processo de hidrodestilação para a mesma amostra (ver Seção 5.2.1). Em relação a sua composição química, os dados encontrados para a fração ORCd-1 não evidenciaram diferenças qualitativas quando comparado com dados obtidos da na análise de MEFS-CG-EM (ver Seção 5.2.6), sendo que ambos os dados, estão de acordo com a literatura para esse produto natural (LAMEIRA et al., 2009); desta forma, a utilização da técnica MEFS utilizando fibra do tipo polidimetilsiloxano (PDMS), mostrou-se um excelente alternativa para a verificação da composição química das oleorresinas de espécies de *Copaifera*.

Figura 12. Cromatograma da fração ORCd-1, sendo o β -cariofileno, α -guaieeno e β -bisaboleno os componentes majoritários.



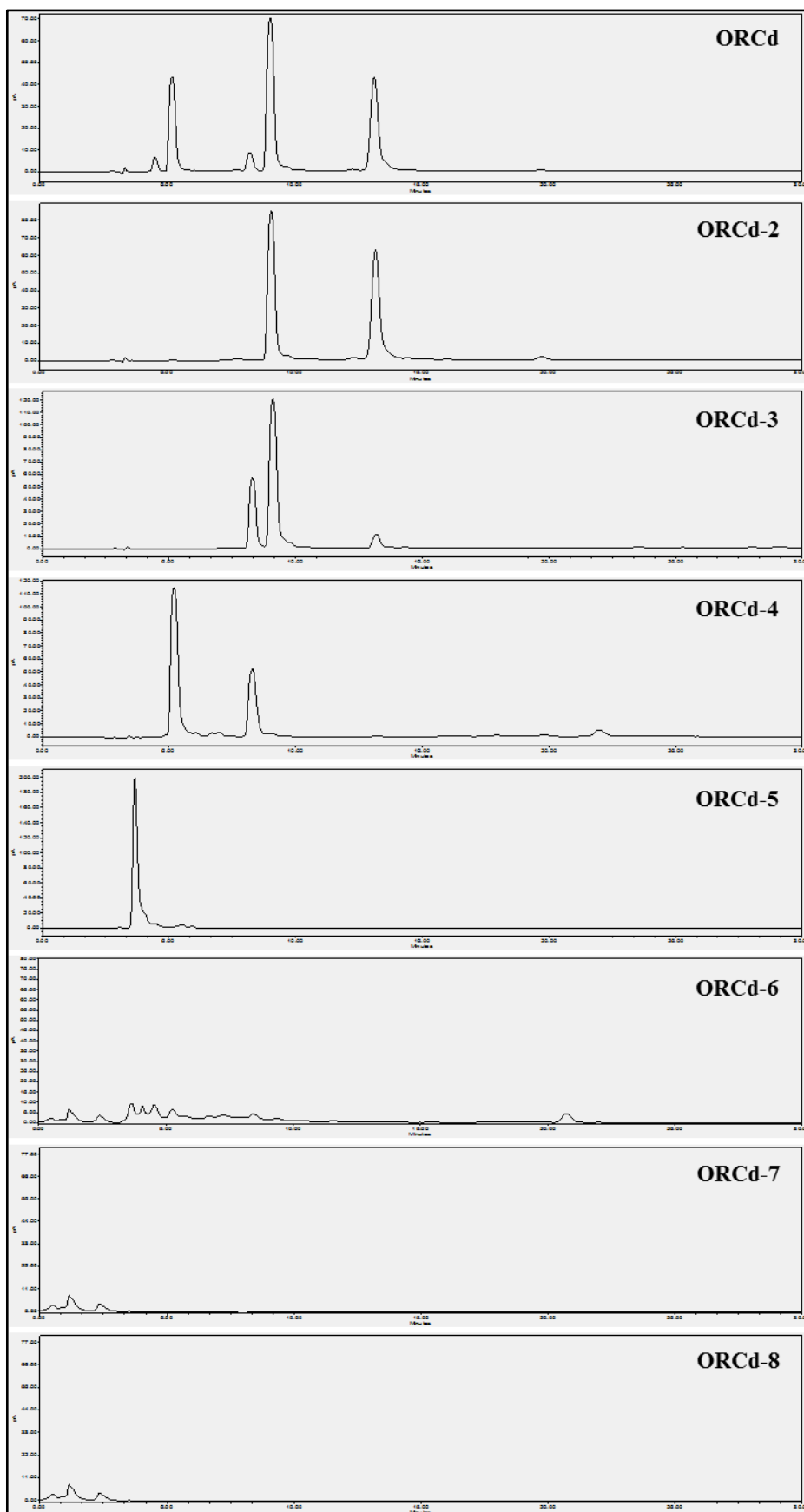
Em seguida, soluções de 1 mg.mL^{-1} das frações ORCd-2 a ORCd-8 foram analisadas separadamente em sistema analítico de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector CORONA CAD (CLAE-CAD) e tiveram seu respectivo perfil cromatográfico comparado com a amostra de oleorresina bruta - **ORCd** (Figura 13).

Foi possível verificar que o processo utilizado gerou frações com perfil cromatográfico mais simples quando comparado com a análise da ORCd bruta. As frações ORCd-2, ORCd-3 e ORCd-4 apresentaram poucos sinais de substâncias em seus cromatogramas e considerável massa recuperada, sendo então encaminhadas para os processos de isolamentos e purificação.

A fração ORCd-5 apresentou rendimento de 9,7% e um sinal intenso em seu cromatograma em aproximadamente quatro minutos, constituída de uma única substância.

As frações ORCd-6, ORCd-7 e ORCd-8 apresentaram as menores massas recuperadas em comparação com as frações iniciais e um perfil cromatográfico pouco interessante do ponto de vista do isolamento das principais substâncias presentes na oleorresina bruta de *C. duckei*, em virtude das baixas intensidades dos sinais gerados ou pela inexistência de sinais. As demais frações (ORCd-9 a ORCd-12) não foram analisadas pois seus respectivos rendimentos foram muito baixos e as principais substâncias de interesse já haviam sido separadas nas frações anteriores.

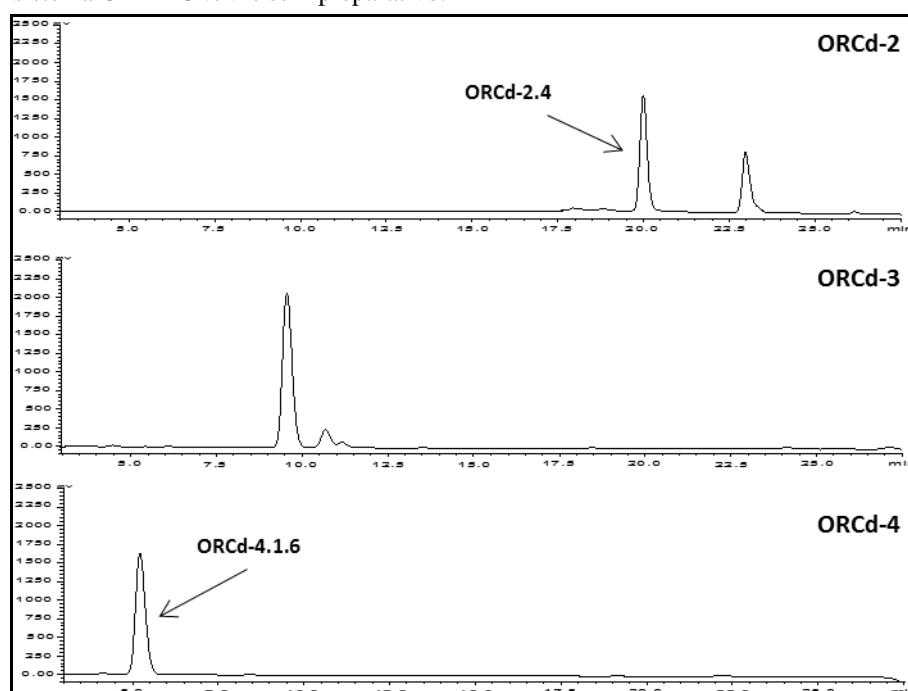
Figura 13. Perfil cromatográfico da oleoresina bruta de *C. duckei* (ORCd) e das frações ORCd-2 a ORCd-8 obtidos por CLAE-CORONA CAD.



5.2.3 Isolamento de diterpenos da oleorresina de *C. duckei*

Analisando os resultados de fracionamento gerados, foram selecionadas as frações ORCd-2, ORCd-3 e ORCd-4 (Figura 14) para o processo de isolamento dos seus principais constituintes.

Figura 14. Cromatograma das frações ORCd-2, ORCd-3 e ORCd-4 utilizando sistema CLAE-UV/Vis semipreparativo.



Diferentes procedimentos foram testados para o isolamento dos principais constituintes das frações de ORCd, tais como: cromatografia em fase líquida empregando coluna de vidro clássica utilizando sílica com menor diâmetro e aplicando diferentes misturas de eluição de solventes e colunas cromatográficas, cromatografia em camada delgada em modo preparativo (CCD), cromatografia em camada delgada centrífuga (Chromatotron) e cromatografia líquida de alta eficiência preparativa. Porém apenas o sistema CLAE UV/Vis permitiu o isolamento de substâncias das frações selecionadas.

O isolamento por meio de CLAE UV/Vis semipreparativa necessitou de algumas adaptações, tais como: utilização de coluna cromatográfica com fase estacionária diferente daquela empregada em modo analítico, pois não havia disponível no mercado a coluna com fase estacionária Kinetex® Biphenyl com dimensões compatíveis com o modo semipreparativo

ou preparativo, o cromatógrafo utilizado no modo analítico da Waters não estava em pleno funcionamento no modo preparativo, logo optou-se por outro equipamento, o uso de detector UV/Vis operando a 205 nm, e modificações na composição da fase móvel e no gradiente de eluição.

A fração ORCd-2 apresentou seis sinais cromatográficos, sendo dois destacados quando comparados aos demais. Os compostos dos dois sinais majoritários foram isolados a partir de 630 mg em alíquotas que foram reunidas e concentradas, rendendo 188 mg de uma subfração, denominada de ORCd-2.4.

A pesar das inúmeras tentativas de modificar as condições cromatográficas, não foi possível isolar componentes da fração ORCd-3, pois não houve separação satisfatória entre os componentes desta fração.

O perfil cromatográfico da fração ORCd-4 apresentou três sinais, sendo apenas um deles majoritário em relação aos demais. Aproximadamente 310 mg foram utilizados para o isolamento, a partir desta massa foram isolados 94 mg de uma substância pertencente a subfração ORCd-4.6.

Por fim, o isolado da fração ORCd-5 apresentou massa isolada de 638 mg.

5.2.4 Purificação por cristalização dos compostos isolados

As substâncias isoladas nas subfrações ORCd-2.4 e ORCd-4.1.6, e na fração ORCd-5 foram submetidas ao processo de cristalização empregando-se temperatura e mistura de solventes, acetona e hexanos, a fim remover impurezas e assim obter substância com maior teor de pureza.

Após a execução do procedimento descrito no item 4.2.4, as ORCd-2.4 e ORCd-4.1.6 geraram pequenos cristais na cor branca e amorfos. Já a fração ORCd-5 forneceu cristais em forma de pequenas “pétalas” transparentes e límpidas. A cristalização resultou 53, 44 e 64% de rendimentos para ORCd-2.4, ORCd-4.1.6 e ORCd-5, respectivamente. A pureza dos compostos isolados foi estimada entre 96-98%, com base na análise dos cromatogramas no sistema CLAE-CORONA CAD e espectros de RMN unidimensional de ¹³C.

5.2.5 Identificação estrutural das substâncias isoladas

Os isolados das frações ORCd-2.4, ORCd-4.1.6 e ORCd-5 foram submetidos a experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C unidimensional e bidimensional (mapas de contorno). Os dados experimentais gerados por meio dos experimentos RMN e de comparação com a literatura estão descritos nas Tabelas 13 a 15, estando os espectros disponíveis nos apêndices de 1 a 15.

5.2.5.1 Identificação estrutural do composto isolado ORCd-2.4

O espectro de ^1H do isolado ORCd-2.4 (Tabela 13 e apêndices de 1 a 5) apresentou quatro simpletos com: δ 0,72 e δ 1,15 ppm integrados para três hidrogênios, atribuídos aos hidrogênios das metilas nas posições C-20 e C19, respectivamente; e δ 4,59 e δ 4,88 ppm integrados para um hidrogênio, que foram atribuídos aos hidrogênios do carbono na posição 17; um pseudo tripleto com δ 6,26 ($J = 0,5$ Hz) integrado para um hidrogênio atribuído ao hidrogênio do carbono 14, dois sinais com multiplicidade não definida em δ 7,26 e δ 7,35 ppm integrados para um hidrogênio atribuídos para os hidrogênios dos carbonos nas posições 16 e 15 do anel furano monosubstituído. Os demais sinais com deslocamentos químico entre 1,20 e 2,60 ppm não apresentaram definição satisfatória para suas verificações, sendo necessário análise sobre os espectros bidimensionais (HSQC e HMBC) para realizar as demais atribuições.

Os espectros de ^{13}C do isolado ORCd-2.4 apresentou 20 sinais, compatível com o esqueleto básico de um diterpeno, metabólito comum em oleorresinas de copaíferas (LEANDRO et al., 2012). O espectro de DEPT 135 de ^{13}C revelou a presença de dois carbonos metilas ($-\text{CH}_3$), oito carbonos metileno ($-\text{CH}_2$), cinco carbonos metinos ($-\text{CH}$) e cinco carbonos não hidrogenados, dos quais destaca-se o com deslocamento químico em δ 184,9 ppm, indicativo da ligação C-O de carbonila (C-18).

O mapa de contorno HSQC permitiu atribuir as correlações a curta que estão demonstradas nas colunas δ ^1H e ^{13}C da Tabela 13.

O mapa de contorno HMBC permitiu atribuir as seguintes correlações a longa: o hidrogênio da posição 14 correlaciona-se com os carbonos 13, 15 e 16; os hidrogênios da posição 17 correlacionam-se com os carbonos 7, 8 e 9; os hidrogênios da posição 19 correlacionam-se com os carbonos 3, 5 e 18; e os hidrogênios da posição 20 correlacionam-se com os carbonos 1, 5 e 9.

Tabela 13. Dados experimentais dos espectros de ^1H e ^{13}C para o composto isolado ORCd-2.4 em CDCl_3 (500 e 125 MHz).

Estrutura do isolado ORCd-2.4					
Posição (C/H)	δ ^1H (ppm) [multiplicidade]	δ ^{13}C (ppm)	HMBC	δ ^1H (ppm)** [multiplicidade]	δ ^{13}C (ppm)**
1	1,10 (m)	38,1	C-2; C-20	***	37,7
2	1,60 (m); 1,76 (m)	18,6	C-1; C-3; C-20	***	18,2
3	1,62 (m)	37,3	C-2; C-19	***	36,9
4*	-	47,7	-	-	47,3
5	1,94 (dd)	49,7	C-6; C-7; C-19; C-20	***	49,3
6	1,38 (m); 1,47 (m)	27,0	C-5; C-7	***	26,6
7	2,05 (m)	38,0	C-6; C-8; C-17	***	37,6
8*	-	147,9	-	-	147,5
9	1,73 (m)	56,2	C-17	***	55,9
10*	-	39,0	-	-	38,6
11	2,24 (m); 2,55 (m)	23,7	C-9; C-12; C-13; C-14; C-15	***	23,2
12	1,62 (m); 1,73 (m)	24,2	C-11; C-17	***	23,8
13*	-	125,6	-	-	125,2
14	6,26 (t)	111,1	C-13; C-15; C-16	6,25 (dd)	110,7
15	7,35 (m)	142,9	C-13; C-14; C-15	7,34 (t)	142,4
16	7,20 (m)	138,9	C-13; C-14; C-16	7,19 (s)	138,4
17	4,59 (s); 4,88 (s)	107,2	C-7; C-9; C-9	4,59 (s); 4,87 (s)	106,8
18*	-	184,9	-	-	185,5
19	1,15 (s)	16,5	C-3; C-5; C-18	1,15 (s)	16,1
20	0,72 (s)	14,9	C-1; C-5; C-9	0,72 (q)	14,5

Onde: *Carbono não hidrogenado, **Dados descritos por Carreras, Rossomando e Giordano (1998) e Neto, Gramosa e Silveira (2008), ***Dados não informados, *s* é a descrição de simpleto, *d* é a descrição de dupletto, *t* é a descrição de tripleto, e *m* é a descrição de multipletto.

Os dados espectroscópicos obtidos de RMN para o isolado da fração ORCd-2.4 da oleorresina de *C. duckei* e sua comparação com os dados da literatura possibilitaram inferir que o composto isolado trata-se do ácido *ent*-poliáltico (ácido *ent*-15,16-epóxi-8(17),13(16),14-labdatrieno-19-óico), o qual foi descrito por Rossomando e Giordano (1998) e Neto, Gramosa e Silveira (2008) em amostras de *Eupatorium buniifolium* e *Copaifera langsdorffii*, respectivamente.

5.2.5.2 Identificação estrutural do composto isolado ORCd-4.1.6

O metabólito da fração ORCd-4.1.6 (Tabela 14 e apêndices de 6 a 10) apresentou sete sinais definidos no espectro de ^1H , sendo: dois simpletos integrados para três hidrogênios com δ 0,71 e δ 1,15 ppm correspondentes aos carbonos C-20 e C-19, respectivamente; um pseudo dubleto com δ 2,16 ($J = 1$ Hz) integrado para três hidrogênios; e outro simpleto integrado para três hidrogênios corresponde aos hidrogênios do carbono 21 (δ 3,69 ppm).

Os sinais (simpletos) deslocamentos químicos com valores de 4,52 e 4,86 ppm com integração para um hidrogênio foram atribuídos aos hidrogênios da posição C-17. O multiplete com maior deslocamento (δ 5,65 ppm e $J = 1$ Hz) integrado para 1 hidrogênio foi atribuído a posição C-14, em virtude da proximidade com a ligação dupla entre os carbonos C-13 e C-14 e a carbonila na posição C-15.

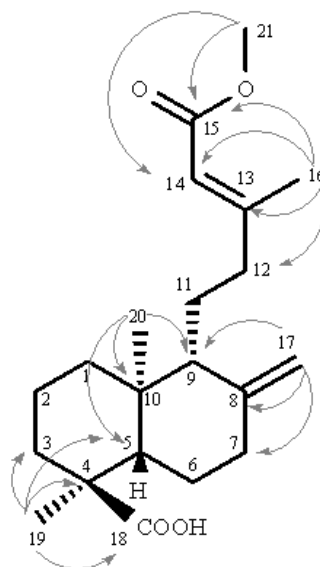
A contagem de sinais de carbonos no espectro de ^{13}C indica uma estrutura com 21 carbonos, com: quatro $-\text{CH}_3$, oito $-\text{CH}_2$, três $-\text{CH}$ e seis carbonos não hidrogenados. Os deslocamentos com valores de 167,4 e 184,7 ppm correspondem aos carbonos C-15 com o grupo funcional éster e C-18 com o grupo funcional carboxila, respectivamente.

Os mapas de contorno HSQC e HMBC permitiram a realização das demais correlações. O mapa de HMBC permitiu atribuir as seguintes correlações a longa: o hidrogênio da posição 14 correlaciona-se com os carbonos 12, 13, 14 e 15; os hidrogênios da posição 17 correlacionam-se com os carbonos 7, 8 e 9; os hidrogênios da posição 19 correlacionam-se com os carbonos 3, 4, 5 e 18; os hidrogênios da posição 20 correlacionam-se com os carbonos 5, 9 e 10; e os hidrogênios da posição 21 correlacionam-se com os carbonos C14 e C15.

A análise dos dados obtidos pelos experimentos de ^1H , ^{13}C , mapas de contorno para o isolado ORCd-4.1.6 e sua comparação com os dados da literatura permitiu sugerir que o mesmo se trata do ácido *ent*-agático-15-metil éster (Ácido 15-metil-*ent*-8(17),13-labdadieno-15,19-diólico), descrito por Xin et al. (2016) e Bastard et al. (1984).

Tabela 14. Dados experimentais dos espectros de ^1H e ^{13}C para o composto isolado ORCd-4.1.6 em CDCl_3 (500 e 125 MHz).

Estrutura do isolado ORCd-4.1.6



Posição (C/H)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) [multiplicidade]	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	HMBC	$\delta^1\text{H}$ (ppm)**a [multiplicidade]	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)**b
1	1,12; 2,34 (<i>m</i>)	38,2	C-2; C-3; C-5		39,9
2	1,61 (<i>m</i>)	18,2	C-3; C-4; C-5; C-18		20,8
3	1,63 (<i>m</i>)	37,2	C-1; C-2; C-4; C-5; C-18		39,4
4*	-	47,7	-		44,5
5	1,93 (<i>m</i>)	49,7	C-4; C-9; C-10; C-18; C-19; C-20		56,8
6	1,37; 1,46 (<i>m</i>)	27,0	C-5; C-7; C-8		27,1
7	1,78; 2,04 (<i>m</i>)	38,0	C-8; C-9; C-17		39,0
8*	-	147,7	-		148,9
9	1,68 (<i>m</i>)	56,3	C-5; C-8; C-10; C-17		56,3
10*	-	39,1	-		41,1
11	1,50; 1,66 (<i>m</i>)	21,6	C-8; C-9; C-10; C-17; C-20		22,5
12	1,97 (<i>m</i>)	39,8	C-9; C-11; C-13; C-14		40,4
13*	-	160,9	-		161,1
14	5,65 (<i>s</i>)	115,2	C-12; C-13; C-15; C-16	5,64 (<i>s</i>)	115,8
15*	-	167,4	-		177,2
16	2,16 (<i>s</i>)	19,0	C-12; C-13; C-14; C-15	2,15 (<i>s</i>)	18,7
17	4,52 (<i>s</i>); 4,86 (<i>s</i>)	107,3	C-7; C-8; C-9;	4,53 (<i>s</i>); 4,90 (<i>s</i>)	106,7
18*	-	184,7	-		176,8
19	1,15 (<i>s</i>)	16,5	C-2; C-3; C-4; C-5; C-19	1,01 (<i>s</i>)	
20	0,71 (<i>s</i>)	14,9	C-5; C-9; C-10	0,56 (<i>s</i>)	13,2
21	3,69 (<i>s</i>)	50,9	C-14; C-15	3,68 (<i>s</i>)	***

Onde: *Carbono não hidrogenado, **Dados descritos por Xin et al. (2016) e Bastard et al. (1984), ***Dados não informados, *s* é a descrição de simpleto, *d* é a descrição de duplete, *t* é a descrição de tripleto, e *m* é a descrição de multiplete.

5.2.5.3 Identificação estrutural do composto isolado ORCd-5

Os dados obtidos nos experimentos de RMN do composto isolado ORCd-5 estão apresentados na Tabela 15 e apêndices de 11 a 15.

O espectro de ^1H apresentou cinco sinais definidos como: dois simpletos com δ 0,70, e δ 1,14 ppm integrados para três hidrogênios, atribuídos aos hidrogênios das metilas nas posições C-20 e C-19, respectivamente; dois simpletos δ 4,50 e δ 4,82 ppm integrados para um hidrogênio, que foram atribuídos aos hidrogênios do carbono na posição 17 e um dubleto com δ 0,98 ppm ($J = 6,6$ Hz), integrado para três hidrogênios, atribuído à metila na posição 16. Os demais sinais com deslocamentos químicos entre 1,20 e 2,50 ppm não apresentaram definição satisfatória para suas análises, sendo necessária análise sobre os espectros bidimensionais (HSQC e HMBC) para realizar as demais atribuições.

Observando os espectros de ^{13}C observa-se a presença de 20 sinais, o que sugere a presença de um esqueleto diterpênico. O espectro de DEPT 135 de ^{13}C revelou a presença de três $-\text{CH}_3$, nove $-\text{CH}_2$, três $-\text{CH}$ e cinco carbonos não hidrogenado, dos quais destacam-se os em δ 179,7 e δ 185,1 ppm, indicativos da ligação $-\text{CO}$ de carbonila.

Assim como os outros dois isolados, os mapas de contorno HSQC e HMBC permitiram a realização das demais correlações.

O mapa de contorno HMBC permitiu atribuir as seguintes correlações a longa: o hidrogênio da posição 16 correlaciona-se com os carbonos 12, 13 e 14; os hidrogênios da posição 17 correlacionam-se com os carbonos 7, 8 e 9; os hidrogênios da posição 19 correlacionam-se com os carbonos 3, 4, 5 e 18; e os hidrogênios da posição 20 correlacionam-se com os carbonos 5, 9 e 10.

Os dados obtidos em RMN de ^1H e ^{13}C uni- e bidimensionais para o cristal isolado da fração ORCd-5 da oleoresina de *C. duckei* e sua comparação com os dados da literatura possibilitaram inferir que o composto isolado trata-se do ácido 4-epilimbricatalóico (ácido 13,14-diidroagático), o qual está descrito nas próximas etapas desse trabalho como ácido *ent*-diidroagático. Teng et al. (2010) isolaram este diterpeno de *Pinus sylvestris*.

Tabela 15. Dados experimentais dos espectros de ^1H e ^{13}C para o composto isolado ORCd-5 em CDCl_3 (500 e 125 MHz).

Estrutura do isolado ORCd-5					
Posição (C/H)	δ ^1H (ppm) [multiplicidade]	δ ^{13}C (ppm)	HMBC	δ ^1H (ppm)** [multiplicidade]	δ ^{13}C (ppm)**
1	1,15 (<i>m</i>); 1,80 (<i>m</i>)	38,1	C-2; C-3; C-4; C-5; C-10; C-20	1,19; 1,78	37,9
2	1,62 (<i>m</i>)	18,6	C-1; C-3	1,28; 1,59	18,5
3	1,62 (<i>m</i>); 1,80 (<i>m</i>)	37,3	C-2; C-4; C-19	1,65; 1,86	37,0
4*	-	47,8	-	-	47,5
5	1,96 (<i>m</i>); 1,98 (<i>m</i>)	49,7	C-4; C-9; C-10; C-18; C-19; C-20	1,94	49,5
6	1,36 (<i>m</i>); 1,45 (<i>m</i>)	27,1	C-7	1,36; 1,44	26,8
7	2,03 (<i>m</i>); 2,33 (<i>m</i>)	38,2	C-6	2,04; 2,35	37,8
8*	-	148,1	-	-	148,0
9	1,68 (<i>m</i>); 1,70 (<i>m</i>)	57,0	C-5; C-7; C-8; C-10; C-17	1,67	57,0
10*	-	39,1	-	-	39,0
11	1,42 (<i>m</i>)	20,9	C-8; C-9; C-13	1,30; 1,49	20,8
12	1,19 (<i>m</i>); 1,35 (<i>m</i>)	35,8	C-16	1,00; 1,33	35,6
13	1,93 (<i>m</i>)	30,8	C-12; C-14; C-16	1,51	31,1
14	2,19 (<i>m</i>); 2,30 (<i>m</i>)	42,0	C-11; C-12; C-13; C-16	***	41,2
15*	-	179,7	-	-	179,2
16	0,98 (<i>d</i>)	19,8	C-12; C-13; C-14	0,97	19,9
17	4,50 (<i>s</i>); 4,88 (<i>s</i>)	107,1	C-7; C-9; C-14	4,52 (<i>s</i>); 4,82 (<i>s</i>)	107,0
18*	-	185,1	-	-	185,1
19	1,14 (<i>s</i>)	16,5	C-3; C-4; C-5; C-18	1,15 (<i>s</i>)	16,3
20	0,71 (<i>s</i>)	14,9	C-5; C-9; C-10	0,71 (<i>s</i>)	14,7

Onde: *Carbono não hidrogenado, **Dados descritos por Zang et al. (2006) e Tang et al. (2010), ***Dados não informados, *s* é a descrição de simpleto, *d* é a descrição de duplete, *t* é a descrição de triplete, e *m* é a descrição de multiplete.

5.2.6 Análise das oleorresinas por CG-EM

Os componentes voláteis das amostras de oleorresinas de *Copaifera* foram extraídos por micro extração em fase sólida e analisados no sistema CG-EM ambos apresentados na seção 4.2.6. Inicialmente, foram testados três tipos de fibras de MEFS com diferentes revestimentos

(PDMS, CAR-PDMS e PDMS-DVB) em condições experimentais idênticas, ou seja, no ponto central do *design* experimental Box-Banhen empregando três fatores: tempo de equilíbrio da amostra nas condições-teste, tempo e temperatura de extração, com objetivo de selecionar fibra extratora mais eficiente para captação dos compostos voláteis das amostras de oleorresinas utilizando uma mistura (*Pool*) de oleorresinas como modelo de amostra. Na Tabela 16 estão apresentados os resultados do experimento de seleção da MEFS.

Tabela 16. Resultados do teste de seleção da fibra de MEFS.

Parâmetros de seleção	Tipo de Fibra		
	PDMS	CAR-PDMS	PDMS-DVB
Número de picos	52,0 ± 1,0 ^a	49,0 ± 0,0 ^{ab}	44,0 ± 3,0 ^b
Área total (x10 ⁸)	6,28 ± 0,55 ^a	5,39 ± 0,50 ^{ab}	4,00 ± 0,91 ^b

Onde: PDMS - polidimetilsiloxano, CAR-PDMS - carboxen-polidimetilsiloxano e PDMS-DVB polidimetilsiloxano-divinilbenzeno. Resultados expressos em média ± desvio padrão. As médias dos resultados estão apresentadas letras minúsculas quando diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pela ANOVA e teste de Tukey.

Baseado nos resultados de número de pico e área total dos cromatogramas, os dados do teste de seleção da fibra de MEFS para análise dos voláteis de oleorresinas de *Copaifera* indicaram que a fibra do tipo polidimetilsiloxano (PDMS) foi a que apresentou os melhores resultados para os dois parâmetros, quando comparada com as outras duas fibras de microextração nas condições dos testes padronizados, que possuíam revestimento combinado de PDMS com carboxen ou divinilbenzeno.

A micro fibra revertida com polidimetilsiloxano é indicada para extração de compostos voláteis não polares (GARCIA-ESTEBAN et al., 2004); indicando assim, que os componentes da fração volátil das oleorresinas investigadas possuem majoritariamente características químicas apolares.

Desta forma, a fibra PDMS foi, então, selecionada para análise dos componentes voláteis das amostras de oleorresinas investigadas. Até o presente momento, não há publicações que empreguem fibras de MEFS para análise direta dos componentes voláteis para oleorresinas. É importante cometar que Dias et al. (2012) utilizaram o mesmo tipo de revestimento de fibra para dosar β -cariofileno em nanoemulsões incorporadas com oleorresina de *C. multijuga*, indicando concordância da escolha desse tipo de fibra para análise qualitativa de amostras deste produto natural.

Em seguida a triagem do tipo de fibra para o processo de microextração, executou-se o planejamento experimental do tipo Box-Behnken para otimização do processo de extração da fibra PDMS variando tempo de equilíbrio de amostra nas condições-teste (5, 10, 15 min), tempo de extração (15, 30 e 45 min) e temperatura de extração (40, 50 e 60°C), considerando como respostas o número de picos e área total dos picos por cromatograma em cada experimento realizado, conforme resultados apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Resultados experimentais do planejamento tipo Box-Behnken para três fatores utilizando a fibra PDMS.

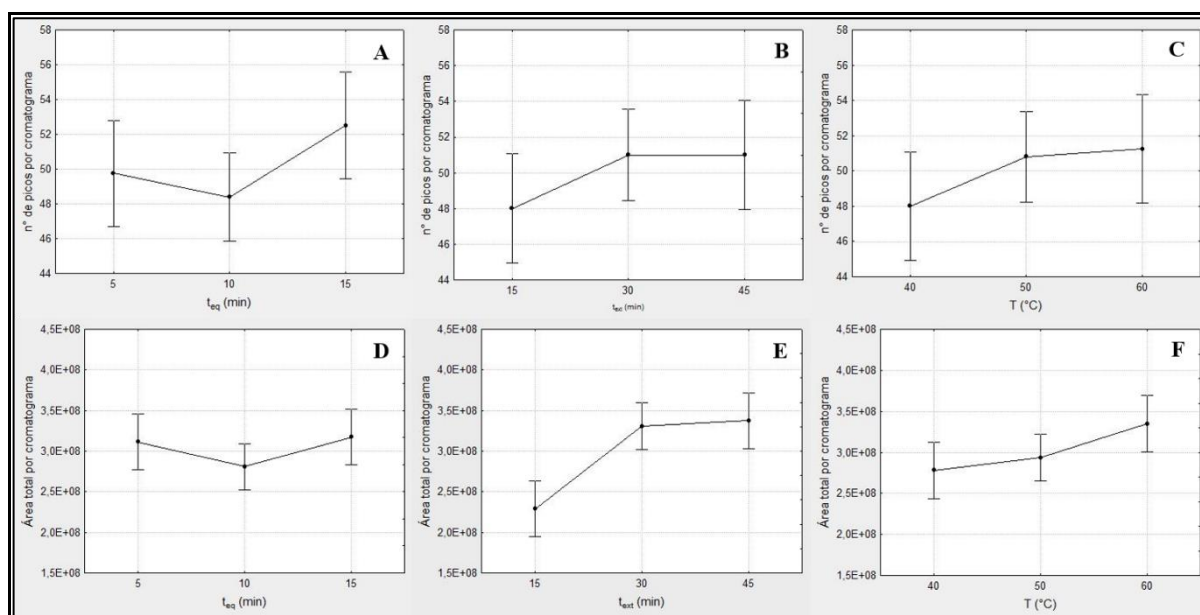
Fatores	Níveis		
	Baixo (-1)	Médio (0)	Alto (+1)
t_{eq} (min)	5	10	15
t_{ext} (min)	15	30	45
T (°C)	40	50	60

Experimento	Respostas				
	t_{eq}	t_{ext}	T	n° de picos	Área total
1	-1	-1	0	50	289002938
2	1	-1	0	51	377483486
3	-1	1	0	50	283088730
4	1	1	0	54	401082254
5	-1	0	-1	42	192923706
6	1	0	-1	51	235327879
7	-1	0	1	50	347651473
8	1	0	1	49	325265644
9	0	-1	-1	50	254470903
10	0	1	-1	49	233022329
11	0	-1	1	48	324747387
12	0	1	1	57	352080546
13	0	0	0	50	287401374
14	0	0	0	50	305092858
15	0	0	0	50	316417224

Os dados experimentais foram tratados estatisticamente por meio de análise de variância ANOVA, a qual indicou variação significativa apenas para a resposta *área total por cromatograma* para os três fatores testados (apêndices 16 e 17). A respeito dos três fatores investigados, observou-se que o tempo de equilíbrio em que amostra foi colocada nas condições de extração não influenciou na resposta observada. Todavia, o fator tempo de extração (min) foi o fator mais significativo para a resposta *área total por cromatograma*, conforme pode ser consultado na (Figura 15 (E)), uma vez que houve diferença entre o tempo de 15 min com os demais tempos monitorados (30 e 45 min). Os dados estatísticos também apontaram uma

interferência no fator temperatura da resposta mencionada, sugerindo que nas temperaturas testadas mais elevadas a área total dos picos dos cromatogramas foi maior (Figura 15 (F)).

Figura 15. Efeito dos fatores com limite de confiança de 95% para as respostas: número de picos e área total por cromatograma para o sistema MEFS-CG-EM. Onde (A) n° de pico x t_{eq} (min), (B) n° de pico x t_{ext} (min), (C) n° de pico x T (°C), (D) área total x t_{eq} (min); (E) área total x t_{ext} (min), e (F) área total x T (°C).



Desta forma, partindo-se dos resultados encontrados para o teste de seleção da fibra de microextração em fase sólida e de otimização do processo de extração nas condições testadas, foram definidas as seguintes condições para captação das substâncias voláteis de oleorresina de copaíferas em ambiente fechado: tempo de equilíbrio de 5 min, tempo para o processo de extração (adsorção) de 30 min e temperatura de extração de 60°C.

Cem miligramas de cada oleorresina, separadamente, foram transferidos para um frasco de 4 mL com tampa possuindo septo de teflon, expostas a fibra PDMS e mantidos nas condições ótimas e sob agitação constante (400 rpm), seguido de análise cromatográfica conforme descrito na seção 4.2.6.

A análise por cromatografia em fase gasosa das amostras de oleorresina de copaíferas autênticas e comerciais apresentou diferenças qualitativas e quantitativas de composição química. Na Tabela 18 estão apresentados os resultados de MEFS-CG-EM das amostras investigadas, onde 47 substâncias foram identificadas. Analisando os resultados encontrados, foi possível observar que mais de 80% da área total relativa dos cromatogramas tiveram atribuição de seus respectivos constituintes químicos, comparando os índices de retenção

calculados com os descritos na literatura e os dados dos índices de similaridade de fragmentação das substâncias disponíveis nas bibliotecas espectrais do *software* GC Solution.

A composição química dos voláteis das oleorresinas é formada por terpenos, preponderantemente da classe dos sesquiterpenos, dados estes que estão de acordo com os trabalhos de Veiga-Junior et al. (2007), Lameira et al. (2009), Gelmini et al. (2012), Leandro et al. (2012) e Trindade et al. (2013), entre outros, os quais investigaram a composição química do óleo volátil de diferentes espécies desse gênero de planta.

As substâncias majoritárias identificadas nas amostras foram: [1] *C. langsdorffii*: β -bisaboleno (27,60%), α -bergamoteno (17,75%), e β -cariofileno (13,27%); [2] *C. duckei*: β -cariofileno (19,65%), β -bisaboleno (15,94%) e α -guaiano (10,61%); [3] *C. reticulata*: β -bisaboleno (22,56%), α -bergamoteno (20,86%), e β -cariofileno (9,97%); [4] *C. multijuga*: β -cariofileno (44,73%), α -copaeno (20,06%) e α -humuleno (9,43%); [5] *C. paupera*: α -copaeno (47,91%), δ -cadineno (11,31%) e aromadendreno (7,64%); [6] *C. publiflora*: β -cariofileno (29,84%), β -elemeno (18,08%) e β -salineno (11,48%); [7] *oblongifolia*: β -bisaboleno (33,82%), β -elemeno (27,61%) e α -bergamoteno (12,69%); [8] *C. trapezifolia*: β -cariofileno (32,75%), α -copaeno (27,74%) e β -bisaboleno (7,34%); [9] *Copaifera* sp.: β -bisaboleno (30,10%), α -bergamoteno (24,99%) e β -salineno (7,44%); [10] Comercial C-I: β -cariofileno (36,20%), α -copaeno (10,04%) e α -bergamoteno (9,65%); [11] Comercial C-II: β -cariofileno (34,58%), α -bergamoteno (17,38%) e α -humuleno (8,07%); [12] Comercial C-III: β -cariofileno (41,11%), bergamoteno (13,11%) e α -humuleno (10,77%); [13] Comercial C-IV: β -cariofileno (34,56%), α -copaeno (11,27%) e α -bergamoteno (10,81%); [14] Comercial C-V: α -bergamoteno (30,57%), β -bisaboleno (26,58%) e β -salineno (9,16%); e [16] Comercial C-VI: β -cariofileno (31,20%), Germacreno D (12,42%) e α -copaeno (10,27%).

Tabela 18. Composição química dos voláteis das amostras de oleorresinas autênticas e comerciais de *Copaifera* spp.

#	Substância	IR _{Exp}	IR _{Lit}	Porcentagem de área relativa nos cromatogramas															
				ORCl _d	ORCd	ORCr	ORCm	ORC _{pp}	ORC _{pb}	ORCo	ORCt	ORC _{sp}	C-I	C-II	C-III	C-IV	C-V	C-VI	
1	δ -elemeno	1340	1343	0,96	0,28	-	0,47	-	0,23	0,13	0,67	-	1,09	0,49	1,33	1,56	-	1,78	
2	α -cubebeno	1353	1356	-	-	-	1,95	9,00	-	-	1,19	0,06	1,65	1,05	0,41	1,82	-	1,48	
3	Ciclosativeno	1370	1371	-	-	0,69	0,25	0,55	0,10	-	0,13	0,28	-	-	-	-	2,50	-	
4	α -ylangeno	1375	1368	0,47	0,46	-	-	-	-	0,55	-	-	0,26	-	0,11	0,38	-	0,31	
5	α -copaeno	1380	1376	0,25	0,44	0,91	20,06	47,91	0,49	0,14	27,74	0,37	10,40	7,40	4,27	11,27	0,56	10,27	
6	Epi-sesquitujeno	1393	1394	0,16	1,03	0,28	-	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-	-	-	
7	β -cubebeno	1394	1392	-	-	-	2,33	-	-	-	2,90	-	-	-	-	-	-	-	
8	β -elemeno	1395	1397	0,35	4,10	3,44	1,48	0,74	18,08	27,61	0,82	3,45	2,28	2,63	1,07	2,73	2,20	3,36	
9	Cipereno	1404	1399	-	-	-	-	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	α -Gurjuneno	1405	1409	-	2,37	2,90	1,34	0,26	8,63	-	-	0,93	0,91	1,18	0,71	1,02	0,47	1,04	
11	β -cariofileno	1427	1421	13,27	19,65	9,97	44,73	5,33	29,84	0,29	32,75	4,59	36,20	34,58	41,11	34,56	0,95	31,20	
12	α -bergamoteno	1440	1440	17,75	8,47	20,86	0,83	1,08	3,90	12,69	3,07	24,99	9,65	17,38	13,11	10,81	30,57	7,80	
13	α -guaiano	1443	1447	-	10,61	5,83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	Norbornano	1446	1450	-	-	-	-	-	-	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	Aristoleno	1448	1450	-	2,11	1,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	β -epi-santaleno	1451	1450	0,19	-	0,18	-	-	-	-	-	0,46	-	0,33	0,21	-	0,43	-	
17	β -fameseno	1459	1457	4,77	-	3,47	-	-	-	-	0,58	4,12	-	0,83	0,71	-	-	0,21	
18	α -humuleno	1460	1455	-	4,83	-	9,43	2,70	5,10	-	3,05	-	8,08	8,07	10,77	7,04	-	6,54	
19	Alloaromadendreno	1460	1462	-	-	-	-	-	-	-	1,69	-	-	-	-	-	-	-	
20	Aromadendreno	1467	1457	-	-	-	1,67	7,64	-	-	-	-	0,85	0,62	0,25	0,86	-	0,99	
21	α -amorfenos	1475	1471	-	-	-	-	-	0,46	-	-	0,98	-	-	-	-	-	2,31	
22	γ -muuroloeno	1475	1477	-	-	-	2,61	1,25	-	0,60	0,43	-	3,19	1,36	1,91	2,83	-	-	
23	Calamenen-3,5-dieno	1478	1477	-	-	-	0,42	1,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
24	γ -selineno	1480	1484	-	-	-	-	-	3,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25	γ -gurjuneno	1485	1478	-	0,94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26	Germacreno D	1487	1481	10,54	-	-	2,41	-	-	-	7,27	-	5,74	4,06	4,42	5,60	-	12,42	
27	α -selineno	1489	1492	-	-	-	-	-	-	10,78	0,18	-	-	-	-	-	-	-	
28	β -selineno	1492	1487	0,08	3,47	5,26	0,16	0,15	11,48	-	-	7,44	1,08	1,64	0,68	0,99	9,16	0,43	

Onde: IR_{Exp} - índice de retenção experimental calculado a partir dos tempos de retenção adquiridos no sistema CG-EM; IR_{Lit}: índice de retenção consultado na literatura; ORCl_d: *C. langsdorffii*, ORCd: *C. duckei*, ORCr: *C. reticulata*, ORCm: *C. multijulga*, ORC_{pp}: *C. paupera*, ORC_{pb}: *C. pubiflora*, ORCo: *C. oblongifolia*, ORCt: *C. trapezifolia*, ORC_{sp}: *Copaifera* sp., C: amostras comerciais de I a VI.

#	Substância	IR _{Exp}	IR _{Lit}	Porcentagem de área relativa nos cromatogramas (continuação)															
				ORCId	ORCd	ORCr	ORCm	ORCpp	ORCpb	ORCo	ORCt	ORCsp	C-I	C-II	C-III	C-IV	C-V	C-VI	
29	Eremofileno	1492	1489	-	4,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	Biciclogermacreno	1495	1495	-	-	-	0,86	-	-	-	0,43	-	-	-	-	-	-		
31	α -zingibereno	1499	1500	0,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
32	α -bulneseno	1505	1494	-	-	4,68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
33	α -muuroleno	1506	1500	-	-	0,18	-	1,01	-	-	-	-	1,16	0,87	0,65	1,22	-	1,27	
34	α -bisaboleno	1506	1503	2,69	-	-	-	-	0,38	-	-	2,79	-	-	-	-	2,36	-	
35	β -bisaboleno	1513	1508	27,60	15,94	22,56	-	0,19	5,28	33,82	7,34	30,10	4,70	4,32	2,81	5,62	26,58	3,87	
36	γ -cadineno	1520	1514	-	1,14	-	0,24	0,58	-	-	-	-	1,06	-	-	-	-	1,16	
37	β -sesquifelandreno	1528	1524	3,11	-	1,88	-	-	-	-	0,27	2,53	-	-	-	-	-	-	
38	δ -cadineno	1529	1531	-	-	-	3,83	11,31	-	-	2,19	-	3,81	3,34	2,99	3,71	-	4,23	
39	Germacrene B	1564	1562	0,36	-	-	-	-	0,10	-	2,89	-	1,27	1,81	2,06	1,51	-	3,73	
40	8-cariolanol	1578	1573	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,92	-	-	-	
41	Óxido de cariofileno	1590	1587	2,07	-	0,53	1,19	0,31	0,27	2,98	1,06	2,37	1,37	0,17	1,75	0,20	-	-	
42	Viridiflorol	1599	1603	-	-	-	0,11	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
43	3-humulane-1,6-dienol	1627	1627	5,45	-	-	-	1,66	-	-	-	-	0,44	-	-	0,53	-	-	
44	β -farnesene epóxido	1631	1624	-	-	-	-	-	-	-	-	0,24	-	-	-	-	-	-	
45	δ -cadinol	1655	1651	-	-	-	0,28	-	-	-	-	-	-	-	0,58	-	-	-	
46	α -cadinol	1664	1663	-	-	-	0,11	-	-	-	-	-	-	-	0,33	-	-	-	
47	16-Caureno	2051	2043	-	-	-	-	0,47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Área total das substâncias identificadas (%)				90,73	84,68	90,03	96,76	94,02	95,81	89,68	96,65	90,66	97,06	94,17	93,16	95,77	80,88	94,40	

IR_{Exp}: índice de retenção experimental calculado a partir dos tempos de retenção adquiridos no sistema CG-EM; IR_{Lit}: índice de retenção consultado na literatura; ORCId: *C. langsdorffii*, ORCd: *C. duckei*, ORCr: *C. reticulata*, ORCm: *C. multijulga*, ORCpp: *C. paupera*, ORCpb: *C. pubiflora*, ORCo: *C. oblongifolia*, ORCt: *C. trapezifolia*, ORCsp: *Copaifera sp.*, C: amostras comerciais de I a VI.

Os sesquiterpenos α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno e α -bergamoteno foram identificados em todas as oleorresinas analisadas. Veiga-Junior et al. (2007) também descreveram a presença destes quatro sesquiterpenos em amostras de oleorresina de três diferentes espécies: *C. cearensis* Huber ex Ducke, *C. multijuga* Hayne e *C. reticulata* Ducke; atribuindo a estes compostos a denominação de *biomarcadores* do gênero *Copaifera*.

Há que se destacar, ainda, a considerável concentração de β -cariofileno nas ORCm, ORCpb, ORCt, CI, CII, CIII, CIV e C-VI, onde as amostras de ORCm e C-III apresentaram concentração superior a 40%. Cascon e Gilbert (2000) e Gonçalves et al. (2014) também descreve altas concentrações (> 50%) deste terpenoide em amostras de *C. multijuga*. O α -copaeno também foi outra substância identificada em grande concentração, mas para a amostra de *C. paupera* com 47,91 %.

As substâncias δ -elemeno, α -gurjuneno, α -humuleno, β -salineno, β -bisaboleno e óxido de cariofileno foram outros terpenoides que foram identificados na maioria das amostras de oleorresinas aqui investigadas.

Observando os resultados encontrados, constata-se a presença em comum de sesquiterpenos nas oleorresinas coletadas, com ênfase para o α -copaeno, β -cariofileno, α -bergamoteno e β -bisaboleno com as maiores concentrações mensuradas. Contudo suas porcentagens relativas são diferentes entre as distintas espécies investigadas. Estes resultados podem ser justificados por fatores genéticos das espécies e fatores abióticos aos quais os indivíduos estavam expostos (PLOWDEN, 2003).

Os dados qualitativos encontrados para as amostras de *C. langsdorffi*, *C. duckei*, *C. reticulata*, *C. multijuga*, *C. paupera* e *C. pubiflora* estão de acordo com a descrição para oleorresinas autênticas. Porém, ressalta-se que as diferenças de porcentagens relativas encontradas diferem nas publicações de Sousa et al. (2011), Zoghbi et al. (2009) e Santos et al. (2008), fato que pode ser justificado pelo diferente processo extrativo empregado, o qual difere das publicações citadas. Novamente fatores bióticos e abióticos também podem ter influência nessas variações (BARBOSA et al., 2012), muito embora não tenham sido foco no presente estudo.

Informações a respeito dos dados de composição volátil das espécies *C. oblongifolia* e *C. trapezifolia* são escassos, não sendo possível confrontar os dados obtidos com a literatura científica, tornando o presente trabalho o primeiro a apresentar tais informações sobre a composição volátil das oleorresinas destas duas espécies.

A fração volátil de *C. paupera* chamou a atenção entre todas, por apresentar um terpeno de vinte carbonos, 16-caureno, diferenciando-se assim das demais oleorresinas aqui investigadas. No entanto, Baldissera et al. (2014) não citaram a presença desta substância na oleorresina da mesma espécie, sendo que este diterpeno é citado por Veiga-Junior et al. (2007) na fração resinosa de *C. reticulata*.

De modo geral, os dados encontrados para as amostras de autênticas, bem como para as amostras comerciais, estão de acordo com a composição química dos componentes voláteis descritos em diferentes estudos sobre oleorresinas de copaíferas, muito embora poucos trabalhos investiguem a composição de produtos fornecidos comercialmente.

Todas as publicações a respeito da composição química das substâncias voláteis do gênero *Copaifera* invariavelmente aplicam alguma etapa de preparação prévia da amostra, tais como hidrodestilação, separação em coluna cromatográfica e derivatização antes da análise cromatográfica (SOARES et al., 2013; SOUZA, MELLO e LOPES, 2011; VEIGA-JUNIOR et al., 2007). Porém, tais etapas utilizam considerável quantidade de amostra, demandam maiores gastos com reagentes e materiais, maior tempo, além da possível formação de artefatos ou substâncias que podem influenciar nos resultados finais de composição das oleorresinas (D'AGOSTINHO et al., 2015; SOUZA et al., 2011). A fim de contornar os possíveis problemas mencionados, foi proposto e otimizado a utilização da técnica de microextração em fase sólida, seguido de análise em cromatógrafo de fase gasosa (MEFS-CG-EM), para determinação qualitativa simples, rápida e direta de compostos voláteis de amostras de oleorresinas de diferentes espécies e de produto comercializado, uma vez que essa técnica apresenta vantagens como alta sensibilidade e reprodutibilidade, não requer solvente e combina extração e concentração em uma única etapa sem pré-tratamento de amostras, em comparação aos métodos clássicos para avaliação deste produto natural. Destaca-se o fato de não haver relatos científicos até a presente data de sua aplicação em amostras de oleorresinas de *Copaifera*.

5.2.7 Análise da fração volátil (hidrodestilação) das oleorresinas por CG-EM

Na Tabela 19 são apresentados os resultados de CG-EM dos óleos voláteis das espécies de *Copaifera* coletadas, dos quais 47 sinais cromatográficos foram identificados. Analisando os resultados encontrados, foi possível observar que aproximadamente 90% da área total relativa dos cromatogramas tiveram atribuição de seus constituintes químicos, comparando os índices de retenção calculados com os descritos na literatura e os dados dos índices de similaridade de fragmentação das substâncias disponíveis nas bibliotecas espectrais.

Análise dos dados de CG-EM das frações voláteis das oleorresinas indica que estas são constituídas majoritariamente por sesquiterpenos (VEIGA-JUNIOR et al., 2007, LAMEIRA et al., 2009, GELMINI et al., 2012 e TRINDADE et al., 2013), sendo possível observar diferenças qualitativas e quantitativas entre os óleos investigados.

As substâncias majoritárias identificadas para cada espécie foram: [1] *C. langsdorffii*: β -bisaboleno (32,04%), α -bergamoteno (15,14%), e β -cariofileno (9,73%); [2] *C. duckei*: β -bisaboleno (30,90%), α -bergamoteno (21,19%) e β -salineno (7,21%) e β -cariofileno (5,98%); [3] *C. reticulata*: β -bisaboleno (24,91%), α -bergamoteno (21,99%), β -salineno (12,17%) e α -salineno (11,43%); [4] *C. multijuga*: β -cariofileno (45,64%), α -humuleno (15,47%) e α -copaeno (14,05%), [5] *C. paupera*: α -copaeno (34,88%), δ -cadineno (13,93%) e Aloaromadrendeno (7,75); [6] *C. pubiflora*: β -cariofileno (27,28%), β -elemeno (17,37%), α -zingibereno (13,07%). [7] *C. trapezifolia*: β -cariofileno (23,86%), α -copaeno (18,80%), e β -bisaboleno (11, 27%), [8] *Copaifera* sp.: β -bisaboleno (18,62%), β -cariofileno (15,88%) e α -bulneseno (11,46%).

Tabela 19. Composição química da fração volátil (óleo) das amostras de oleorresinas autênticas e comerciais de copaíferas.

#	Substância	IR _{Exp}	IR _{Lit}	Porcentagem de área relativa nos cromatogramas							
				ORCld	ORCd	ORCr	ORCm	ORCp	ORCpb	ORCt	ORCsp
1	δ -Elemeno	1341	1343	1,32	-	-	-	-	-	0,68	-
2	α -Cubebeno	1353	1353	-	-	-	0,88	9,90	-	3,49	-
3	Cicloisosativeno	1371	1370	-	-	0,33	-	0,40	0,17	0,16	-
4	α -Ilangeno	1376	1468	-	-	-	-	0,08	-	-	-
5	α -Copaeno	1380	1377	0,15	0,14	0,38	14,05	34,88	0,38	18,80	0,26
6	Episesquitujeno	1393	1389	0,09	0,29	0,50	-	-	-	-	1,09
7	Isocariofileno	1394	1404	-	-	-	-	2,48	-	-	-
8	β -Elemeno	1396	1397	0,38	2,38	2,54	-	-	17,37	-	3,37
9	α -Gurjuneno	1405	1409	-	-	1,35	0,70	-	6,76	-	1,21
10	α -Santaleno	1419	1417	-	-	0,36	-	-	-	-	-
11	β -Cariofileno	1426	1421	9,73	5,98	7,71	45,64	5,40	27,28	23,86	15,88
12	α -Bergamoteno	1440	1440	15,14	21,19	21,99	0,66	1,00	3,10	5,67	7,62
13	α -Guaiaeno	1444	1447	-	-	-	-	-	-	-	8,16
14	Aristoleno	1448	1455	-	-	1,04	-	-	-	-	-
15	β -Santaleno	1452	1462	-	0,26	0,17	-	-	-	-	-
16	Norbornano	1452	1462	0,12	-	-	-	-	-	-	-
17	β -Fameseno	1459	1457	3,98	4,65	3,96	-	-	-	-	-
18	α -Humuleno	1460	1455	-	-	-	15,47	3,26	6,89	4,44	5,56
19	Aloaromadendreno	1467	1457	-	-	-	1,05	7,75	-	2,43	-
20	β -Chamigreno	1480	1488	-	-	1,56	-	-	3,36	-	-
21	α -Muroloeno	1482	1480	-	-	-	4,18	0,82	-	-	-
22	Germacreno D	1482	1481	13,10	0,88	-	2,97	1,26	-	6,29	3,29
23	α -Amorfeno	1482	1485	-	-	-	-	-	-	0,79	-
24	α -Curcumeno	1487	1480	-	0,20	-	-	-	-	-	-
25	β -Selineno	1493	1487	-	7,21	12,17	-	-	-	0,30	9,86
26	α -Zingibereno	1499	1496	0,40	-	-	-	-	-	-	-
27	Ledeno	1501	1500	-	-	-	-	1,31	-	-	-
28	α -Selineno	1501	1498	-	4,58	11,43	-	-	9,25	-	-

IR_{Exp}: índice de retenção experimental calculado a partir dos tempos de retenção adquiridos no sistema CG-EM; IR_{Lit}: índice de retenção consultado na literatura; ORCld: *C. langsdorffii*, ORCd: *C. duckei*, ORCr: *C. reticulata*, ORCm: *C. multijulga*, ORCp: *C. paupera*, ORCpb: *C. pubiflora*, ORCo: *C. oblongifolia*, ORCt: *C. trapezifolia*, ORCsp: *Copaifera sp.*, C: amostras comerciais de I a VI.

#	Substância	IR _{Exp}	IR _{Lit}	Porcentagem de área relativa nos cromatogramas (continuação)							
				ORC _{Id}	ORC _d	ORC _r	ORC _m	ORC _{pp}	ORC _{pb}	ORC _{lc}	ORC _{sp}
29	α -Bulneseno	1501	1502	-	-	-	-	-	13,07	-	11,46
30	Biciclogermacreno	1503	1500	-	-	-	1,19	-	-	-	-
31	α -Bisaboleno	1506	1503	3,38	4,38	-	-	-	0,39	-	-
32	β -Bisaboleno	1513	1510	32,04	30,90	24,91	-	0,85	6,25	11,27	18,62
33	γ -Cadineno	1520	1514	-	-	-	-	-	-	0,35	-
34	β -Sesquifelandreno	1528	1524	2,80	3,81	2,75	-	-	-	-	-
35	δ -Cadineno	1529	1531	-	-	-	4,33	13,93	-	4,34	-
36	Cubeneno	1538	1538	-	-	-	-	1,32	-	-	-
37	α -Elemol	1547	1557	-	6,07	-	-	-	-	-	-
38	Germacreno B	1564	1562	-	-	-	0,05	-	0,09	4,05	-
39	Viridiflorol	1575	1580	-	-	-	-	0,95	-	-	-
40	Espatuleno	1586	1583	-	-	-	-	-	-	0,20	-
41	Óxido Cariofileno	1591	1589	1,03	0,27	0,21	0,59	0,17	0,23	2,63	0,33
42	1,6-Humulanodien-3-ol	1628	1619	5,58	-	-	-	2,59	-	-	-
43	Hinesol	1638	1638	0,25	-	-	-	-	-	-	-
44	τ -Murolol	1650	1642	-	-	-	-	0,63	-	-	-
45	α -Cadinol	1664	1663	-	-	-	-	0,35	-	-	-
46	α -Bisabolol	1691	1698	0,61	0,32	0,17	-	-	-	-	-
47	16-caureno	2050	2043	-	-	-	-	2,29	-	-	-
Área total das substâncias identificadas (%)				90,10	93,51	93,53	91,76	91,62	94,59	89,75	86,71

IR_{Exp}: índice de retenção experimental calculado a partir dos tempos de retenção adquiridos no sistema CG-EM; IR_{Lit}: índice de retenção consultado na literatura; ORC_{Id}: *C. langsdorffii*, ORC_d: *C. duckei*, ORC_r: *C. reticulata*, ORC_m: *C. multijulga*, ORC_{pp}: *C. paupera*, ORC_{pb}: *C. pubiflora*, ORC_o: *C. oblongifolia*, ORC_t: *C. trapezifolia*, ORC_{sp}: *Copaifera sp.*, C: amostras comerciais de I a VI.

Comparando os dados nas análises de MEFS-CG-EM das oleorresinas brutas com os dados de CG-EM da fração volátil das oleorresinas das mesmas espécies, é possível observar diferenças qualitativas e quantitativas. Segundo Souza, Mello e Lopes (2011), essas diferenças são resultado dos diferentes processos de extração dos componentes voláteis pelos quais foram submetidas as amostras de oleorresinas. O processo convencional do tipo hidrodestilação pode promover formação de artefatos através de reações de hidrólise, rearranjos, isomerizações e oxidações, uma vez que são realizadas em meio aquoso e com elevada temperatura, diferentemente do processo de extração que utiliza microfibras de extração em fase sólida, a qual permite análise de componentes voláteis mais próximas da composição real emitida da amostra investigada em condições ambientais normais.

5.2.8 Desenvolvimento do método CLUE-EM/EM para análise das oleorresinas de *Copaifera*

O desenvolvimento de método analítico empregando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas teve por objetivo fornecer uma ferramenta analítica capaz identificar e quantificar diterpenos presentes em amostras de oleorresinas de espécies de *Copaifera*. A seguir estão apresentados os parâmetros utilizados na validação do método analítico proposto.

5.2.8.1 Seletividade

A seletividade do método CLUE-EM/EM foi verificada utilizando experimentos EM/EM e dados de separação cromatográfica. Os ácidos *ent*-hardwiicko, *ent*-poliáltico, *ent*-diidroagático, *ent*-3 β -hidroxi-copálico, *ent*-agático, *ent*-agático-15-metil-éster e *ent*-3 β -hidroxi-copálico foram analisados utilizando o modo MRM. Entretanto, os ácidos *ent*-caurenoico e *ent*-copálico não apresentaram estabilidade estrutural para definição de modos de transição no MRM usando dissociação induzida por colisão. Desta forma, esses dois últimos analitos foram então analisados empregando o modo SIR (Figura 16). Cada analito foi avaliado separadamente em seu canal de monitoramento durante a análise de MRM, não se observando sinais de respostas nos canais dos outros analitos, demonstrando assim seletividade do método proposto (Tabela 20 e Apêndices 18 a 27).

Figura 16. Cromatograma do método CLUE-EM/EM para os nove diterpenos, onde: **a)** ácido *ent*-caurenoico, **b)** ácido *ent*-hardwiicko, **c)** ácido *ent*-poliáltico, **d)** ácido *ent*-diidroagático, **e)** ácido *ent*-copálico, **f)** ácido *ent*-3 β -hidroxi copálico, **g)** ácido *ent*-agático, **h)** ácido *ent*-agático 15-metil éster, **i)** ácido *ent*-3 β -acetoxi-copálico, e **j)** ácido ferúlico.

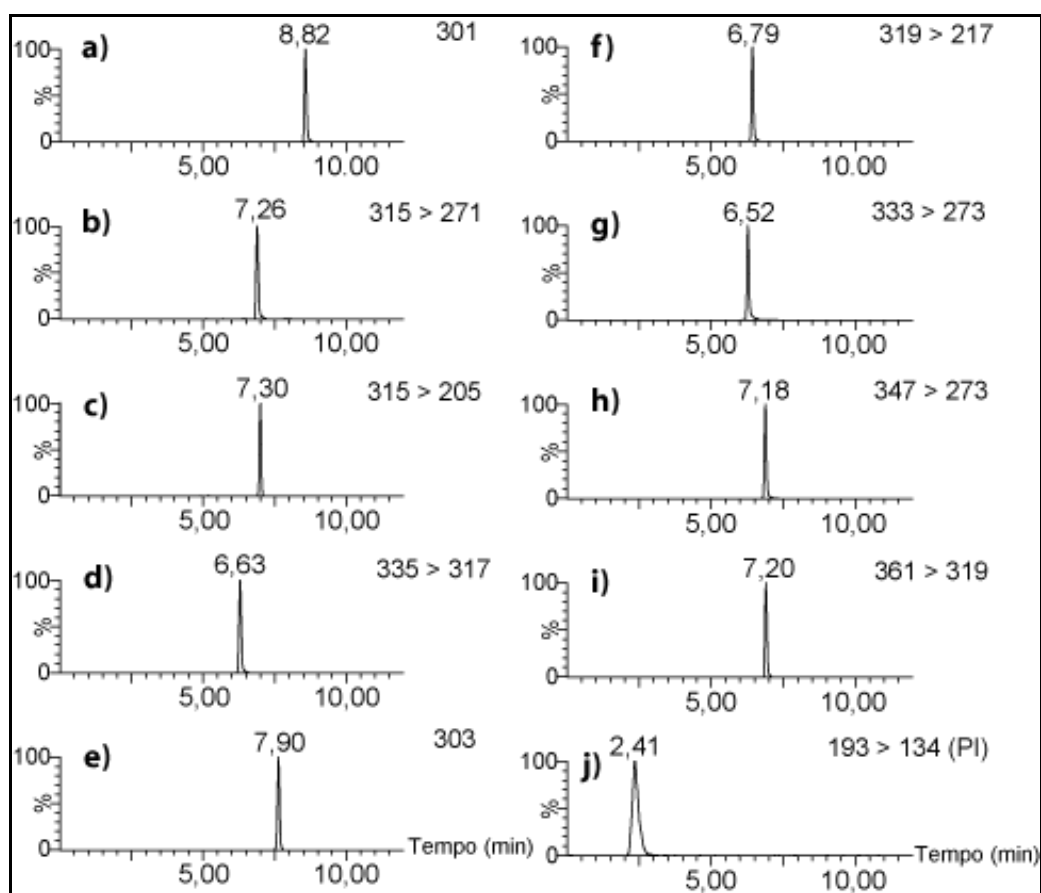


Tabela 20. Parâmetros do espectrômetro de massas empregados na seletividade do método.

Analito	Massa nominal (u)	Modo EM	Íon Precursor (m/z)	Canal	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
Ácido <i>ent</i> -caurenoico	302,2	SIR	301	301	98	-
Ácido <i>ent</i> -hardwiicko	316,2	MRM	315	315 > 271	50	20
Ácido <i>ent</i> -poliáltico	316,2	MRM	315	315 > 205	45	35
Ácido <i>ent</i> -diidroagático	336,2	MRM	335	335 > 317	40	25
Ácido <i>ent</i> -copálico	304,2	SIR	303	303	82	-
Ácido <i>ent</i> -3 β -hidroxi-copálico	320,2	MRM	319	319 > 217	50	25
Ácido <i>ent</i> -agático	334,4	MRM	333	333 > 273	40	25
Ácido <i>ent</i> -agático-15-metil éster	348,2	MRM	347	347 > 273	50	25
Ácido <i>ent</i> -3 β -acetoxi-copálico	362,2	MRM	361	361 > 319	50	20
PI	194,1	MRM	193	193 > 134	50	15

Onde: **tr** é o tempo de retenção, **EM** é o espectrômetro de massa, e **PI** é o padrão interno (ácido ferúlico).

5.2.8.2 Linearidade e faixa de trabalho

A figura de mérito linearidade do método CLUE-EM/EM desenvolvido correlacionou a resposta analítica (área do analito/área do padrão interno) com a concentração do analito em cada nível de concentração das curvas. A linearidade para as nove substâncias isoladas de diferentes oleorresinas foi verificada por meio da construção das curvas analíticas em diferentes concentrações ($n \geq 6$) realizadas em triplicada em diferentes dias, conforme recomendações da literatura e guias de validação (ICH, 2005; KRUIVE et al., 2015b), sendo as medidas de avaliação deste parâmetro foram: o coeficiente de correlação e o valor dos resíduos das repetições nos *pontos* das curvas (Apêndices 28 a 36).

Todas as curvas analíticas produzidas apresentaram excelente linearidade nas condições analíticas propostas, com valores para coeficiente de correlação superior a 0,99 (Tabela 20) e valor residual entre as respostas experimentais e calculadas para cada replicatas em cada nível foi inferior a 20% (Apêndices 28 a 36), estando de acordo com agências reguladores (KRUIVE et al., 2015b).

A faixa de trabalho para os analitos foram: ácido *ent*-caurenóico de 0,025-0,500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ácido *ent*-copálico e ácido *ent*-agático-15-metil éster de 0,250-2,500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ácido *ent*-agático de 0,500-3,500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para os demais ácidos diterpênicos foi de 0,500-5,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.2.8.3 Limites de detecção e (LOD) e quantificação (LOQ)

Os parâmetros LOD e LOQ foram estimados a partir da modelagem matemática das curvas analíticas para cada substância (Tabela 21). Experimentos de diluição adicionais também foram realizados a fim de se buscaram menores níveis de concentração para o LOD.

Todos os diterpenos investigados apresentaram limites de detecção e de quantificação na escala de nanogramas por mililitro. Embora tenha sido percebido que em virtude das condições analíticas empregadas os analitos investigados apresentaram distintas concentrações para ambos os parâmetros, evidenciando assim as diferentes sensibilidades de cada substância nas condições analíticas propostas.

Tabela 21. Parâmetros das curvas analíticas dos nove diterpenos.

Analito	Equação	<i>r</i>	Faixa de trabalho (µg.mL ⁻¹)	LOD (ng.mL ⁻¹)	LOQ (ng.mL ⁻¹)
Ácido <i>ent</i> -caurenoico	$y = 353,6937 x + 7,5513$	0,9978	0,025 - 0,500	16,0	25,0
Ácido <i>ent</i> -hardwiicko	$y = 0,3985 x + 0,4009$	0,9981	0,500 - 5,000	213,0	500,0
Ácido <i>ent</i> -poliáltico	$y = 0,0278 x - 0,0011$	0,9966	0,250 - 5,000	193,5	250,0
Ácido <i>ent</i> -diidroagático	$y = 5,3515 x + 0,0366$	0,9944	0,250 - 5,000	172,0	250,0
Ácido <i>ent</i> -copálico	$y = 17,2721 x + 2,3190$	0,9980	0,250 - 2,500	47,5	144,0
Ácido <i>ent</i> -3β-hidroxi copálico	$y = 4,3131 x + 1,4240$	0,9987	0,500 - 5,000	210,0	500,0
Ácido <i>ent</i> -agático	$y = 0,9538 x + 0,0999$	0,9997	0,050 - 3,500	30,5	50,0
Ácido <i>ent</i> -agático-15-metil éster	$y = 45,9607 x + 12,7123$	0,9981	0,250 - 2,500	106,0	250,0
Ácido <i>ent</i> -3β-acetoxi-copálico	$y = 1,5573 x + 1,0231$	0,9990	0,500 - 5,000	76,0	230,0
PI	-	-	0,25	-	-

Onde: *y* é a resposta analítica, *x* é a concentração em µg.mL⁻¹, **PI** é o padrão interno, *r* é o coeficiente de correlação, **LOD** é o limite de determinação e **LOQ** é o limite de quantificação.

Os ácidos *ent*-caurenoico, *ent*-copálico, *ent*- agático e *ent*-3β-acetoxi-copálico foram as substâncias que apresentaram os menores valores de LOD e LOQ. Experimentos de diluição adicionais encontraram precisão em concentrações para LOD inferiores as estimativas calculadas a partir das equações 3 e 4 para todos os analitos, exceto para os ácidos *ent*-copálico e *ent*-3β-acetoxi-copálico. Desta forma, os níveis de concentração experimental encontrados nesse ensaio foram adotados como os LOD reais para os demais diterpenos. Ainda em relação ao ácido *ent*-copálico os valores de 47,5 e 144,0 ng.mL⁻¹ para o LOD e LOQ, respectivamente, foram inferiores aos descritos por Sousa et al. (2013), os quais utilizaram o sistema CLAE-UV/Vis para análise desse metabólito em oleorresina de *C. langsdorffii*, demonstrando maior sensibilidade do método aqui proposto.

A estimativa dos valores de limite de detecção e quantificação para todos os analitos, permite inferir que com uma pequena quantidade de amostras (> 1 µg) de oleorresina de *Copaifera* foi possível investigar e quantificar pelo método CLUE-EM/EM desenvolvido nove diterpenos.

5.2.8.4 Precisão

A precisão foi expressa por meio do desvio padrão relativo (%) de aferições em três níveis de concentração diferentes em experimentos de repetibilidade intra- e interdias (Tabela 22).

Os valores estimados para o DPR (%) foram inferiores a 20% para todos os analitos, indicando que o método analítico proposto é preciso (EURL, 2015), uma vez que foi caracterizado a proximidade entre todas as aferições realizadas obtidas por medições repetidas sob as mesmas condições analíticas propostas.

Tabela 22. Precisão do método CLUE-EM/EM para nove diterpenos utilizando três níveis de concentração.

Substância	Níveis de Concentração*	Intradias - DPR (%)			Interdias - DPR (%)
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	
Ácido <i>ent</i> -caurenoico	baixo (0,125)	1,29	0,94	7,41	6,95
	médio (0,275)	3,88	2,87	2,54	3,93
	alto (0,350)	1,97	2,72	2,34	2,29
Ácido <i>ent</i> -hardwiicko	baixo (1,250)	2,49	1,84	12,50	8,87
	médio (2,750)	1,81	7,40	2,66	5,66
	alto (3,500)	1,30	2,25	2,25	6,31
Ácido <i>ent</i> -poliáltico	baixo (1,250)	4,05	3,67	13,78	10,00
	médio (2,750)	5,43	6,03	5,02	6,89
	alto (3,500)	1,42	2,46	3,91	6,38
Ácido <i>ent</i> -diidroagático	baixo (1,250)	2,14	1,13	11,50	9,08
	médio (2,750)	2,98	12,38	2,74	12,42
	alto (3,500)	0,63	0,66	1,19	14,24
Ácido <i>ent</i> -copálico	baixo (0,625)	2,53	2,52	7,08	14,41
	médio (1,375)	1,98	5,65	2,44	11,09
	alto (1,750)	2,24	4,40	3,89	9,20
Ácido <i>ent</i> -3 β -hidroxi-copálico	baixo (1,250)	3,71	3,59	11,30	8,44
	médio (2,750)	4,00	7,82	2,57	8,42
	alto (3,500)	2,33	4,78	7,37	9,47
Ácido <i>ent</i> -agático	baixo (1,250)	3,07	1,14	10,10	7,90
	médio (2,750)	3,22	9,80	3,54	10,83
	alto (3,500)	0,74	1,62	1,78	13,76
Ácido <i>ent</i> -15-metil-ester	baixo (0,625)	2,22	1,01	12,64	8,37
	médio (1,375)	2,12	8,80	2,65	7,71
	alto (1,750)	0,55	1,40	2,20	9,49
Ácido <i>ent</i> -3 β -acetoxi-copálico	baixo (1,250)	2,45	1,34	13,10	8,47
	médio (2,750)	2,08	8,67	4,43	10,12
	alto (3,500)	1,92	2,02	1,50	12,02

Onde: **DPR** é o desvio padrão relativo e * indica os níveis de concentração expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.2.8.5 Exatidão

O parâmetro exatidão foi verificado utilizando o recurso de adição de quantidade conhecidas de todos os analitos em soluções em três amostras de oleorresinas (*C. reticulata*, *C. multijuga* e *C. paupera*) em três níveis de concentração e analisadas nas condições descritas na seção 4.2.8.1. Os resultados de exatidão do método foram resumidos e apresentados na Tabela 23.

As taxas de concordância entre os dados de respostas experimentais e nominais variaram entre 90 – 120% para as amostras analisadas, exceto para o maior nível analisando o ácido *ent*-caurenoico na amostra de oleorresina de *C. paupera* fortificada. Tais dados indicam que de modo geral, o método CLUE-EM/EM proposto apresentou exatidão satisfatória para análise ao mesmo tempo dos nove analitos investigados em diferentes amostras de oleorresinas.

Tabela 23. Exatidão do método CLUE-EM/EM para nove diterpenos utilizando três níveis de concentração.

Substâncias	Exatidão (%)								
	ORCr			ORCm			ORCpp		
	baixo*	médio*	alto*	baixo*	médio*	alto*	baixo*	médio*	alto*
Ácido <i>ent</i> -caurenoico	104,9 ± 0,5	100,3 ± 2,1	112,4 ± 0,9	99,1 ± 1,3	102,1 ± 4,0	97,0 ± 1,5	93,1 ± 1,7	102,6 ± 0,5	122,5 ± 0,1
Ácido <i>ent</i> -hardwiicko	103,8 ± 5,8	91,8 ± 1,9	98,4 ± 0,6	116,5 ± 0,9	112,0 ± 4,1	102,4 ± 3,2	91,8 ± 11,3	96,3 ± 1,1	105,1 ± 3,1
Ácido <i>ent</i> -poliáltico	99,3 ± 3,4	100,6 ± 2,7	98,5 ± 4,9	109,0 ± 0,1	96,9 ± 2,4	109,5 ± 1,9	108,9 ± 6,5	107,4 ± 3,0	94,5 ± 1,1
Ácido <i>ent</i> -diidroagático	106,8 ± 1,6	106,6 ± 2,0	115,7 ± 3,4	110,1 ± 2,1	102,1 ± 2,5	99,9 ± 2,1	105,7 ± 4,4	103,3 ± 0,9	101,0 ± 1,2
Ácido <i>ent</i> -copálico	105,5 ± 1,2	91,8 ± 1,4	94,5 ± 0,3	97,8 ± 2,7	104,3 ± 2,6	94,5 ± 1,8	100,8 ± 4,6	112,2 ± 3,0	108,2 ± 3,4
Ácido <i>ent</i> -3 β -hidroxi-copálico	117,5 ± 2,4	114,4 ± 4,9	118,4 ± 4,3	108,1 ± 1,9	105,6 ± 2,1	100,7 ± 2,9	103,1 ± 6,9	106,8 ± 1,9	104,0 ± 1,4
Ácido <i>ent</i> -agático	99,3 ± 2,6	101,9 ± 1,6	111,2 ± 3,6	96,4 ± 5,1	101,6 ± 2,1	101,6 ± 2,2	95,5 ± 8,9	101,0 ± 2,3	100,9 ± 2,4
Ácido <i>ent</i> -agático-15-metil-éster	121,9 ± 3,5	113,7 ± 3,5	118,1 ± 0,2	112,9 ± 0,3	107,6 ± 1,4	104,9 ± 1,6	101,5 ± 2,0	100,4 ± 2,6	100,2 ± 1,3
Ácido <i>ent</i> -3 β -acetoxi-copálico	98,6 ± 0,6	104,9 ± 0,9	102,4 ± 3,1	104,8 ± 0,5	103,7 ± 4,7	105,2 ± 1,7	99,2 ± 5,4	98,3 ± 3,2	94,5 ± 1,4

Onde: **ORCr**, **ORCm** e **ORCpp** são oleorresinas de *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne e *C. paupera* Herzog, e * indica os níveis de concentração adicionados a 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de amostras de oleorresinas.

5.2.8.6 Robustez

A sensibilidade do método frente a variações premeditadas e deliberadas na temperatura da análise cromatográfica e porcentagem de aditivo de fase móvel foram avaliados (Tabela 24).

A mudança da temperatura da coluna de 37°C para 40°C promoveu variações no tempo de retenção e na resposta analítica para todos os analitos em todos os níveis investigados. Os ácidos *ent*-caurenoico, *ent*-copálico, *ent*-hardwiicko, *ent*-3 β -hidroxi copálico e *ent*-agático-15-metil éster apresentaram diminuição da resposta analítica em pelo menos um nível de concentração analisado, elevando-se a temperatura de 37°C para 40°C. Porém as demais substâncias apresentam comportamento contrário.

O aumento do percentual dos aditivos de fase móvel de 0,05% para 0,10% promoveu a diminuição no tempo de retenção e aumento da resposta analítica de todos os diterpenos em pelo menos um dos níveis de concentração avaliados.

Claramente, a análise de variância demonstrou que a resposta analítica é proporcional ao nível de concentração de cada analito e que a elevação da temperatura e da concentração dos modificadores de fase móvel reduz o tempo de retenção das substâncias investigadas.

Em cada linha da Tabela 24 letras minúsculas (a e b) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras de oleorresinas investigadas (ANOVA).

Os dados experimentais encontrados para o parâmetro da robustez indicam que o método CLUE-EM/EM desenvolvido é susceptível a pequenas variações na temperatura e no percentual dos modificadores da fase móvel. Desta forma, o método proposto deve ter suas condições analíticas rigorosamente controladas, tanto na construção das curvas analíticas quanto na análise das amostras.

Tabela 24. Resultados para o teste de robustez do método CLUE-EM/EM.

Substância	Nível ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Temperatura				Aditivo de fase móvel			
		37°C		40°C		0,05%		0,10%	
		t_r (min)	Resposta	t_r (min)	Resposta	t_r (min)	Resposta	t_r (min)	Resposta
Ácido <i>ent</i> -caurenoico	baixo (0,125)	8,66 ^a	60,49 ± 5,37 ^a	8,73 ^b	54,91 ± 2,90 ^a	9,33 ^a	36,33 ± 0,65 ^a	8,73 ^b	54,91 ± 2,90 ^b
	médio (0,275)	8,65 ^a	128,42 ± 0,75 ^a	8,70 ^b	99,38 ± 3,78 ^b	9,35 ^a	70,54 ± 3,05 ^a	8,70 ^b	99,38 ± 3,78 ^b
	alto (0,350)	8,64 ^a	152,78 ± 2,70 ^a	8,69 ^b	114,63 ± 4,33 ^b	9,37 ^a	83,66 ± 1,05 ^a	8,69 ^b	114,63 ± 4,33 ^b
Ácido <i>ent</i> -hardwiicko	baixo (1,250)	6,98 ^a	0,88 ± 0,02 ^a	7,01 ^b	0,88 ± 0,03 ^a	7,95 ^a	0,93 ± 0,01 ^a	7,01 ^b	0,88 ± 0,03 ^b
	médio (2,750)	6,96 ^a	1,54 ± 0,01 ^a	6,99 ^b	1,50 ± 0,05 ^a	7,93 ^a	1,69 ± 0,04 ^a	6,99 ^b	1,50 ± 0,05 ^b
	alto (3,500)	6,96 ^a	1,76 ± 0,03 ^a	6,98 ^a	1,60 ± 0,04 ^b	7,92 ^a	1,93 ± 0,01 ^a	6,98 ^b	1,60 ± 0,04 ^b
Ácido <i>ent</i> -poliáltico	baixo (1,250)	7,08 ^a	0,04 ± 0,00 ^a	7,11 ^b	0,03 ± 0,00 ^b	7,99 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	7,11 ^b	0,03 ± 0,00 ^a
	médio (2,750)	7,08 ^a	0,08 ± 0,00 ^a	7,10 ^b	0,07 ± 0,00 ^b	7,98 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	7,10 ^b	0,07 ± 0,00 ^a
	alto (3,500)	7,07 ^a	0,10 ± 0,00 ^a	7,10 ^b	0,09 ± 0,00 ^b	7,97 ^a	0,08 ± 0,00 ^a	7,10 ^b	0,09 ± 0,00 ^b
Ácido <i>ent</i> -diidroagático	baixo (1,250)	6,43 ^a	6,83 ± 0,16 ^a	6,42 ^b	7,46 ± 0,19 ^b	6,85 ^a	5,39 ± 0,06 ^a	6,42 ^b	7,46 ± 0,19 ^b
	médio (2,750)	6,42 ^a	14,90 ± 0,17 ^a	6,40 ^b	15,92 ± 0,24 ^b	6,85 ^a	11,86 ± 0,18 ^a	6,40 ^b	15,92 ± 0,24 ^b
	alto (3,500)	6,43 ^a	18,22 ± 0,44 ^a	6,39 ^b	19,20 ± 0,40 ^b	6,83 ^a	14,18 ± 0,06 ^a	6,39 ^b	19,20 ± 0,40 ^b
Ácido <i>ent</i> -copálico	baixo (0,625)	7,71 ^a	14,53 ± 0,96 ^a	7,63 ^a	13,37 ± 0,97 ^a	8,53 ^a	8,24 ± 0,43 ^a	7,63 ^b	13,37 ± 0,97 ^b
	médio (1,375)	7,71 ^a	28,46 ± 2,20 ^a	7,64 ^a	25,12 ± 3,41 ^a	8,51 ^a	18,11 ± 1,63 ^a	7,64 ^b	25,12 ± 3,14 ^b
	alto (1,750)	7,71 ^a	39,13 ± 1,31 ^a	7,63 ^b	30,97 ± 1,53 ^b	8,49 ^a	24,17 ± 0,44 ^a	7,63 ^b	30,97 ± 1,53 ^b
Ácido <i>ent</i> -3 β -hidroxi-copálico	baixo (1,250)	6,58 ^a	7,21 ± 0,16 ^a	6,56 ^a	7,09 ± 0,28 ^a	6,96 ^a	5,39 ± 0,12 ^a	6,56 ^b	7,09 ± 0,28 ^b
	médio (2,750)	6,57 ^a	13,25 ± 0,21 ^a	6,54 ^b	13,78 ± 0,24 ^b	6,95 ^a	11,42 ± 0,34 ^a	6,54 ^b	13,78 ± 0,24 ^b
	alto (3,500)	6,58 ^a	16,10 ± 0,32 ^a	6,54 ^a	15,60 ± 0,35 ^a	6,94 ^a	13,43 ± 0,14 ^a	6,54 ^b	15,60 ± 0,35 ^b
Ácido <i>ent</i> -agático	baixo (1,250)	6,42 ^a	1,26 ± 0,03 ^a	6,28 ^a	1,31 ± 0,03 ^a	6,73 ^a	1,07 ± 0,01 ^a	6,28 ^b	1,31 ± 0,03 ^b
	médio (2,750)	6,41 ^a	2,61 ± 0,03 ^a	6,27 ^b	2,75 ± 0,04 ^b	6,72 ^a	2,38 ± 0,02 ^a	6,27 ^b	2,75 ± 0,04 ^b
	alto (3,500)	6,42 ^a	3,25 ± 0,04 ^a	6,27 ^b	3,40 ± 0,05 ^b	6,71 ^a	2,96 ± 0,04 ^a	6,27 ^b	3,40 ± 0,05 ^b
Ácido <i>ent</i> -agático-15-metil-éster	baixo (0,625)	6,96 ^a	42,72 ± 1,07 ^a	6,88 ^a	42,65 ± 1,15 ^a	7,84 ^a	28,77 ± 0,26 ^a	6,88 ^b	42,65 ± 1,15 ^b
	médio (1,375)	6,96 ^a	79,14 ± 1,19 ^a	6,88 ^a	79,20 ± 1,12 ^a	7,84 ^a	54,03 ± 0,74 ^a	6,88 ^b	79,20 ± 1,12 ^b
	alto (1,750)	6,96 ^a	92,53 ± 1,29 ^a	6,88 ^a	88,28 ± 2,61 ^a	7,82 ^a	61,14 ± 0,93 ^a	6,88 ^b	88,28 ± 2,61 ^b
Ácido <i>ent</i> -3 β -acetoxi-copálico	baixo (1,250)	6,98 ^a	3,18 ± 0,05 ^a	7,01 ^b	3,00 ± 0,06 ^b	7,90 ^a	3,03 ± 0,06 ^a	7,01 ^b	3,00 ± 0,06 ^a
	médio (2,750)	6,98 ^a	5,62 ± 0,05 ^a	6,99 ^b	5,29 ± 0,07 ^b	7,88 ^a	5,81 ± 0,15 ^a	6,99 ^b	5,29 ± 0,07 ^b
	alto (3,500)	6,98 ^a	6,56 ± 0,10 ^a	6,98 ^b	5,89 ± 0,22 ^b	7,87 ^a	6,92 ± 0,15 ^a	6,98 ^b	5,89 ± 0,22 ^b

5.2.8.7 Aplicação do método (análise das amostras)

Em seguida ao desenvolvimento, otimização e validação do método CLUE-EM/EM para análise de nove diterpenos foram analisadas 10 amostras autênticas (*C. langsdorffii* Desf., *C. duckei* Dwyer, *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. paupera* (Herzog) Dwyer, *C. pubiflora* Benth, *C. lucens* Dwyer, *C. oblongifolia* Mart, *C. trapezifolia* Hayne, e *Copaifera* sp.) e 06 amostras comerciais de oleorresinas.

Os resultados analíticos (Tabela 25) foram obtidos por meio de cálculos empregando as equações das curvas analíticas e corrigidos pelo fator de diluição realizado em cada amostra separadamente, os quais indicaram diferenças qualitativas e quantitativas no teor de diterpenos ácidos, tanto nas amostras autênticas quanto nas amostras comerciais.

As amostras de ORCsp, ORCr e ORCd foram as amostras que apresentaram o maior número de substâncias identificadas, diferentemente das amostras de ORCo e ORClc que continham apenas duas e três substâncias respectivamente.

Análise dos resultados permitiu observar que os ácidos *ent*-caurenoico, *ent*-poliáltico e *ent*-copálico foram identificados e quantificados em quase todas as amostras investigadas, sendo estes compostos mais o ácido *ent*-hardwiicko frequentemente descritos em publicações que investigam a composição química de diferentes espécies do gênero *Copaifera* (LEANDRO et al., 2012).

O ácido *ent*-copálico foi encontrado em quinze das 16 amostras investigadas, com destaque para ORCpb, ORCsp, ORCr e C-IV, as quais apresentaram altas concentrações para este analito. Veiga-Junior e Pinto (2002) e Leandro et al. (2012) investigaram a composição química de oleorresina de diferentes espécies de *Copaifera* e indicaram que este metabólito secundário é um biomarcador deste gênero de plantas. No entanto, a amostra ORCd coletada no município de Belém-PA não continha este analito, todavia, dados preliminares de isolamento fitoquímico da mesma amostra realizados pela equipe do Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio (UNIFAN) indicaram a presença um isômero de um ácido *ent*-copálico; apresentando assim um novo dado a respeito da composição química deste produto natural. Diversas publicações sobre do ácido *ent*-copálico indicam que este composto apresenta significativa atividade contra microorganismos, tais como: *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus salivarius* (LEANDRO et al., 2012).

O ácido *ent*-caurenoico foi encontrado em aproximadamente 2/3 das amostras analisadas, com exceção de ORCm, ORClc, C-II e C-VI. Este diterpeno apresentou atividade leishmanicida contra *L. amazonensis* (MIRANDA et al., 2015), demonstrando assim o potencial desse produto natural como alternativa aos tratamentos convencionais para essa doença negligenciável.

O ácido *ent*-poliáltico foi o principal componente nas amostras de oleorresinas de *C. duckei*, *C. reticulata* e *C. lucens*. Santos et al. (2008) também descreveram este diterpeno em alta concentração em ORClc, em estudo de atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Leishmania amazonenses*.

O ácido *ent*-3 β -acetoxi copálico foi identificado e quantificado em 11 das 16 amostras, exceto nas amostras ORCd, ORCpp, ORCo, ORCt e C-V. Esse metabólito apresentou atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (OHSAKI, et al., 1994).

Já o ácido *ent*-agático-15-metil éster foi observado apenas nas amostras de ORCd, ORCr e ORCsp. Bardají et al. (2016) descreveram a presença deste diterpeno em amostras de oleorresina de *C. reticulata* em estudo de investigação de atividade antimicrobiana deste produto natural frente a bactérias patógenas do trato oral de humanos. A publicação de Tincussi et al. (2002) também reporta a presença deste diterpeno em amostra de oleorresina de *Copaifera*, todavia os mesmos investigaram amostras de oleorresinas da espécie *C. paupera* coletada no Peru. É importante destacar que esse diterpeno não foi identificado em nenhuma das amostras comerciais investigadas.

Os dados de quantificação das amostras comerciais demonstram a presença de pelo menos cinco dos analitos investigados. Embora, os teores encontrados foram inferiores aos encontrados para as amostras de oleorresinas autênticas coletadas no território brasileiro. É importante salientar que os rótulos das embalagens dos produtos comercializados não descrevem com clareza o teor contido de oleorresina e qual ou quais espécie foram a fonte, sendo em muitos casos apenas descrito como “oleorresina de *Copaifera officinalis*”.

Tabela 25. Quantificação dos nove diterpenos em amostras de oleorresinas utilizando o método CLUE-EM/EM.

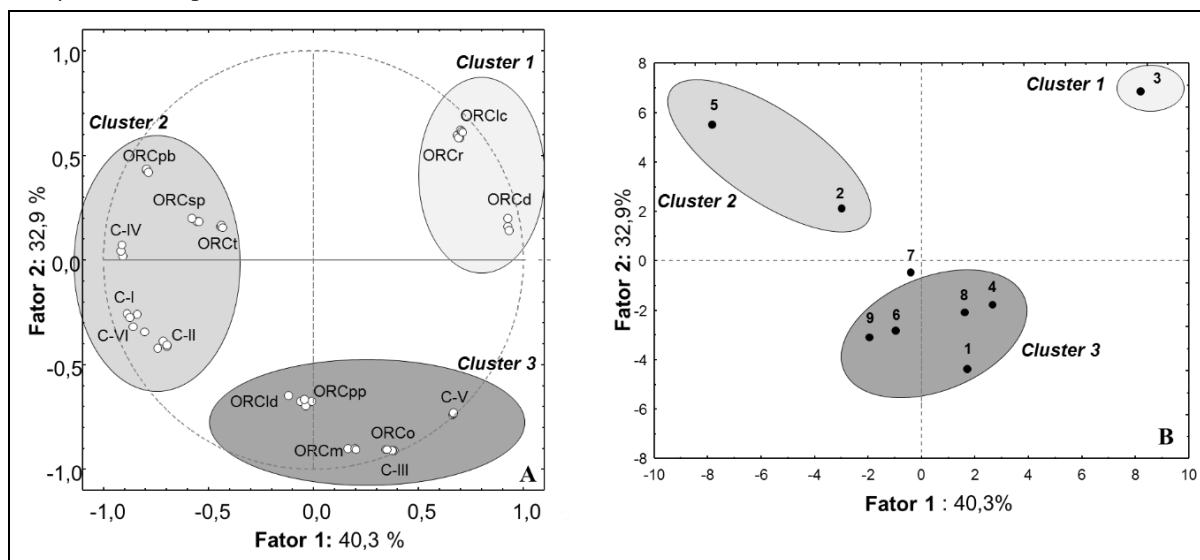
Oleorresina	Concentração de diterpenos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) em oleorresinas								
	ácido <i>ent-caurenoico</i>	ácido <i>ent-hardwiicko</i>	ácido <i>ent-poliáltico</i>	ácido <i>ent-diidroagático</i>	ácido <i>ent-copálico</i>	Ácido <i>ent-3β-hidróxi-copálico</i>	ácido <i>ent-agático</i>	ácido <i>ent-agático-15-metil éster</i>	ácido <i>ent-3β-acetoxi-copálico</i>
ORCId	36,82 \pm 0,33 ^d	65,57 \pm 0,93 ^d	0,72 \pm 0,14 ^a	0,00 ^a	108,92 \pm 7,97 ^d	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	1,86 \pm 0,17 ^b
ORCd	0,13 \pm 0,01 ^a	0,00 ^a	458,96 \pm 33,81 ^d	75,39 \pm 2,57 ^c	0,00 ^a	0,00 ^a	23,69 \pm 1,25 ^e	3,24 \pm 0,07 ^b	0,00 ^a
ORCr	0,05 \pm 0,00 ^a	0,00 ^a	407,35 \pm 11,07 ^c	0,00 ^a	153,05 \pm 1,84 ^e	0,00 ^a	20,10 \pm 0,46 ^d	4,25 \pm 0,04 ^c	5,21 \pm 0,13 ^c
ORCm	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	47,69 \pm 2,92 ^c	4,79 \pm 0,18 ^c	0,42 \pm 0,04 ^a	0,00 ^a	20,11 \pm 1,07 ^e
ORCpp	39,71 \pm 1,10 ^e	61,22 \pm 0,33 ^{cd}	0,00 ^a	0,93 \pm 0,04 ^a	106,24 \pm 2,51 ^d	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
ORCpb	0,02 \pm 0,00 ^a	266,10 \pm 2,64 ^f	1,83 \pm 0,05 ^a	0,00 ^a	384,48 \pm 11,73 ^j	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	2,57 \pm 0,16 ^b
ORCIdc	0,00 ^a	0,00 ^a	654,54 \pm 21,66 ^e	0,00 ^a	140,06 \pm 3,60 ^e	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	5,40 \pm 0,19 ^c
ORCo	5,83 \pm 0,09 ^c	0,00 ^a	1,02 \pm 0,10 ^a	0,00 ^a	41,28 \pm 0,83 ^{bc}	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
ORCt	0,07 \pm 0,00 ^a	371,86 \pm 4,26 ^g	1,34 \pm 0,08 ^a	0,00 ^a	174,67 \pm 2,57 ^f	0,00 ^a	0,07 \pm 0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
ORCsp	4,25 \pm 0,06 ^b	59,55 \pm 0,63 ^c	47,73 \pm 1,83 ^b	0,09 \pm 0,00 ^a	273,06 \pm 6,33 ⁱ	5,24 \pm 0,13 ^d	69,60 \pm 2,53 ^f	4,35 \pm 0,04 ^d	1,11 \pm 0,01 ^{ab}
C-I	0,72 \pm 0,02 ^a	61,72 \pm 2,32 ^{cd}	2,18 \pm 0,12 ^a	0,00 ^a	202,18 \pm 6,30 ^h	12,30 \pm 0,10 ^g	16,55 \pm 0,30 ^{bc}	0,00 ^a	29,39 \pm 1,13 ^g
C-II	0,00 ^a	86,76 \pm 0,63 ^e	4,62 \pm 0,69 ^a	0,00 ^a	179,04 \pm 2,70 ^{fg}	15,02 \pm 0,27 ^h	17,65 \pm 0,46 ^c	0,00 ^a	52,43 \pm 0,84 ⁱ
C-III	0,23 \pm 0,01 ^a	0,00 ^a	3,43 \pm 0,16 ^a	0,00 ^a	38,32 \pm 0,12 ^{bc}	1,28 \pm 0,02 ^b	0,30 \pm 0,02 ^a	0,00 ^a	7,49 \pm 0,44 ^d
C-IV	0,43 \pm 0,01 ^a	57,42 \pm 3,19 ^c	3,18 \pm 0,15 ^a	0,00 ^a	259,98 \pm 7,30 ⁱ	8,13 \pm 0,08 ^e	14,77 \pm 0,13 ^b	0,00 ^a	22,77 \pm 0,85 ^f
C-V	4,80 \pm 0,24 ^b	0,00 ^a	49,60 \pm 0,34 ^b	3,24 \pm 0,10 ^b	27,04 \pm 1,67 ^b	0,00 ^a	1,90 \pm 0,74 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
C-VI	0,00 ^a	44,76 \pm 2,58 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a	195,64 \pm 13,8 ^{gh}	11,56 \pm 0,45 ^f	17,34 \pm 0,60 ^c	0,00 ^a	31,75 \pm 1,35 ^h

Onde: **C-I** a **C-VI** são as oleorresinas comerciais adquiridas no mercado brasileiro. Em cada coluna letras minúsculas (a, b, c...) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras de oleorresinas investigadas (ANOVA e pós-teste de Tukey).

As análises qualitativas e quantitativas das amostras de oleorresinas investigadas (Tabela 24) indicaram diferenças significativas ($p < 0,05$) no teor dos diferentes ácidos diterpênicos, tanto nas amostras autênticas quanto nas amostras comerciais, sendo os analitos ácido *ent*-hardwiicko, ácido *ent*-copálico e ácido *ent*-3 β -acetoxi copálico os que mais contribuíram para a diferença observada nas amostras analisadas, uma vez que foi considerado que tais analitos promoveram maior distinção entre as amostras pelo teste de Tukey.

Baseado na análise de PCA, foi possível observar a presença de três grupos diferentes relacionando as semelhanças químicas das amostras investigadas, sendo eles: *Cluster 1* - ORClc, ORCd e ORCr, *Cluster 2* - ORCpb, ORCt, ORCsp, C-I, C-II, C-IV e C-VI, e *Cluster 3* - ORClc, ORCm, ORCpp, ORCo, C-III e C-V. O gráfico de *scores-plot* indicou diferenças nítidas entre os grupos considerando que os dois primeiros componentes representaram mais de 73% da variância total, sendo atribuído como variáveis discriminantes dos *Cluster 1*, 2, e 3 os ácidos *ent*-poliáltico, *ent*-copálico e *ent*-caurenoico, respectivamente (Figura 17).

Figura 17. Análise de Componentes Principais (PCA) das amostras de oleorresinas investigadas, onde: *C. langsdorffii* (ORClc), *C. duckei* (ORCd), *C. reticulata* (ORCr), *C. multijuga* (ORCm), *C. paupera* (ORCpp), *C. pubiflora* (ORCpb), *C. lucens* (ORClc), *C. oblongifolia* (ORCo), *C. trapezifolia* (ORCt), e *Copaifera sp* (ORCsp), ácido *ent*-caurenoico [1], ácido *ent*-hardwiicko [2], ácido *ent*-poliáltico [3], ácido *ent*-diidroagático [4], ácido *ent*-copálico [5], ácido *ent*-3 β -hidroxi copálico [6], ácido *ent*-agático [7], ácido *ent*-agático-15-metil ester [8] e ácido *ent*-3 β -acetoxi copálico [9].



A variação da composição química das oleorresinas de copaíferas tem sido descrita, sendo que alguns autores justificam essas diferenças no tipo e quantidade dos componentes químicos como resultado da interferência de fatores ambientais, diferença na biossíntese dos

metabólitos secundários entre indivíduos da mesma espécie e indivíduos de espécies diferentes (CASCON, 2000; LAMEIRA et al., 2009; GALÚCIO et al., 2016).

Diversos artigos foram publicados descrevendo a composição química e as atividades biológicas de oleorresinas de *Copaifera* e/ou de compostos isolados das mesmas. Contudo, a investigação da composição química aplicando métodos analíticos tem sido pouco reportada (SOUSA et al., 2011; SOUZA et al., 2013; SOUZA et al., 2017). Portanto, o desenvolvimento de um novo método analítico confiável para identificar com precisão os diterpenos ácidos nas oleorresinas de *Copaifera* é de grande importância. Então, o objetivo do desenvolvimento e validação do presente método CLUE-EM/EM para a análise de nove ácidos diterpênicos em oleorresinas de *Copaifera* foi fornecer uma ferramenta analítica para a identificação, separação e quantificação dos principais diterpenos (fração resinosa) presentes em amostras de oleorresina desse gênero de plantas para auxiliar na verificação da qualidade deste produto; permitindo que a comunidade científica, empresas privadas e agências reguladoras/fiscalizadoras utilizem os dados aqui apresentados no auxílio da investigação e regularização desse importante produto natural oriundo da flora brasileira.

5.2.9 Desenvolvimento do método CG-CID para análise das oleorresinas de *Copaifera*

O desenvolvimento do método CG-CID para análise de quatro sesquiterpenos foi uma segunda proposta como ferramenta para investigação de oleorresinas de espécies do gênero *Copaifera*, voltada para quantificação de compostos voláteis. Nas próximas seções são apresentados e discutidos os parâmetros de validação encontrados para o método proposto.

5.2.9.1 Seletividade

A seletividade do método para os sesquiterpenos α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno e α -humuleno foi determinada definindo os seguintes parâmetros cromatográficos: número de pratos teóricos (**N**), fator de retenção (α) e resolução cromatográfica (**R_s**) por meio de análise de três níveis de concentração (n = 3) em triplicata (Tabela 26).

Observando os resultados encontrados, o número de pratos teóricos para cada substância foi superior aos valores recomendados (> 300.000), demonstrando excelente eficiência da coluna cromatográfica utilizada. O fator de separação foi superior ao valor de 1,1 recomendado pela literatura para todos os analitos, exceto para o β -elemeno. Comparando com

os dados de Sousa et al. (2011), o valor de α no presente trabalho foi menor para α -copaeno, igual para α -humuleno e superior para o β -cariofileno. Por fim, a resolução cromatográfica apresentou valores acima aos das recomendações da literatura científica e dos guias de agências reguladoras (FDA, 1994; COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006). É importante salientar que o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) para todos os parâmetros cromatográficos analisados estavam dentro dos limites peritidos.

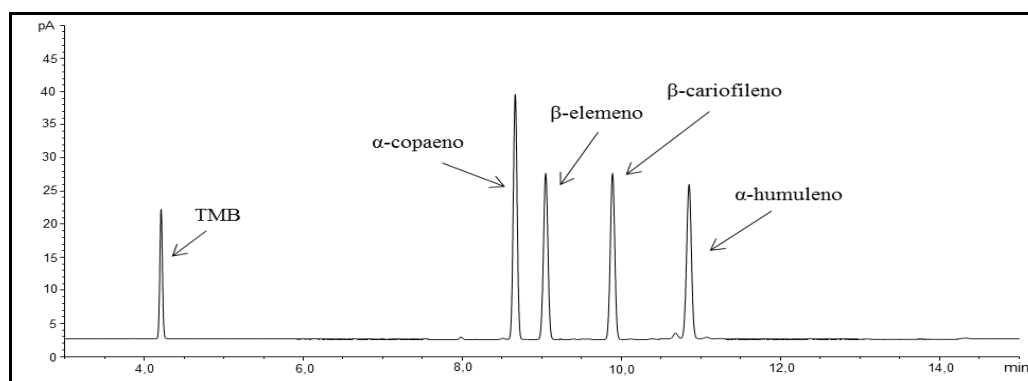
Tabela 26. Respostas para os parâmetros de seletividade do método CG-DIC.

Substância	N		α		R _s	
	Média ± DP	DPR (%)	Média ± DP	DPR (%)	Média ± DP	DPR (%)
α -copaeno	407886 ± 7956	1,95	2,06 ± 0,00	0,03	99,08 ± 0,76	0,77
β -elemeno	412058 ± 7309	1,77	1,04 ± 0,00	0,12	5,83 ± 0,18	3,08
β -cariofileno	401230 ± 6948	1,73	1,10 ± 0,00	0,11	15,08 ± 0,20	1,36
α -humuleno	417133 ± 12535	3,01	1,10 ± 0,00	0,01	14,93 ± 0,14	0,95

Onde: N é o número de pratos teóricos, α é o fator de retenção, R_s é a resolução cromatográfica, DP é o desvio padrão, e DPR (%) é o desvio padrão relativo.

Desta forma, os resultados para figura de mérito tratada nesta seção indicam separação e seletividade satisfatórias do método CG-DIC proposto (Figura 18).

Figura 18. Cromatograma do método CG-DIC para quatro sesquiterpenos.



5.2.9.2 Linearidade e Faixa de trabalho

A partir da construção das curvas analíticas para os quatro sesquiterpenos, a linearidade foi estimada a partir de dois quesitos: o coeficiente de correlação (r) e o valor percentual dos resíduos em cada nível de concentração das curvas analisados em três repetições.

Todas as curvas analíticas construídas apresentaram linearidade satisfatória, uma vez que os valores para coeficiente de correlação foram superiores a 0,99 (Tabela 27) e os valores residuais em porcentagem para todas as replicatas em todos níveis foram inferiores a 20% no LOQ e 15% para os demais níveis de concentração (apêndices 37 a 40), conforme recomendações das agências reguladoras (ICH, 2005), comprovando a adequação do método para fins quantitativos.

A faixa linear de trabalho para os quatro sesquiterpenos ficou definida no intervalo de concentração para todos os analitos entre o LOD e o maior nível de concentração das curvas, que compreendeu a 700 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.2.9.3 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Os limites de detecção e quantificação para α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno e α -humuleno foram determinados a partir de dos dados de cada uma das curvas analíticas separadamente.

Os LOD e LOQ foram inferiores a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 27), respectivamente, ressaltando que o composto β -elemeno apresentou os maiores valores encontrados para ambos os parâmetros.

Tabela 27. Parâmetros das curvas analíticas para os quatro sesquiterpenos.

Substância	Equação	r	Faixa de trabalho ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
α -copaeno	$y = 0,0109 x - 0,2633$	0,9981	100 – 700	8,67	26,28
β -elemeno	$y = 0,0085 x - 0,1222$	0,9973	100 – 700	16,02	48,53
β -cariofileno	$y = 0,0085 x - 0,2032$	0,9982	100 – 700	6,64	20,13
α -humuleno	$y = 0,0085 x - 0,2087$	0,9981	100 – 700	8,58	26,00
PI	-	-	100	-	-

Onde: y é a resposta analítica, x é a concentração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, **PI** é o padrão interno (TMB), r é o coeficiente de correlação, **LOD** é o limite de determinação, e **LOQ** é o limite de quantificação.

Os valores encontrados para os LOD e LOQ para α -copaeno, β -cariofileno e α -humuleno foram superiores ao descritos por Sousa et al. (2011) que propôs um método utilizando um sistema CG-DIC para a quantificação de três sesquiterpenos em óleo volátil extraído da oleorresina de *C. langdorffii*. Destaca-se que os dados encontrados no presente

trabalho estão na mesma escala de concentração descrita na publicação citada acima (SOUSA et al., 2011).

5.2.9.4 Precisão

A precisão foi determinada em termos de repetitividade (precisão intradias) e precisão intermediária (precisão interdias), ambas expressas por meio do *desvio padrão relativo* (Tabela 28), em três níveis de concentração (PASCHOAL et al., 2008).

Observando os valores encontrados, verificou-se que o método proposto para a quantificação dos quatro sesquiterpenos foi preciso, uma vez que o mesmo apresentou valores de desvio padrão relativo em termos de repetitividade e precisão intermediária dentro dos critérios de aceitação (DPR < 20%) recomendados pelas agências regulatórias (ICH, 2005; KRUYE et al, 2015b).

Tabela 28. Precisão do método CG-DIC para quatro sesquiterpenos utilizando três níveis de concentração.

Substância	Níveis de Concentração*	Intradias - DPR (%)			Interdias - DPR (%)
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	
α -copaeno	baixo (100)	0,14	0,19	0,09	0,18
	médio (300)	0,33	0,31	0,31	0,30
	alto (500)	0,51	0,14	0,21	0,67
β -elemeno	baixo (100)	0,17	0,58	0,48	5,39
	médio (300)	1,41	0,84	0,60	3,15
	alto (500)	1,26	0,86	0,24	2,38
β -cariofileno	baixo (100)	0,32	0,23	0,07	0,25
	médio (300)	0,27	0,20	0,25	0,23
	alto (500)	0,46	0,16	0,25	0,56
α -humuleno	baixo (100)	0,35	0,19	0,14	0,31
	médio (300)	0,86	0,27	0,71	0,82
	alto (500)	0,44	0,25	0,27	0,56

Onde: DPR é o desvio padrão relativo e * indica os níveis de concentração expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.2.9.5 Exatidão

A exatidão do método CG-DIC desenvolvido para cada um dos quatro sesquiterpenos foi determinada por meio do recurso da adição de padrão, seguido de verificação das respostas analíticas (Tabela 29).

Analisando os dados obtidos, foi possível observar que a exatidão para todas as substâncias, nos três níveis de concentração testados ($n = 3$), foi entre 90 e 110%, sendo tais dados satisfatórios para este parâmetro analítico.

Tabela 29. Exatidão do método CG-DIC para quatro sesquiterpenos utilizando três níveis de concentração.

Substância	Exatidão (%)		
	baixo*	médio*	alto*
α -copaeno	92,8 \pm 0,3	97,3 \pm 0,6	96,5 \pm 0,9
β -elemeno	95,4 \pm 0,5	102,0 \pm 5,7	98,5 \pm 2,5
β -cariofileno	92,8 \pm 0,5	96,9 \pm 0,7	97,4 \pm 1,0
α -humuleno	92,1 \pm 0,8	96,7 \pm 0,7	96,1 \pm 1,4

Onde: *indica os níveis de concentração adicionados a 2000,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de amostras de oleorresinas.

5.2.9.6 Robustez

A sensibilidade do método frente a pequenas variações deliberadas nos parâmetros operacionais do sistema CG-DIC: [A] temperatura do injetor ($^{\circ}\text{C}$), [B] Split, [C] temperatura inicial do forno ($^{\circ}\text{C}$), [D] temperatura final do forno ($^{\circ}\text{C}$), [E] temperatura do detector ($^{\circ}\text{C}$), [F] vazão da fase móvel (mL.min^{-1}), e [G] - Vazão de $\text{N}_{2(\text{g})}$ (mL.min^{-1}), foi determinada a partir de planejamento experimental do tipo por Plackett-Burman seguido de análise de variância.

Entre os os resultados avaliados no teste de robustez (Tabela 30), tanto a resposta analítica quanto o tempo de retenção sofreram variações significativas durante as pequenas variações realizadas deliberadamente no sistema cromatográfico.

As respostas analíticas (razão entre a área do analito pela área do padrão interno) não sofreram influência significativa para os analitos α -copaeno, β -cariofileno e α -humuleno durante o teste empregado. Contudo, o sesquiterpeno β -elemeno sofreu influencia significativa para todos os fatores avaliados, principalmente no menor nível de concentração.

O tempo de retenção foi a resposta que mais sofreu influência durante as pequenas variações executadas, especialmente para os fatores temperatura inicial do forno (C) e vazão de $\text{N}_{2(\text{g})}$ (G) propostos, que provocaram diminuição e aumento do tempo de retenção respectivamente.

Tabela 30. Resultados para o teste de robustez do método CG-DIC.

Concentração: 100 µg.mL ⁻¹	<i>α</i> -capoaeno				<i>β</i> -elemeno			
	Resposta		tr (min)		Resposta		tr (min)	
	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)
Descrição do fator								
A - Temperatura do injetor (°C)	0,0352	0,03	-0,0039*	-0,04	-1,2960*	-1,30	0,0011	0,01
B - Split (divisor de amostra)	-0,1525	-0,14	-0,0008	-0,01	-1,5344*	-1,54	-0,0001	0,00
C - Temperatura inicial do forno (°C)	-0,1259	-0,11	-1,6011*	-18,37	-1,5464*	-1,56	-1,6594*	-18,34
D - Temperatura final do forno (°C)	0,1779	0,16	-0,0023	-0,03	1,2583*	1,27	0,0016	0,02
E - Temperatura do detector (°C)	-0,0541	-0,05	0,0074*	0,09	1,0507*	1,06	0,0039	0,04
F - Vazão de fase móvel (mL.min ⁻¹)	-0,0105	-0,01	-0,0004	0,00	1,0507*	1,06	0,0039	0,04
G - Vazão de N _{2(g)} (mL.min ⁻¹)	0,0999	0,09	0,0187*	0,22	-0,7178*	-0,72	0,0189*	0,21

Concentração: 300 µg.mL ⁻¹	<i>α</i> -capoaeno				<i>β</i> -elemeno			
	Resposta		tr (min)		Resposta		tr (min)	
	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)
Descrição do fator								
A - Temperatura do injetor (°C)	-1,0481	-0,36	-0,0023	-0,03	-1,9446	-0,69	-0,0028	-0,03
B - Split (divisor de amostra)	-1,4628	-0,51	-0,0047	-0,05	-2,3216*	-0,82	0,0048*	0,05
C - Temperatura inicial do forno (°C)	0,3173	0,11	-1,6018*	-18,38	-1,9862*	-0,70	-1,6555*	-18,29
D - Temperatura final do forno (°C)	0,3910	0,14	0,0012	0,01	1,6799	0,60	-0,0013	-0,01
E - Temperatura do detector (°C)	-1,2490	-0,43	0,0037	0,04	1,0311	0,37	0,0020	0,02
F - Vazão de fase móvel (mL.min ⁻¹)	-0,6226	-0,22	0,0007	0,01	1,0311	0,37	0,0020*	0,02
G - Vazão de N _{2(g)} (mL.min ⁻¹)	1,2099	0,42	0,0175*	0,20	-0,7772	-0,28	0,0150*	0,17

Concentração: 500 µg.mL ⁻¹	<i>α</i> -capoaeno				<i>β</i> -elemeno			
	Resposta		tr (min)		Resposta		tr (min)	
	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)
Descrição do fator								
A - Temperatura do injetor (°C)	-1,4529	-0,30	-0,0013	-0,02	-5,1800*	-1,12	-0,0013	-0,01
B - Split (divisor de amostra)	-2,0853	-0,43	-0,0028	-0,03	-5,7378*	-1,24	0,0030	0,03
C - Temperatura inicial do forno (°C)	-4,2961	-0,88	-1,6003*	-18,36	-6,0965*	-1,32	-1,6565*	-18,31
D - Temperatura final do forno (°C)	0,1401	0,03	0,0003	0,00	1,7412	0,38	0,0008	0,01
E - Temperatura do detector (°C)	0,5621	0,12	0,0045	0,05	0,6318	0,14	0,0078	0,09
F - Vazão de fase móvel (mL.min ⁻¹)	-0,4684	-0,10	0,0003	0,00	3,1420	0,68	-0,0005	-0,01
G - Vazão de N _{2(g)} (mL.min ⁻¹)	1,3685	0,28	0,0188*	0,22	0,0921*	0,02	0,0198*	0,22

Onde: * indica valor dos efeitos que foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) empregando ANOVA.

Tabela 30. Resultados para o teste de robustez do método CG-DIC (Continuação).

Concentração: 100 µg.mL ⁻¹	<i>β</i> -cariofileno				<i>α</i> -humuleno			
	Resposta		tr (min)		Resposta		tr (min)	
	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)
Descrição do fator								
A - Temperatura do injetor (°C)	-0,0790	-0,07	-0,0043*	-0,04	-0,0374	-0,03	-0,0038*	-0,04
B - Split (divisor de amostra)	0,2967	0,27	0,0011	0,01	-0,2667	-0,24	-0,0010	-0,01
C - Temperatura inicial do forno (°C)	-0,2602	-0,24	-1,7438*	-17,59	-0,2335	-0,21	-1,8717*	-17,18
D - Temperatura final do forno (°C)	0,2356	0,21	-0,0028	-0,03	0,2468	0,22	-0,0027	-0,02
E - Temperatura do detector (°C)	-0,2829	-0,26	0,0079*	0,08	-0,3537	-0,32	0,0087*	0,08
F - Vazão de fase móvel (mL.min ⁻¹)	-0,1272	-0,12	-0,0003	0,00	-0,0565	-0,05	-0,0005	0,00
G - Vazão de N _{2(g)} (mL.min ⁻¹)	0,1110	0,10	0,0207*	0,21	0,1294	0,12	0,0228*	0,21

Concentração: 300 µg.mL ⁻¹	<i>β</i> -cariofileno				<i>α</i> -humuleno			
	Resposta		tr (min)		Resposta		tr (min)	
	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)
Descrição do fator								
A - Temperatura do injetor (°C)	-1,0145	-0,35	-0,0027	-0,03	-1,0998	-0,38	-0,0027	-0,02
B - Split (divisor de amostra)	1,4458	0,50	0,0047	0,05	-1,4744	-0,51	-0,0048	-0,04
C - Temperatura inicial do forno (°C)	-0,2115	-0,07	-1,7442*	-17,59	-0,3330	-0,12	-1,8720*	-17,18
D - Temperatura final do forno (°C)	0,3065	0,11	0,0007	0,01	0,2984	0,10	0,0012	0,01
E - Temperatura do detector (°C)	-1,2264	-0,43	0,0048	0,05	-1,1700	-0,41	0,0057*	0,05
F - Vazão de fase móvel (mL.min ⁻¹)	-0,5280	-0,18	0,0005	0,01	-0,4628	-0,16	0,0002	0,00
G - Vazão de N _{2(g)} (mL.min ⁻¹)	1,2991	0,45	0,0198*	0,20	1,3038	0,45	0,0215*	0,20

Concentração: 500 µg.mL ⁻¹	<i>β</i> -cariofileno				<i>α</i> -humuleno			
	Resposta		tr (min)		Resposta		tr (min)	
	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)	Ex	Ex (%)
Descrição do fator								
A - Temperatura do injetor (°C)	-1,9983	-0,41	-0,0018	-0,02	-2,1593	-0,44	-0,0015	-0,01
B - Split (divisor de amostra)	2,2964	0,47	0,0036	0,04	-2,7278	-0,56	-0,0042	-0,04
C - Temperatura inicial do forno (°C)	-5,3851	-1,10	-1,7429*	-17,57	-6,2872	-1,29	-1,8703*	-17,16
D - Temperatura final do forno (°C)	0,0867	0,02	0,0003	0,00	-0,1601	-0,03	0,0008	0,01
E - Temperatura do detector (°C)	0,1779	0,04	0,0046	0,05	0,3094	0,06	0,0050	0,05
F - Vazão de fase móvel (mL.min ⁻¹)	-0,1500	-0,03	0,0008	0,01	-0,2737	-0,06	0,0007	0,01
G - Vazão de N _{2(g)} (mL.min ⁻¹)	1,5970	0,33	0,0206*	0,21	1,6695	0,34	0,0227*	0,21

Onde: * indica valor dos efeitos que foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) empregando ANOVA.

Diante dos dados obtidos para o teste de robustez, fica claro que os parâmetros operacionais do sistema CG-DIC para análise dos quatro sesquiterpenos supracitados devem ser rigorosamente controlados, visto que pequenas variações nos fatores investigados podem provocar variações significativas, tanto para a resposta analítica do composto β -elemeno quanto para o tempo de retenção de todos os sesquiterpenos estudados.

5.2.9.7 Aplicação do método (análise das amostras)

Um total de 15 amostras oleorresinas foram analisadas utilizando o método CG-DIC validado quanto ao teor de α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno e α -humuleno, sendo 09 amostras autênticas (*C. langsdorffii* Desf., *C. duckei* Dwyer, *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. paupera* (Herzog) Dwyer, *C. pubiflora* Benth, *C. oblongifolia* Mart, *C. trapezifolia* Hayne, e *Copaifera* sp.) e seis amostras comerciais de oleorresinas.

Na Tabela 31 são apresentados os resultados de quantificação dos quatro sesquiterpenos em oleorresinas brutas de copaíferas.

Tabela 31. Quantificação de quatro sesquiterpenos em amostras de oleorresina utilizando do método CG-DIC.

Oleorresina	Concentração do sesquiterpeno [média ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) \pm desvio padrão]			
	α -copaeno	β -elemeno	β -cariofileno	α -humuleno
ORCld	0,00 ^a	0,00 ^a	101,08 \pm 9,12 ^d	*
ORCd	0,00 ^a	0,00 ^a	64,75 \pm 0,07 ^c	0,00 ^a
ORCr	0,00 ^a	0,00 ^a	44,04 \pm 2,62 ^b	*
ORCm	139,06 \pm 4,26 ^f	0,00 ^a	514,91 \pm 6,02 ⁱ	96,01 \pm 1,98 ^f
ORCpp	178,68 \pm 1,15 ^g	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
ORCpb	0,00 ^a	84,77 \pm 1,15 ^b	175,98 \pm 2,77 ^e	27,63 \pm 0,64 ^b
ORCo	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	*
ORCt	62,93 \pm 1,48 ^e	0,00 ^a	104,24 \pm 9,28 ^d	*
ORCsp	0,00 ^a	0,00 ^a	46,44 \pm 5,50 ^b	0,00 ^a
C-I	53,40 \pm 4,74 ^d	0,00 ^a	271,33 \pm 0,70 ^g	66,70 \pm 6,70 ^e
C-II	39,49 \pm 2,69 ^c	0,00 ^a	331,64 \pm 4,31 ^h	64,63 \pm 3,09 ^e
C-III	28,11 \pm 0,47 ^b	0,00 ^a	585,93 \pm 0,79 ^j	99,40 \pm 3,17 ^f
C-IV	35,89 \pm 2,39 ^c	0,00 ^a	204,87 \pm 2,20 ^f	38,48 \pm 2,83 ^c
C-V	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	*
C-VI	52,88 \pm 2,22 ^d	0,00 ^a	266,16 \pm 1,72 ^g	53,91 \pm 2,16 ^d

Onde: ORCld - *C. langsdorffii*, ORCd - *C. duckei*, ORCr - *C. reticulata*, ORCm - *C. multijuga*, ORCpp - *C. paupera*, ORCpb - *C. pubiflora*, ORCo - *C. oblongifolia*, ORCt - *C. trapezifolia*, ORCsp - *Copaifera* sp. (Belém-PA), C: amostras comerciais de I a VI. Em cada coluna letras minúsculas (a, b, c...) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras de oleorresinas investigadas (ANOVA e pós-teste de Tukey) e *indica substância não detectada.

Foi observado que o β -cariofileno foi o sesquiterpeno quantificado no maior número de amostras, exceto nas ORC_{pp}, ORC_o e amostra comercial C-V. Destaca-se também o elevado teor deste sesquiterpeno nas amostras ORC_m e amostras comerciais C-II e C-III. Todos esses resultados estão em concordância com dados da literatura, uma vez que o referido sesquiterpeno é descrito como o composto volátil mais frequentemente presente e oleorresinas de *Copaifera*. Esse sesquiterpeno apresenta como efeitos biológicos já comprovados: atividades anti-inflamatórias, anticâncer, antimicrobiana, antioxidantes e analgésicas (FIDYT et al., 2016), tornando assim as espécies com elevado teor desse composto como promissoras para uso alternativo aos tratamentos convencionais.

As substâncias α -copaeno e α -humuleno foram quantificadas em boa parte das amostras investigadas, com destaque para a amostra ORC_m com considerável teor para esses dois compostos. As amostras ORC_{ld}, ORC_d, ORC_r, ORC_o e C-V não tiveram o teor dos referidos compostos determinados ou não estão presentes nessas amostras, sendo os dados representados por um asterisco (*). Os dados de quantificação dessas amostras permitem sugerir que as mesmas podem apresentar atividade antioxidante e anti-inflamatória, uma vez que os dois sesquiterpenos apresentam os referidos efeitos biológicos, respectivamente de acordo com as publicações de Legault e Pichette (2007) e Turkez et al. (2014).

O sesquiterpeno β -elemeno foi quantificado na amostra de ORC_{pb}, não sendo quantificado nas demais amostras. Esse resultado pode ser justificado pelo representativo teor desta substância apontado pela análise por MEFS-CG-DIC. Muito embora a amostra ORC_o também tenha apresentado o maior teor para o mesmo sesquiterpeno na análise por microextração em fase sólida, a resposta analítica encontrada não atingiu os níveis de quantificação adotados no presente método. É importante salientar que a amostra de oleorresina de *C. oblongifolia* apresentou baixa quantidade de óleo volátil, apresentando assim aparência de resina dura, característica esta que pode explicar a não quantificação dos sesquiterpenos investigados e a diferença entre as duas análises propostas.

Igualmente a amostra de ORC_o, a quantidade dos quatro sesquiterpenos não foi possível de ser estimada na amostra comercial V. Todavia, as características sensoriais como fluidez e odor não permitem justificar a falta de eferição do α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno e α -humuleno, sendo nesta amostra predominante em sua fração volátil o α -bergamoteno.

Assim, de modo geral, os dados encontrados utilizando método CG-DIC estão de acordo com os resultados encontrados na análise qualitativa empregando o sistema MEFS-CG-EM apresentados na seção 5.2.6.

O método empregado utilizando cromatografia em fase gasosa acoplada a detetor de ionização de chama aqui proposto demonstrou-se adequado para quantificação simples e direta de α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno e α -humuleno em amostras autênticas e comerciais de oleorresina de copaíferas. Vale ressaltar que o método proposto por Sousa et al. (2011) apresentou maior sensibilidade para as mesmas substâncias investigadas (α -copaeno, β -cariofileno e α -humuleno) em óleo volátil de oleorresina de *C. langsdorffii*; porém, os mesmos autores não quantificaram tais substâncias diretamente na oleorresina e nem investigaram diferentes espécies do gênero.

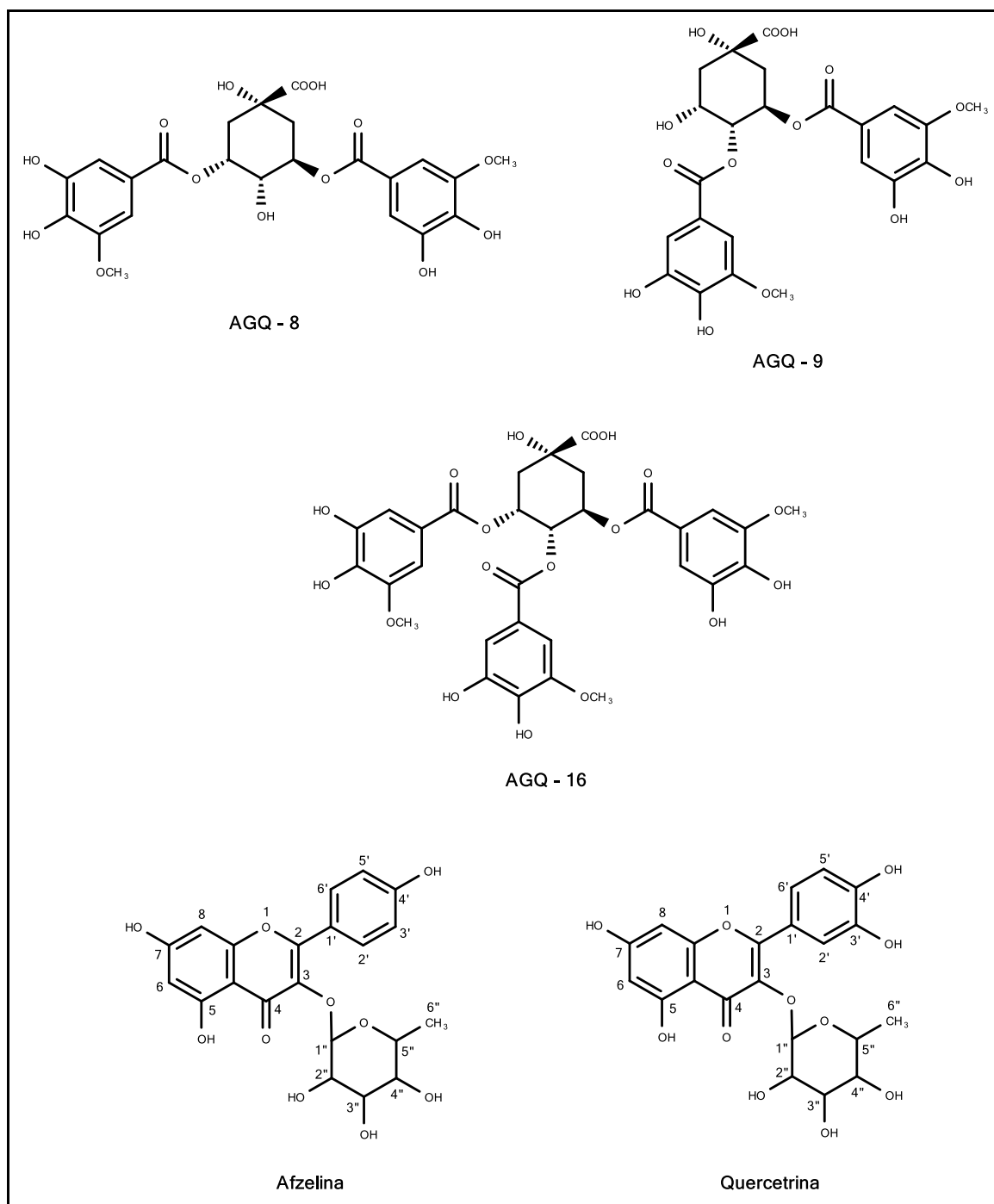
5.3 ESTUDO DAS FOLHAS

Nove extratos de folhas de diferentes espécies (*C. langsdorffii*, *C. duckei*, *C. reticulata*, *C. multijuga*, *C. paupera*, *C. pubiflora*, *C. lucens*, *C. oblongifolia* e *C. trapezifolia*) foram analisadas qualitativamente por CLUE-EM, conforme descrito na seção 4.3.2, sendo selecionado o modo negativo para análise das amostras.

Em termos gerais, os extratos analisados tiveram identificados ácidos galoilquínicos e flavonoides (Figura 19).

A partir dos resultados obtidos da análise dos extratos das folhas e da análise de soluções contendo compostos isolados de folhas de copaíferas (Figuras 20 a 22) foi possível sugerir a presença das seguintes substâncias: ácido 5'-*O*-metil-3-*O*-galoilquínico (AGQ-1), ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico (AGQ-2), ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico (AGQ-3), ácido 3,4-di-*O*-galoilquínico (AGQ-4), ácido 5''-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-5), ácido 5'-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-6), ácido 5'-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico (AGQ-7), ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-8), ácido 5',5''-di-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-9), ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-10), ácido 4,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-11), ácido 5'-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-12), ácido 5''-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-13), ácido 3,4,5-tri-*O*-galoilquínico (AGQ-14), ácido 5''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico (AGQ-15), ácido 5',5'',5'''-tri-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico (AGQ-16), afzelina e quercitrina. A presença dessas substâncias foi descrita por Motta (2014), Nogueira, Furtado e Bastos (2015) e Motta et al. (2017), os quais investigaram a composição química, a sazonalidade e a atividade gastroprotetora de extratos de folhas de *Copaifera langsdorffii* coletadas na região sudeste do Brasil.

Figura 19. Estrutura química de alguns ácidos galoilquínicos e flavonoides encontrados nos extratos de folhas de espécies de *Copaifera*.



As áreas totais dos cromatogramas para cada substância sugerida são apresentadas nas Figuras 20 a 22, onde são relacionadas as respectivas áreas de cada composto em relação a cada amostra de extrato de folhas. Os ácidos AGQ-8, AGQ-9 e AGQ-16, afzelina e quercitrina apresentaram as maiores respostas (área) para as nove amostras investigadas. Por outro lado, os ácidos AGQ-7 e AGQ-13 mostraram resposta discreta em todas as amostras.

O ácido 3,4,5-tri-*O*-galoilquínico (AGQ-14) apresentou-se com destaque na amostra de *C. duckei* em comparação com todas as amostras e substâncias analisadas. Investigações anteriores (MOTTA et al., 2017) indicam que este ácido redziu lesões gástricas e a proliferação de células de adenocarcinoma gástrico, demonstrando assim o potencial uso do extrato de folhas de *C. duckei* como fonte de substâncias de proteção gástrica.

Os extratos de folhas das espécies *C. langsdorffi*, *C. reticulata*, *C. paupera* e *C. oblongifolia* apresentaram as maiores respostas para afzelina e quercitrina. Lemos et al. (2015) verificaram que os mesmos flavonoides e extratos hidroalcoólicos de folhas de *C. langsdorffi* exibiram atividade gastroprotetora em modelo de indução de úlcera gástrica por etanol/HCl. Além disso, outro estudo apontou (BRANCALION et al., 2012) a diminuição significativa do número e da dureza de cálculos renais (oxalato de cálcio) em ratos, indicando o potencial uso do extrato folhas das outras duas espécies para o mesmo fim.

É importante salientar que a ausência ou a baixa resposta encontrada para qualquer analito nas amostras investigadas não necessariamente indicam a ausência de qualquer substância, uma vez que foram adotados parâmetros operacionais do sistema CLUE-EM Thermo e de tratamento de dados (área do pico $> 10^7$) que privilegiaram a investigação das substâncias majoritárias, para as quais havia padrões analíticos isolados de *Copaifera* e disponibilizados pela equipe do Projeto Temático.

Figura 20. Resultados da análise qualitativa dos extratos das folhas para os ácidos galoiquinicos 1 a 6.

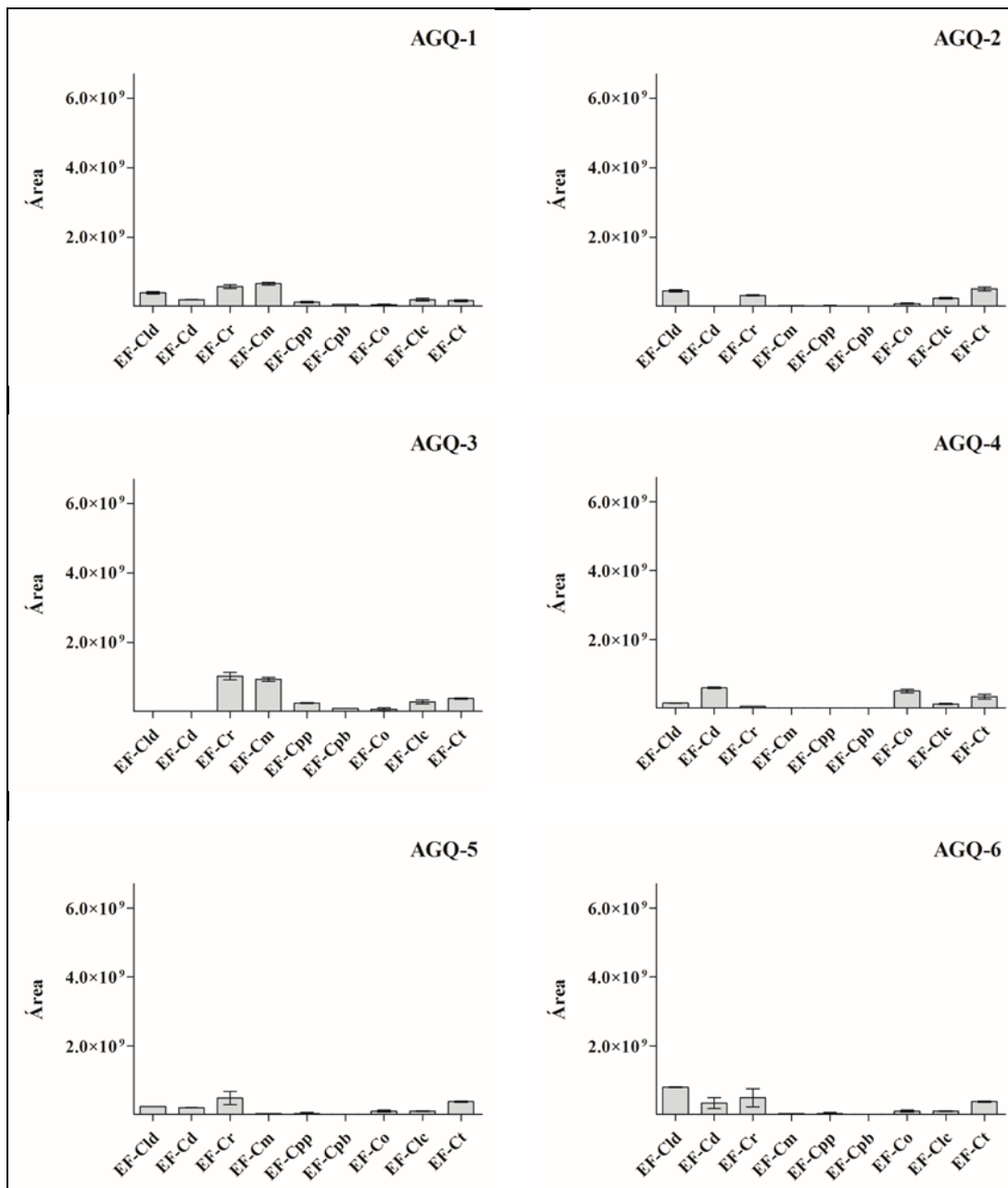


Figura 21. Resultados da análise qualitativa dos extratos das folhas para os ácidos galoiquinicos 7 a 12.

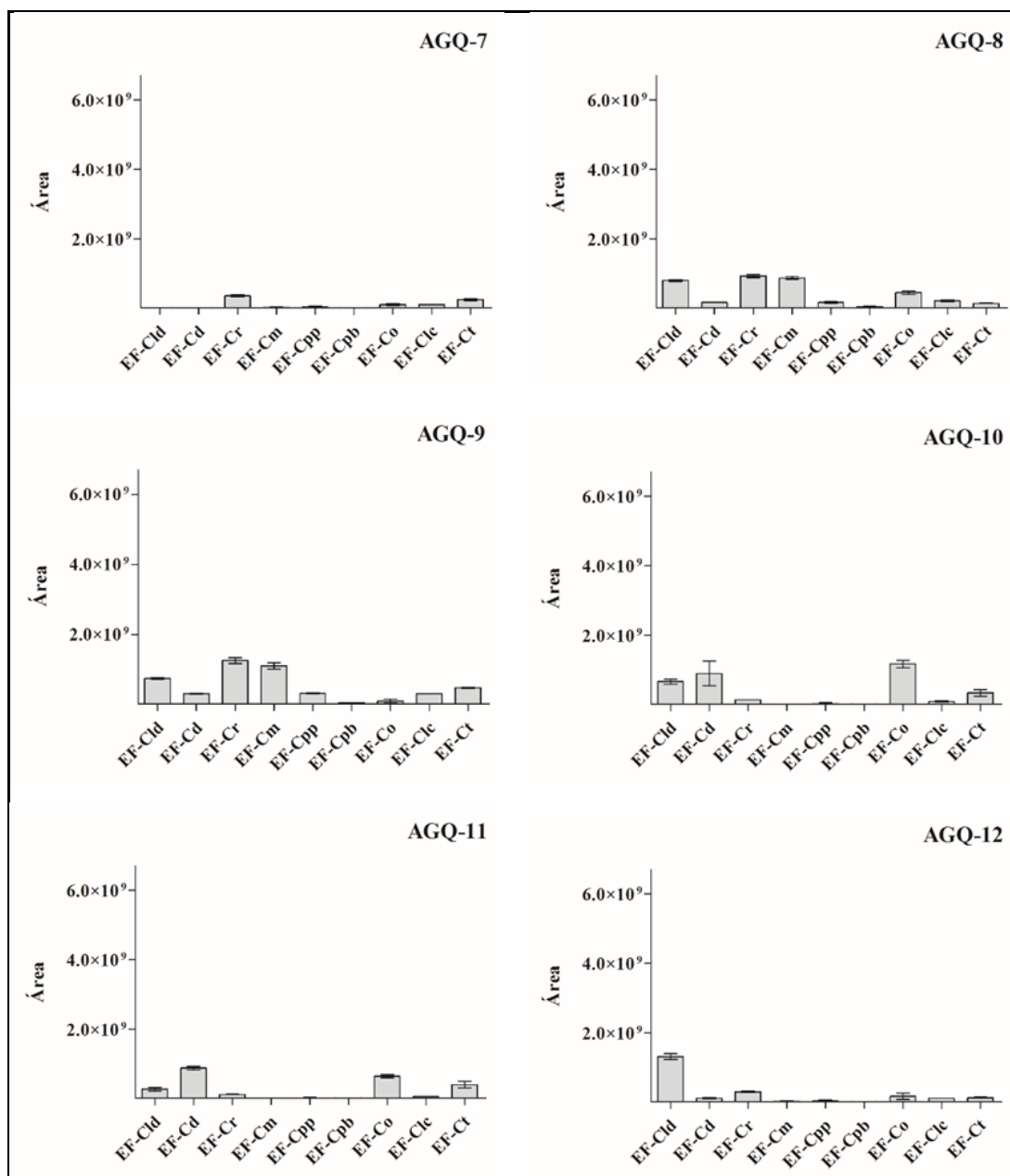
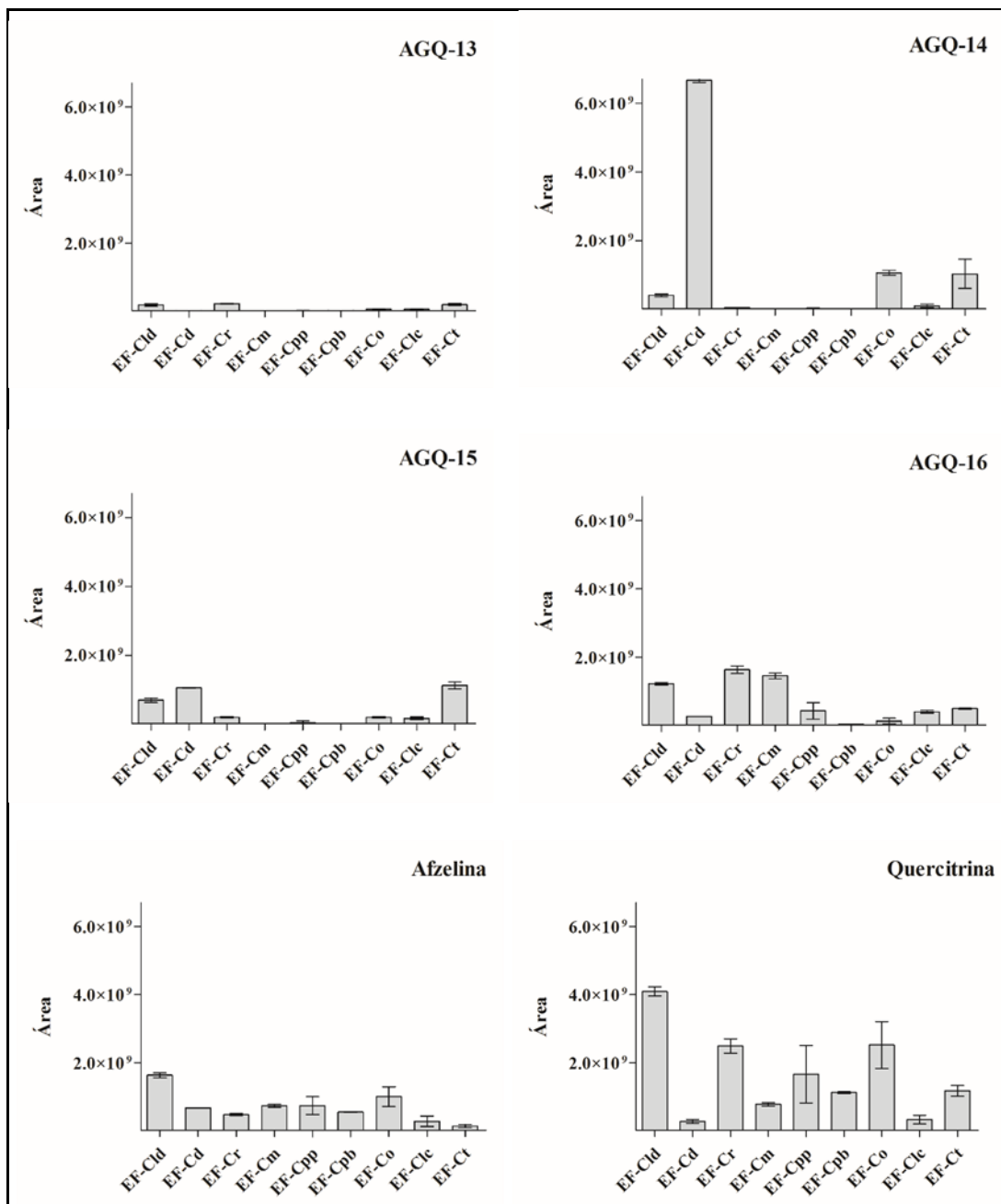


Figura 22. Resultados da análise qualitativa dos extratos das folhas para os ácidos galoilquínicos 13 a 16, afzelina e quercitrina.



Conclusões

6 CONCLUSÕES

O presente estudo de investigação da composição química de folhas e oleorresinas do gênero *Copaifera* gerou resultados que possibilitaram as seguintes conclusões:

1. O rendimento de coleta da oleorresina de diferentes espécies de *Copaifera* foi consideravelmente variável entre as espécies distribuídas no território brasileiro, sendo as espécies presentes na região norte do Brasil as mais promissoras em relação à produção do referido exsudato;

2. As oleorresinas de *Copaifera* possuem teores variáveis das frações volátil (óleo volátil) e fixa (resina), das quais, as amostras de oleorresina de *C. multijuga* e *C. langsdorffii* foram as que apresentaram os maiores teores relativos de óleo volátil;

3. A combinação das técnicas de cromatografia em fase líquida empregando coluna de vidro clássica e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector UV/Vis, permitiu o fracionamento e isolamento de três constituintes principais da oleorresina de *C. duckei*, sendo técnicas apropriadas para o isolamento de componentes químicos desse produto vegetal;

4. Os dados experimentais de ressonância magnética nuclear unidimensional (^1H e ^{13}C) e bidimensionais (HSQC e HMBC), em comparação com dados da literatura permitiram a identificação dos diterpenos: ácido *ent*-poliáltico, ácido *ent*-diidroagático e o ácido *enti*-agático-15-metil éster;

5. O emprego e otimização da técnica de micro extração em fase sólida utilizando fibra de sílica fundida com revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS), seguido de análise usando cromatografia em fase gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-EM), possibilitou a análise qualitativa simples, direta, rápida e reprodutiva para a determinação dos componentes voláteis de oleorresinas de *Copaifera*, sendo, portanto uma excelente alternativa aos procedimentos clássicos de análises das substâncias voláteis desse produto natural;

6. Por meio da análise de MEFS-CG-EM foi possível constatar que os componentes voláteis das oleorresinas são predominantemente da classe dos sesquiterpenos, com destaque para o α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno e α -bergamoteno, dados estes que estão de acordo com a literatura científica;

7. O método CLUE-EM/EM desenvolvido e otimizado para análise de nove diterpenos ácidos em oleorresinas de *Copaifera* apresentou parâmetros adequados de validação como especificidade, linearidade, precisão, precisão e limites de detecção e quantificação na escala de nanograma por mililitro. Todavia, fatores como temperatura e modificadores de fase

móvel devem ser controlados rigorosamente para a manutenção da precisão analítica. Além disso, 10 amostras de oleorresinas autênticas e seis amostras comerciais foram analisadas; sendo observadas diferenças qualitativas e quantitativas entre todas as amostras investigadas, nas quais os ácidos *ent*-caurenóico, *ent*-poliáltico e *ent*-copálico foram as substâncias que mais influenciaram nessa diferença, demonstrando que o método CLUE-EM/EM proposto é uma ferramenta analítica adequada para auxiliar na determinação da composição química das amostras de oleorresina de *Copaifera*;

8. Uma outra ferramenta analítica, o método CG-DIC foi desenvolvido e otimizado para quantificação direta de α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno e α -humuleno em amostras de oleorresinas de *copaíferas* apresentou parâmetros adequados de validação. Contudo, os valores nas figuras de mérito LOD e LOQ foram superiores ao descrito pela literatura. Assim, como no método CLUE-EM/EM, as condições analíticas propostas para o sistema CG-DIC devem ser igualmente controladas para a manutenção da confiabilidade dos resultados gerados. Quinze amostras de oleorresinas foram analisadas, utilizando o método CG-DIC, sendo possível observar: [1] o sesquiterpeno β -cariofileno é a substância frequentemente detectada e quantificada, mas [2] apresentaram diferenças quantitativas;

9. Os dados da análise qualitativa empregando CLUE-EM/EM para análise de extrato das folhas indicou a presença de ácidos galoilquínicos e flavonoides em todas as espécies investigadas, dados estes que concordam com a literatura. Entre as substâncias presentes destacam-se o ácido di-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-8), ácido 5',5''-di-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-9), ácido 5',5'',5'''-tri-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico (AGQ-16), afzelina e quercitrina;

10. Então, o objetivo do desenvolvimento e validação dos métodos CLUE-EM/EM e CG-DIC para a análise de nove diterpenos ácidos e quatro sesquiterpenos em oleorresinas de *copaíferas* foi fornecer uma ferramenta analítica para a identificação, separação e quantificação dos principais componentes químicos presentes em amostras de oleorresina do gênero *Copaifera* para auxiliar na verificação da qualidade deste produto; permitindo que a comunidade científica, empresas privadas e agências reguladoras utilizem os dados apresentados no auxílio da investigação e regularização desse importante produto natural oriundo da biodiversidade brasileira.

Portanto, a investigação da composição química tanto do extrato das folhas quanto das oleorresinas do gênero *Copaifera* faz-se necessária, uma vez que a variação nos constituintes é comumente reportada, sendo esses produtos objeto de investigação quanto as suas propriedades biológicas, tornando assim importante o desenvolvimento de técnicas analíticas que auxiliem na determinação direta e confiável da composição química dos produtos desse importante gênero de plantas da flora brasileira (Apêndice 41).

Referências

7 REFERÊNCIAS

ABRÃO, F.; COSTA, L. D. A.; ALVES, J. M.; SENEDESE, J. M.; CASTRO, P. T.; AMBRÓSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C.; MARTINS, C. H. G. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its solated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 15, n. 443, p. 1-10, 2015.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. New York-NY: Allured Publishing Corporation, 2007.

BALDISSERA, M. D.; OLIVEIRA, C. B.; TONIN, A. A.; WOLKMER, P.; LOPES, S. T. A.; FIGHERA, R.; FLORES, M. M.; OLIVEIRA, E. C. P.; SANTOS, R. C. P.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; MONTEIRO, S. G.; DA SILVA, A. S. Toxic effect of essential oils (*Copaifera spp.*) in the treatment of mice experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Biomedicine & Preventive Nutrition**. v. 4, n. 1, p. 319 – 324, 2014.

BARBOSA, K. S.; YOSHIDA, M.; SCULDELLER, V. V. Detection of adulterated copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil-resins by refractive index and thin layer chromatography. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 19, n. 1, p. 57-60, 2009.

BARBOSA, P. C. S.; MEDEIROS, R.; SAMPAIO, P. T. B.; VIEIRA, G.; WIEDEMANN, L. S. M.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): soil composition, seasonality and diameter at breast height. **Journal of Brazilian Chemistry Society**. v. 23, n. 10, p. 1823-1833, 2012.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 679 – 688, 2009.

BASTARD, J.; DUC, D. K.; FETIZON, M.; FRANCIS, M. J.; GRANT, P. K.; WEAVERS, R. T.; KANEKO, BARDDLEY, G. V.; BERNASSAU, J. M.; BURFITT, I. V.; WOVKULIC, P.

M.; WENKERT, E. CMR spectroscopy of labdanic diterpenes and related substances. **Journal Natural Products**. v. 47, n. 4, p. 592-599, 1984.

BORGES, C. H. G.; CRUZ, M. G.; CARNEIRO, L. J.; SILVA, J. J. M.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C.; OLIVEIRA, P. F.; RODRIGUES, V.; VENEZIANI, R. C. S.; PARREIRA, R. L. T.; CARAMORI, G. F.; NAGURNIAK, G. R.; MAGALHÃES, L. G.; AMBRÓSIO, S. R. *Copaifera duckei* Oleoresin and Its Main Nonvolatile Terpenes: *In Vitro* Schistosomicidal Properties. **Chemistry & Biodiversity**. v. 13, n. 10, p. 1348-1356, 2016.

BRANCALION, A. P. S.; OLIVEIRA, R. B.; SOUSA, J. P. B.; GROppo, M.; BERRETTA, A. A.; BARROS, M. E.; BOIM, M. A.; BASTOS, J. K. Effect of hydroalcoholic extract from *Copaifera langsdorffii* leaves on urolithiasis induced in rats. **Urological Research**. v. 40, n. 5, p. 475-481, 2012.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. (RE nº 899, de 29 de maio de 2003). Brasília-DF, 2003.

BREITMAIER, E. Terpenes: importance, general structure, and biosynthesis. In: **Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones**. Weinheim: WileyVCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 1-9, 2006.

CARRERAS, C. R.; ROSSOMANO, P. C.; GIORDANO, O. S. *Ent*-labdanes in *Eupatorium buniifolium*. **Phytochemistry**. v. 48, n. 6, p. 915-1086, 1998.

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

CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; CUNHA, K. M. A.; RAO, V. S. N.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.;

HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**. v. 44, n. 3, p. 388-392, 2006.

CHAMBERS, M. C.; MACLEAN, B.; BURKE, R.; AMODEI, D.; RUDERMAN, D. L.; NEUMANN, S.; GATTO, L.; FISCHER, B.; PRATT, B.; EGERTSON, J.; HOFF, K.; KESSNER, D.; TASMAN, N.; SHULMAN, N.; FREWEN, B.; BAKER, T. A.; BRUSNIAK, M. Y.; PAULSE, C.; CREAMY, D.; FLASHNER, L.; KANI, K.; MOULDING, C.; SEYMOUR, S. L.; NUWAYSIR, L. M.; LEFEBVRE, B.; KUHLMANN, F.; ROARK, J.; RAINER, P.; DETLEV, S.; HEMENWAY, T.; HUHMER, A.; LANGRIDGE, J.; CONNOLLY, B.; CHADICK, T.; HOLLY, K.; ECKELS, J.; DEUTSCH, E. W.; MORITZ, R. L.; KATZ, J. E.; AGUS, D. B.; MACCOSS, M.; TABB, D. L.; MALLICK, P. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. **Nature Biotechnology**. v. 30, n. 10, p. 918–920, 2012.

CHAUHAN, A.; MITTU, B.; CHAUHAN, P. Analytical method development and validation: a concise review. **Analytical & Bioanalytical**. v. 6, n. 1, p. 1-5, 2015.

CHEN, F.; AL-AHMAD, H.; JOYCE, B.; ZHAO, N.; KÖLLNER, T. G.; DEGENHARDT, J.; STEWART, C. N. Within-plant distribution and emission of sesquiterpenes from *Copaifera officinalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 47, n. 11-12, p. 1017-1023, 2009.

CHENG, A. X.; LOU, Y. G.; MAO, Y. B.; LU, S.; WANG, L. J.; CHEN X. Y. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. **Journal of integrative plant biology**. v. 42, n. 2, p. 179-186, 2007.

CLEMENT, R. E. **Gas chromatography: biochemical, biomedical and clinical application**. New York: John Wiley and Sons Inc., 1990.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas-SP: Editora da UNICAMP, 2006

D'AGOSTINO, M. F.; SANZ, J.; SANZ, M. L.; GIUFFRÈ, A. M.; SICARI, V.; SORIA, A. C. Optimization of a solid-phase microextraction method for the gas chromatography–mass spectrometry analysis of blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott) fruit volatiles. **Food Chemistry**. v. 178, n. 1, p. 10-17, 2015.

DEIWCK, P. M. The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids. In: DEIWCK, P. M. (Org.). **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3ª Ed. New York, NY: John Wiley & Sons. p. 187-310. 2009.

DIAS, D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; SOUZA, T. P.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**. v. 721, p. 79-84, 2012.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S. CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**. v. 112, n. 1, p. 4-24, 2016.

EURL – Europe Union Reference Laboratories. SANTE/11945/2015 - **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. 2015.

FDA - Food and Drug Administration (EUA). **Reviewer guidance – Validation of chromatographic methods**. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 1994.

FDA - Food and Drug Administration (EUA). **Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry**. Pharmaceutical Quality/CMC de julho 2015. 2015.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**. v. 597, n. 2, p. 179-186, 2015.

FIDYT, K.; FIEDOROWICZ, A.; STRZADAŁA, L.; SZUMNY, A. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**. v. 5, n. 10, p. 3007-3017, 2016.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 21 de outubro de 2016.

GALÚCIO, C. S.; BENITES, C. I.; RODRIGUES, R. A. F.; MACIEL, M. R. W. Recuperação de sesquiterpenos do óleo-resina de copaíba a partir da destilação molecular. **Química Nova**. v. 39, n. 7, p. 795-800, 2016.

GARCIA-ESTEBAN, M.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I.; RUIZ, J. Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). **Talanta**. v. 64, n. 2, p. 458-466, 2004.

GARCIA, P. L.; BUFFONI, E.; GOMES, F. P.; QUERO, J. L. V. Analytical Method Validation. In: AKYAR, I. (Ed) *Wide Spectra of Quality Control*. Rijeka-Croácia: In Tech, p. 3-20, 2011.

GARDNER, D. R.; PANTER, K. E.; STEGELMEIER, B. L. Implication of agathic acid from Utah juniper bark as an abortifacient compound in cattle. **Journal Applied Toxicology**. v. 30, n. 2, p. 115-119, 2010.

GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; MAGNI, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; MAFFEI, F. R. GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 440, n. 2, p. 170-178, 2013.

GONÇALVES, E. S.; SILVA, J. R.; GOMES, C. L.; NERY, M. B. L.; NAVARRO, D. M. A. F. SANTOS, G. K. N.; SILVA-NETO, J. C.; COSTA-SILVA, J. H.; ARAÚJO, A. V.; WANDERLEY, A. G. Effects of the oral treatment with *Copaifera multijuga* oil on reproductive performance of male Wistar rats. **Brazilian Journal Pharmacognosy**. v. 24, n. 3, p. 355-362, 2014.

GONZÁLEZ-BURGOS, E.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. **Current Medicinal Chemistry**. V. 19, n. 31, 5319-5343, 2012.

HERRERO-JAUREGUI, C.; CASADO, M. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. Chemical variability of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin. **Chemistry & Biodiversity**. v. 8, n. 1, p. 674-685, 2011.

HEYDEN, Y. V.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B. G.; MASSART, D.L. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 24, n. 1, p. 723-753, 2001.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Banco de dados agregados – Produção da extração vegetal e silvicultura – Tabela 289 - Quantidade produzida e valor da produção na extração vegetal, por tipo de produto extrativo - Ano 1990 a 2015**. Disponível

em:<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo9.asp?e=c&p=VS&z=t&o=18>>. Acesso em: 01 de dezembro de 2016.

ICH - International Conference of harmonization. **Harmonized tripartite guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. International Conference of harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2005.

KANDI, S.; GODISHALA, V.; RAO, P.; RAMANA, K. V. Biomedical significance of terpenes: an insight. **Biomedicine and Biotechnology**. v. 3, n. 1, p. 8-10, 2015.

KESSNER, D.; CHAMBERS, M.; BURKE, R.; AGUS, D.; MALLICK, P. ProteoWizard: Open source software for rapid proteomics tools development. **Bioinformatics**, v. 24, n. 21, p. 2534–2536, 2008.

KLAUBERG, C.; VIDAL, E.; RODRIGUEZ, L. C. E.; DIAZ-BALTEIRO, L. Determining the optimal harvest cycle for copaiba (*Copaifera spp.*) oleoresin production. **Agricultural Systems**. v. 131, n. 1, p. 116-122, 2014.

KRUVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M. L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**. v. 870, n. 1, p 1-28, 2015a.

KRUVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M. L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**. v. 870, n. 1, p 1-28, 2015b.

LAHLAU, M. The success of natural products in drug discovery. **Pharmacology & Pharmacy**. v. 4, n. 3, p. 17-31, 2013.

- LAMEIRA, O. A.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; ZOGHBI, M. G. B.; OLIVEIRA, E. C. P. Seasonal variation in the volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer growing wild in State of Pará – Brasil. **Journal of Essential Oil Research**. v. 21, n. 1, p. 105-108, 2009.
- LEANDRO, L. M.; SOUSA-VARGAS, F.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K. O.; SILVA, J. A.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera spp.*) oleoresins. **Molecules**. v. 17, n. 4, p. 3866-3889, 2012.
- LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 59, n. 12, p. 1643-1647, 2007.
- LEMOS, M.; SANTIN, J. R.; MIZUNO, C. S.; BOEING, T.; SOUSA, J. P. B.; NANAYAKKARA, D.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. *Copaifera langsdorffii*: evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 25, p. 238-245, 2015.
- LIMA, M. E.; FORTES-DIAS, C. L.; CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Toxinology in Brazil: A big challenge for a rich biodiversity. **Toxicon**. v. 56, n. 1. p. 1085-1091, 2010.
- LVDP – La Via del Profumo [homepage da internet]. *Copaifera officinalis*. Disponível em: <<http://www.profumo.it/Legno-di-Copahu/3349>>. Acesso em: 30 de junho de 2017.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, n. 3. p. 429-438, 2002.

MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F.; LIMA, H. C. O gênero *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinioideae) na Amazônia Brasileira. **Rodriguesia**, v. 59, n. 3, p. 455-476, 2008.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C. T.; CASCON, VV.; KAPLAN, M. A. C. In vivo evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. **Genetics and Molecular Biology**. v. 28, n. 4, p. 833-838, 2005.

MIRANDA, M. M.; PANIS, C.; SILVA, S. S.; MACRI, J. A.; KAWAKAMI, N. Y.; HAYASHIDA, T. H.; MADEIRA, T. B.; ACQUARO JR. V. R.; NIXDORF, S. L.; PIZZATTI, L.; AMBRÓSIO, S. R.; CECCHINI, R.; ARAKAWA, N. S.; VERRI, JR.; W. A.; COSTA, I. V.; PAVANELLI, W. R. Kaurenoic Acid possesses leishmanicidal activity by triggering a NLRP12/IL-1 β /cNOS/NO pathway. **Mediators of Inflammation**. v. 2015, n. 2015, p. 1-10, 2015.

MOTTA, E. V. S. **Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV-DAD para quantificação e análise sazonal de derivados galoilquínicos nas folhas de *Copaifera langsdorffii***. São Paulo. 2014. 232p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Rieirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MOTTA, E. V. S.; LEMOS, M.; COSTA, J. C.; BANDERÓ-FILHO, V. C.; SASSE, A.; SHERIDAN, H.; BASTOS, J. K. Galloylquinic acid derivatives from *Copaifera langsdorffii* leaves display gastroprotective activity. **Chemico-Biological Interactions**. v. 261, n. 1, p. 145-155, 2017.

NASCIMENTO, M. E.; ZOGHBI, M. G. B.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. B. Chemical variability of the volatiles of *Copaifera langsdorffii* growing wild in the Southeastern part of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 43, n. 1, p. 1-6, 2012.

NAZ, S.; VALLEJO, M.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. **Journal of chromatography A**. v. 1353, n. 1, p. 99 – 105, 2014.

NETO, J. S. L.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. D. Constituintes químicos dos frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Química Nova**. v. 31, n. 5, p. 1078-1080, 2008.

NOGUEIRA, M. S.; FURTADO, R. A.; BASTOS, J. K. Flavonoids and Methoxy-galloylquinic Acid Derivatives from the Leaf Extract of *Copaifera langsdorffii* Desf. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 63, n. 31, p. 6939-6945, 2015.

OHSAKI, A.; LU, T. Y.; ITO, S.; EDATSUGI, H.; IWATA, D.; KMODA, Y. The isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desf. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 4, n. 24, p. 2889-2892, 1994.

OLIVEIRA, L. G. S.; RIBEIRO, D. A.; SARAIVA, M. E.; MACÊDO, D. G.; MACEDO, J. G. F.; PINHEIRO, P. G.; COSTA, J. G. M.; SOUZA, M. M. A.; MENEZES, I. R. A. Chemical variability of essential oils of *Copaifera langsdorffii* Desf. in different phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. **Industrial Crops and Products**. v. 97, n.1, p. 455-464, 2017.

PADUCH, R.; KANDEFER–SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**. v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**. v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PATHURI, R.; MUTHUKUMARAN, M.; KRISHNAMOORTHY, B.; NISHAT, A. A review on analytical method development and validation of pharmaceutical technology. **Current Pharma Research**. v. 3, n. 2, p. 855-870, 2013.

PATIL, R.; DESHMUKH, T.; PATIL, V.; KHANDELWAL, K. Review on analytical method development and validation. **Research and Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis**. v. 3, n. 3, p. 1-10, 2014.

PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; CAMPOS, A. R.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleoresin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sciences**. v. 75, n. 16, p. 1979-1987, 2004.

PERIS-VICENTE, J.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Chapter 13 - Validation of analytical methods based on chromatographic techniques: An overview. In: ANDERSON, J. L.; BERTHOD, A.; PINO, V.; STALCUP, A. M., editores. **Analytical Separation Science**. 5th Vo. Weinheim: Wiley-VCH; 2015. p. 1757-1808.

PLOWDEN, C. Production ecology of copaiba (*Copaifera sp.*) oleoresin in the eastern Brazilian Amazon. **Economic Botany**. v. 57, n. 4, p. 491-501, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiocologia**. São Paulo-SP: Premier editorial. p. 91-122, 1997.

RUIZ-ANGEL, M. J.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUEA, M. C.; BERTHOD, A.; CARDA-BROCH, S. Are analysts doing method validation in liquid chromatography? **Journal of Chromatography A**. v. 1353, n. 1, p. 2-9, 2014.

SACHETTI, C. G.; FASCINELI, M. L.; SAMPAIO, J. A.; LAMEIRA, O. A.; CALDAS, L. D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 19, n. 4, p. 937-941, 2009.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonenses*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 120, n. 2, p. 204-208, 2008.

SEEL, C. S. **A fragrant introduction to terpenoid chemistry**. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2003. 410p.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES-JUNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**. v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

SILVA, E. S.; MATHIAS, C. S.; LIMA, M. C. F.; VEIGA JUNIOR, V. F.; RODRIGUES, D. P.; CLEMENT, C. R. Análise físico-química do oleorresina e variabilidade genética de copaíba na Floresta Nacional do Tapajós. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. v. 47, n. 11, p. 1621-1628, 2012.

SINGH, R. Medicinal plants: A review. **Journal of Plant Science**. v. 3, n. 1, p. 50-55, 2015.

SKOOG, D. A, WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 9ª edição. São Paulo-SP; Thompson; 2014.

SOARES, D. C.; PORTELLA, N. A.; RAMOS, M. F. S.; SIANI, A. C.; SARAIVA, E. M. *Trans-β-Caryophyllene*: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial

Copaiba Oil (*Copaifera spp.*). **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**. v. 2013, n. 1, p. 1-13, 2013.

SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIN, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**. v. 44, n. 4, 2008.

SOUSA, J. P.B.; BRANCALION, A. P. S.; SOUZA, A. B.; TURATTI, I. C. C.; AMBRÓSIO, S. R.; FURTADO, N. A. J. C.; LOPES, N. P.; BASTOS, J. K. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 54, n. 4, p. 653-659, 2011.

SOUZA, P. A.; RANGEL, L. P.; OIGMAN, S. S.; ELIAS, M. M.; FERREIRA-PEREIRA, A.; De LUCAS, N. C.; LEITÃO, G. G. Isolation of two bioactive diterpenic acids from *Copaifera glycyarpa* oleoresin by high-speed counter-current chromatography. **Phytochemical Analysis**. v. 21, n. 6, p. 539-543, 2010.

SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Revisões e, processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais**. Ouro Preto-MG: UFOP, 2011.

SOUZA, A. B.; MOREIRA, M. R.; BORGES, C. H.; SIMO, M. R.; BASTOS, J. K.; SOUSA, J. P.; AMBROSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. Development and validation of a rapid RP-HPLC method for analysis of (-)-copalic acid in copaba oleoresin. **Biomedical Chromatography**. v. 27, n. 3, p. 280-283, 2013.

SOUZA DE OLIVEIRA, L. G.; RIBEIRO, D. A.; SARAIVA, M. E, MACÊDO, D. G.; MACEDO, J. G. F.; PINHEIRO, P. G.; COSTA, J. G. M.; SOUZA, M. M. A. MENEZES, I. R. A. Chemical variability of essential oils of *Copaifera langsdorffii* Desf. In different

phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. **Industrial Crops and Products**. v. 97, n. 1, p. 455-464, 2017.

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, n. 2, p. 236-240, 2004.

TENG, J.; ZHANG, R.; ZHANG, Y. W.; DUAN, H. Q.; TAKAISHI, T. A new labdanic norditerpene from *Pinus sylvestris*. **Natural Product Research**. v. 24, n. 17, p. 1587-1592, 2010.

THOLL, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. v. 148, n. 1, p. 63-106, 2015.

TRINDADE, F. T. T.; STABELI, R. G.; PEREIRA, A. A.; FACUNDO, V. A.; SILVA, A. A. *Copaifera multijuga* ethanolic extracts, oil-resin, and its derivatives display larvicidal activity against *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 23, n. 2, p. 464-470, 2013.

TURKEZ, H.; TOGAR, B.; TATAR, A.; GEYIKOGLU, F.; HACIMUFTUOGLU, A. Cytotoxic and cytogenetic effects of α -copaene on rat neuron and N2a neuroblastoma cell lines. **Biologia**. v. 69, n. 7, p. 936-942, 2014.

VAN DEN BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H. C. J.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; VAN DER WERF, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**. v. 7, n. 142, p. 1-15, 2006.

VARGAS, F. S.; ALMEIDA, P. D. O.; ARANHA, E. S. P.; BOLETI, A. P. A.; NEWTON, P.; VASCONCELLOS, M. C.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; LIMA, E. S. biological activities and

cytotoxicity of diterpenes from *copaifera* spp. Oleoresins. **Molecules**. v. 20, n. 4, p. 6194-6210, 2015.

VEIGA-JUNIOR, V. F., PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**. v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES, M.G.M.O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 248 - 254, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, p. 467-471, 2008.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: WHO, 2013.

XEI, T.; SONG, S.; LI, S.; OUYANG, S.; XIA, L.; HUANG, J. Review of natural product databases. **Cell Proliferation**. v. 48, n. 4, p. 398-404, 2015.

XIN, Z. LU, Y.; XING, X.; LONG, J.; LI, J.; XUE, X. Synthesis of (-)-agathic acid and (-)-copalic acid from andrographolide via a regioselective Barton-McCombie reaction. **Tetrahedron**. v. 72, n. 4, p. 555-562, 2016.

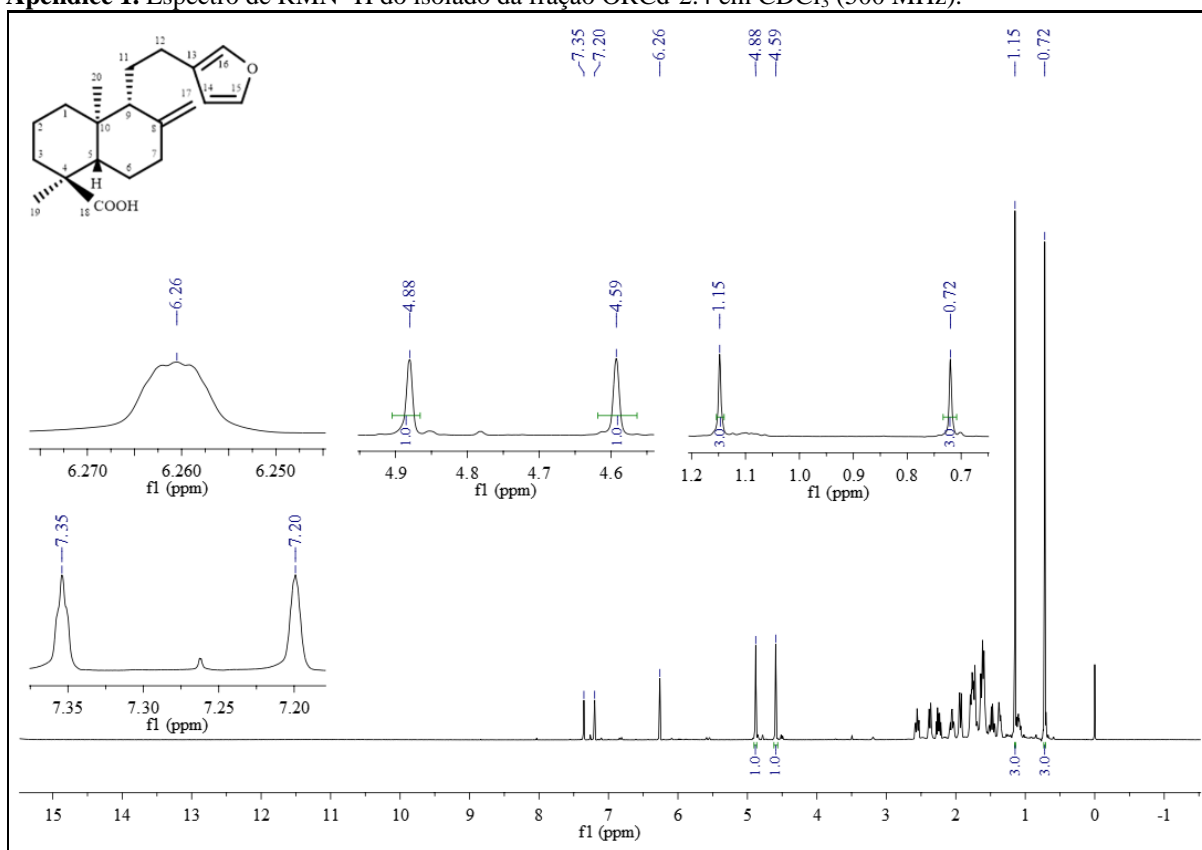
ZIMMERMAM-FRANCO, D. C.; BOLUTARI, E. B.; POLONINI, H. C.; CARMO, A. M. R.; CHAVES, M. G. A. M.; RAPOSO, N. R. B. Antifungal Activity of *Copaifera langsdorffii* Desf oleoresin against dermatophytes. **Molecules**. v. 18, n. 10, p. 12561-12570, 2013.

ZOGHBI, M. G. B.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; TRIGO, J. C. Volatiles of oleoresins of *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer, *C. piresii* Dwyer and *C. pubiflora* Benth. (Leguminosae). **Journal of Essential Oil Research**. v. 21, n. 5, p. 403-404, 2009.

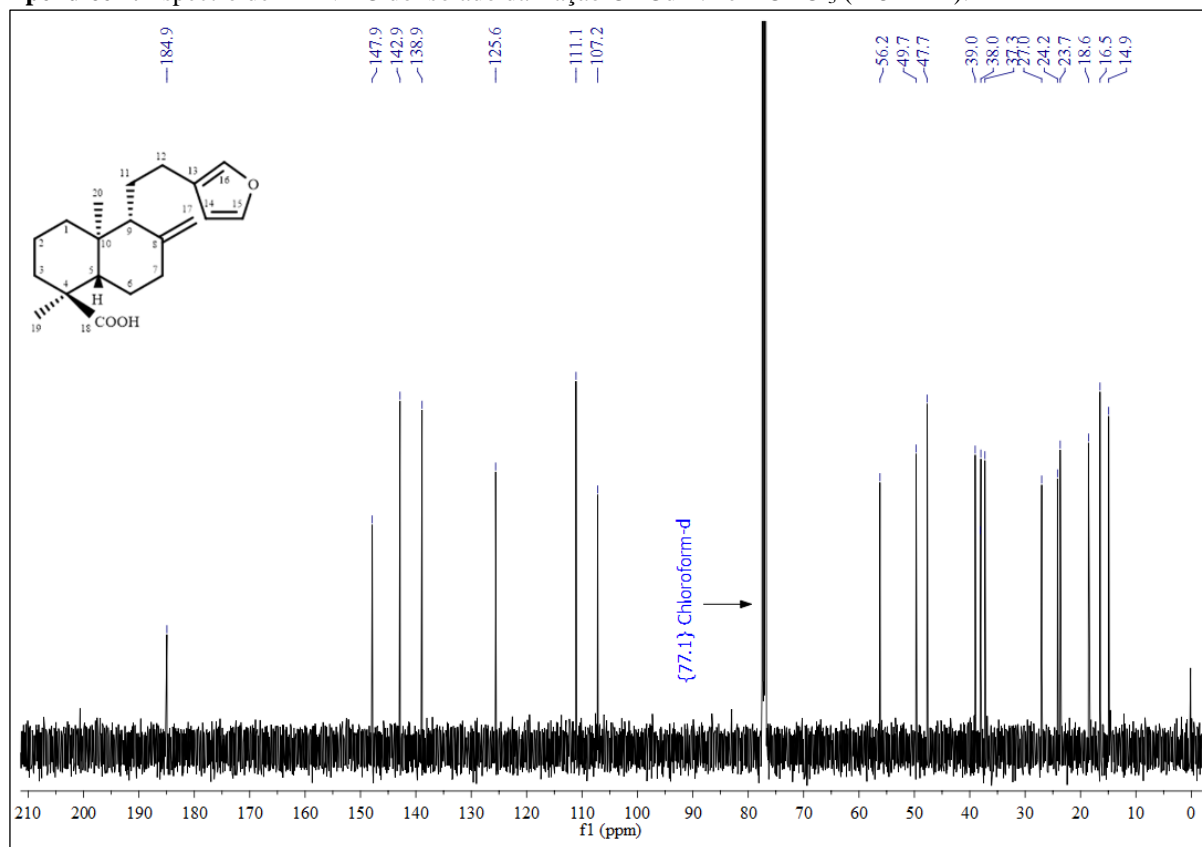
Apêndices

8 APÊNDICES

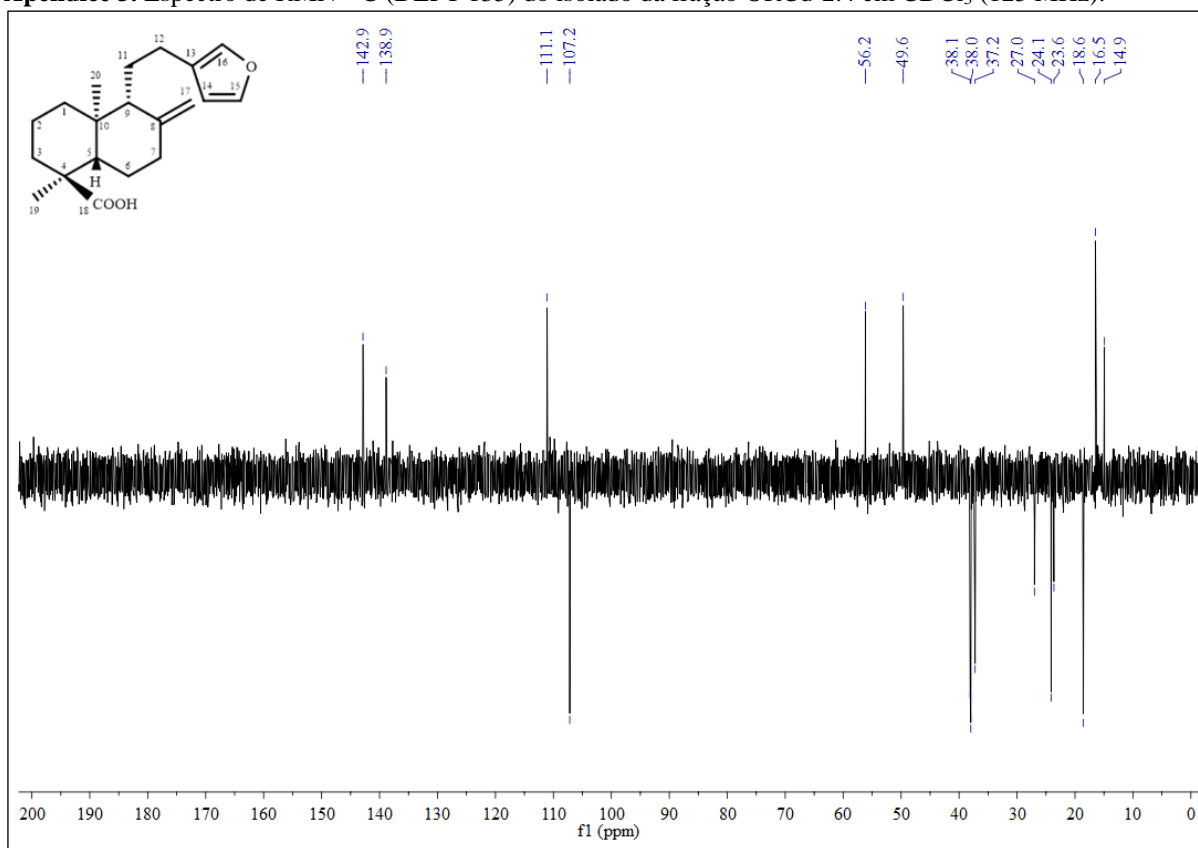
Apêndice 1. Espectro de RMN ^1H do isolado da fração ORCd-2.4 em CDCl_3 (500 MHz).



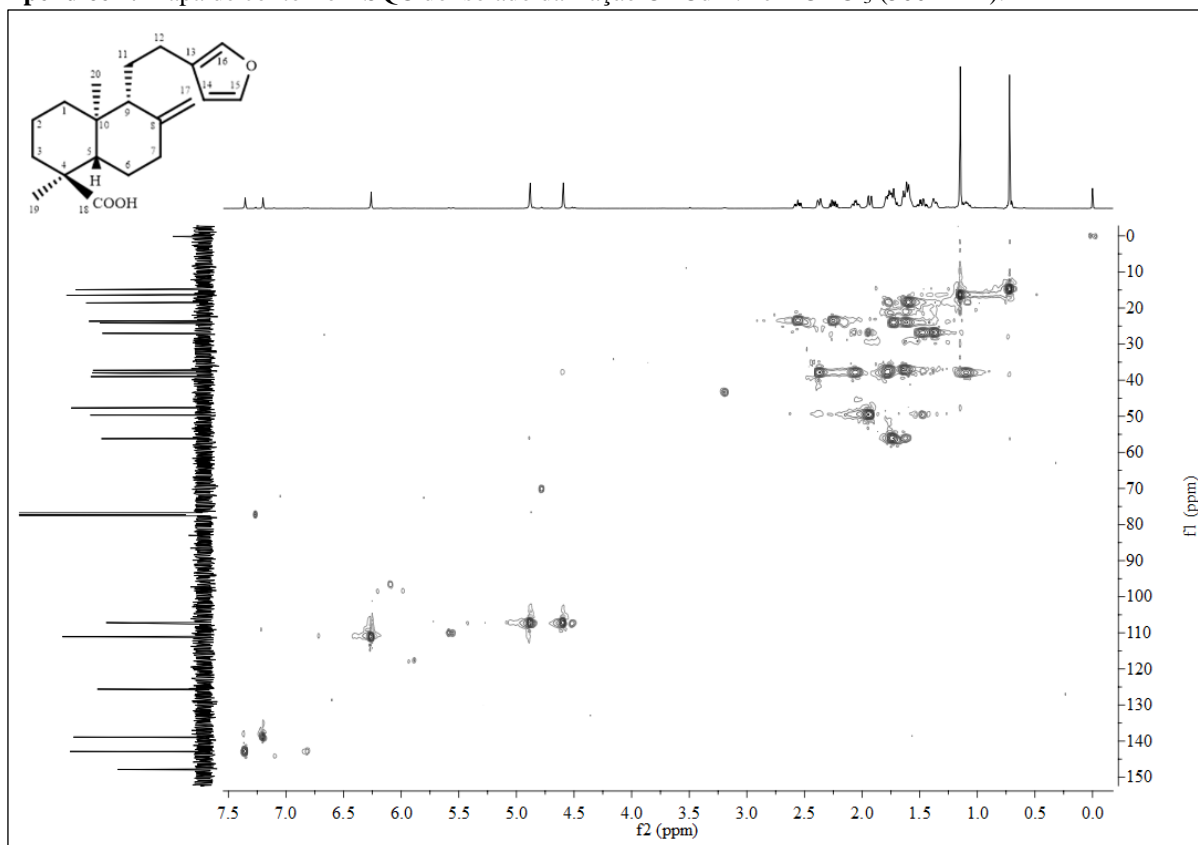
Apêndice 2. Espectro de RMN ^{13}C do isolado da fração ORCd-2.4 em CDCl_3 (125 MHz).



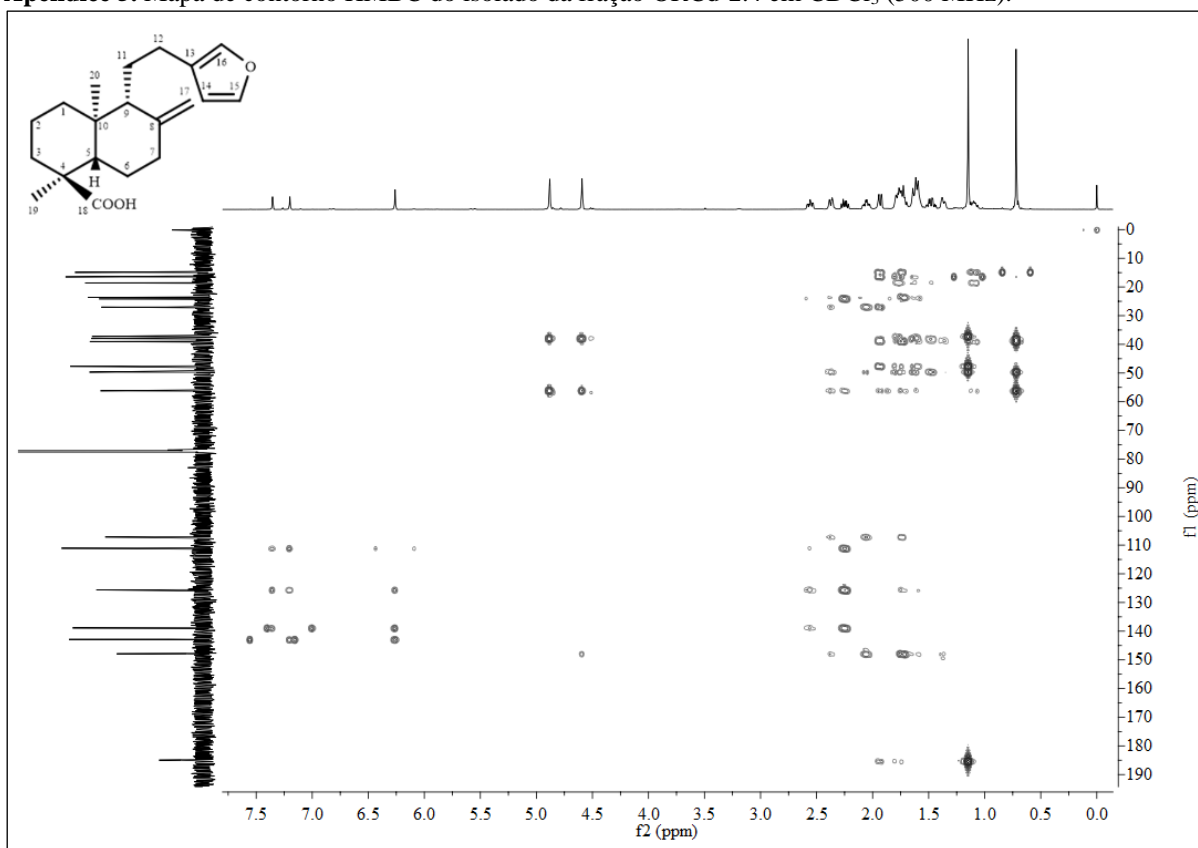
Apêndice 3. Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135) do isolado da fração ORCd-2.4 em CDCl_3 (125 MHz).



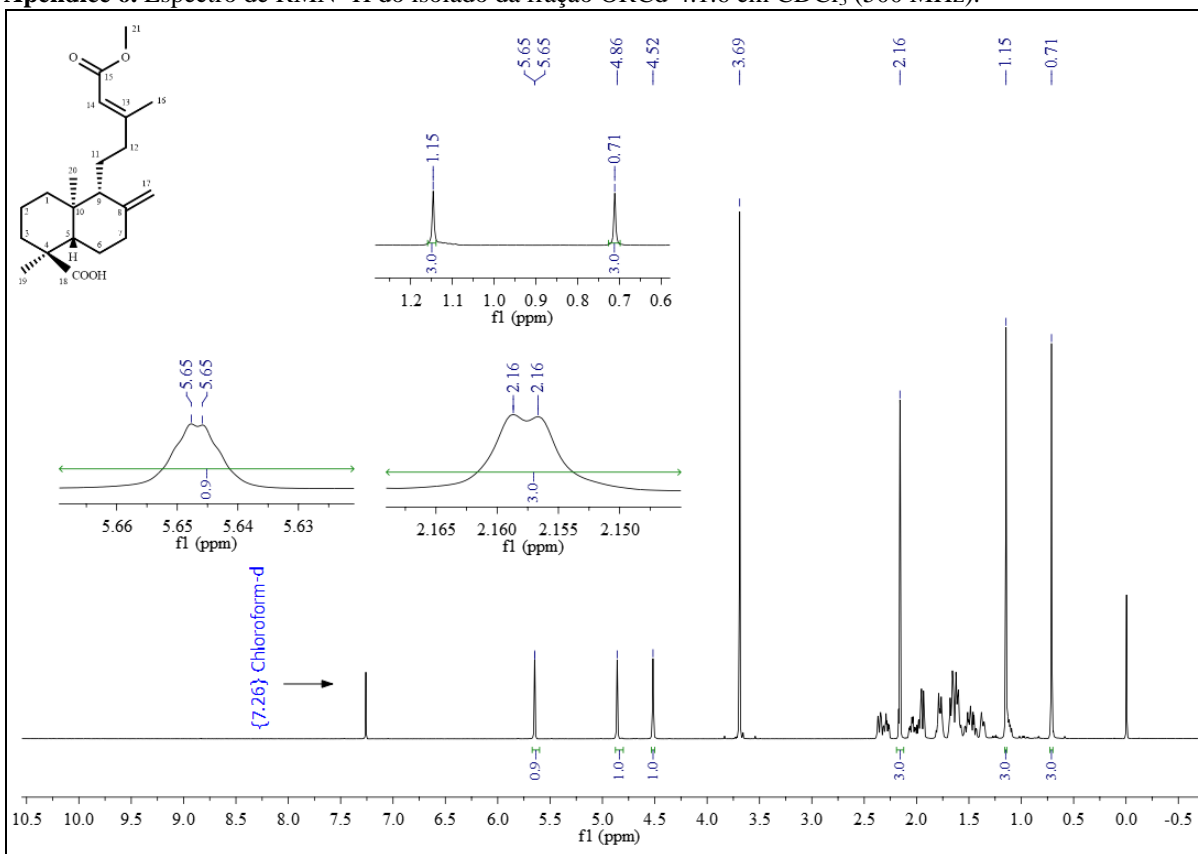
Apêndice 4. Mapa de contorno HSQC do isolado da fração ORCd-2.4 em CDCl_3 (500 MHz).



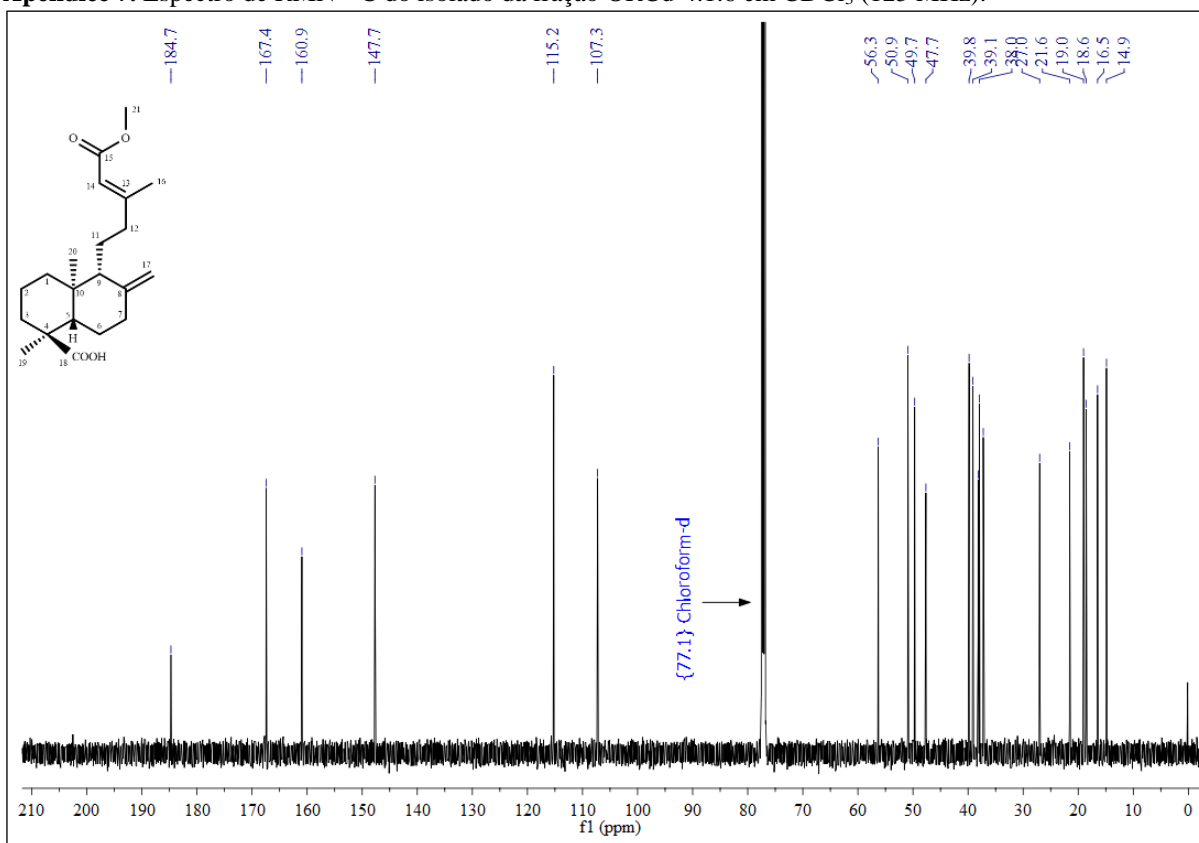
Apêndice 5. Mapa de contorno HMBC do isolado da fração ORCd-2.4 em CDCl₃ (500 MHz).



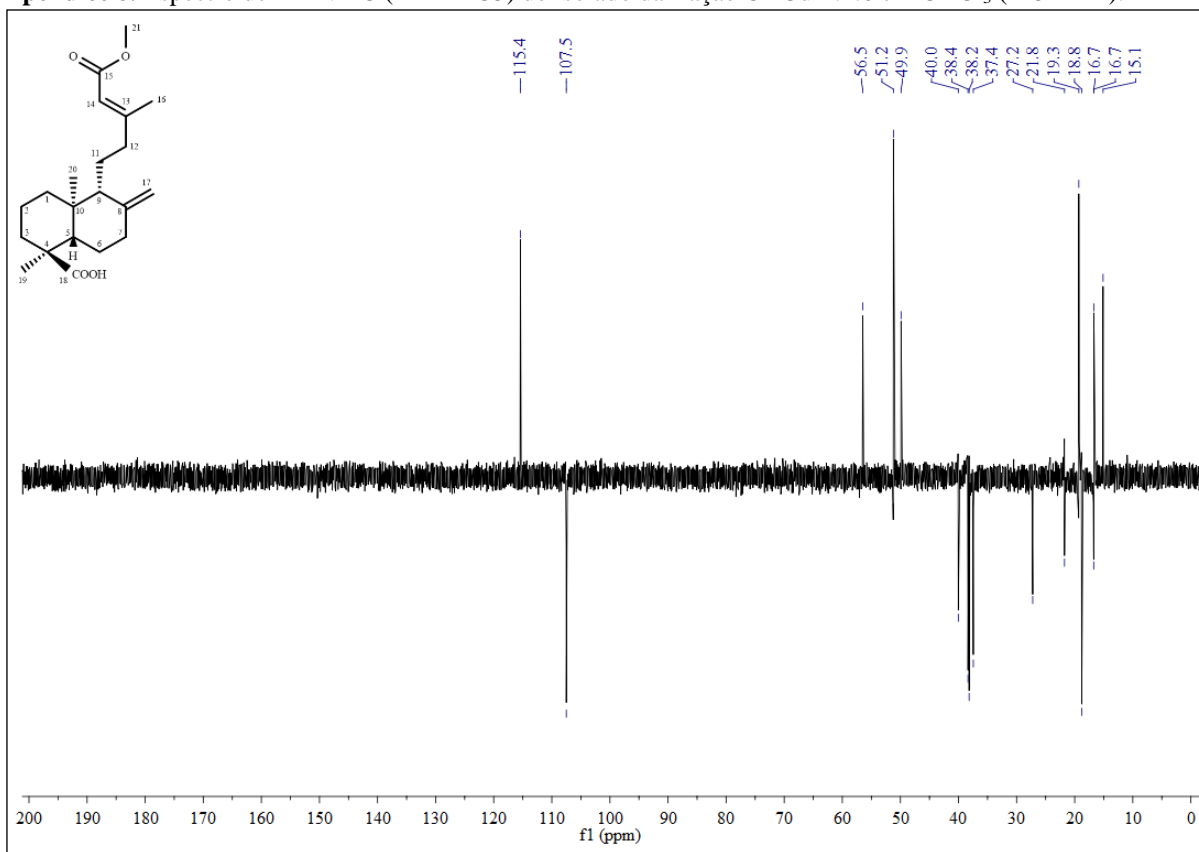
Apêndice 6. Espectro de RMN ¹H do isolado da fração ORCd-4.1.6 em CDCl₃ (500 MHz).



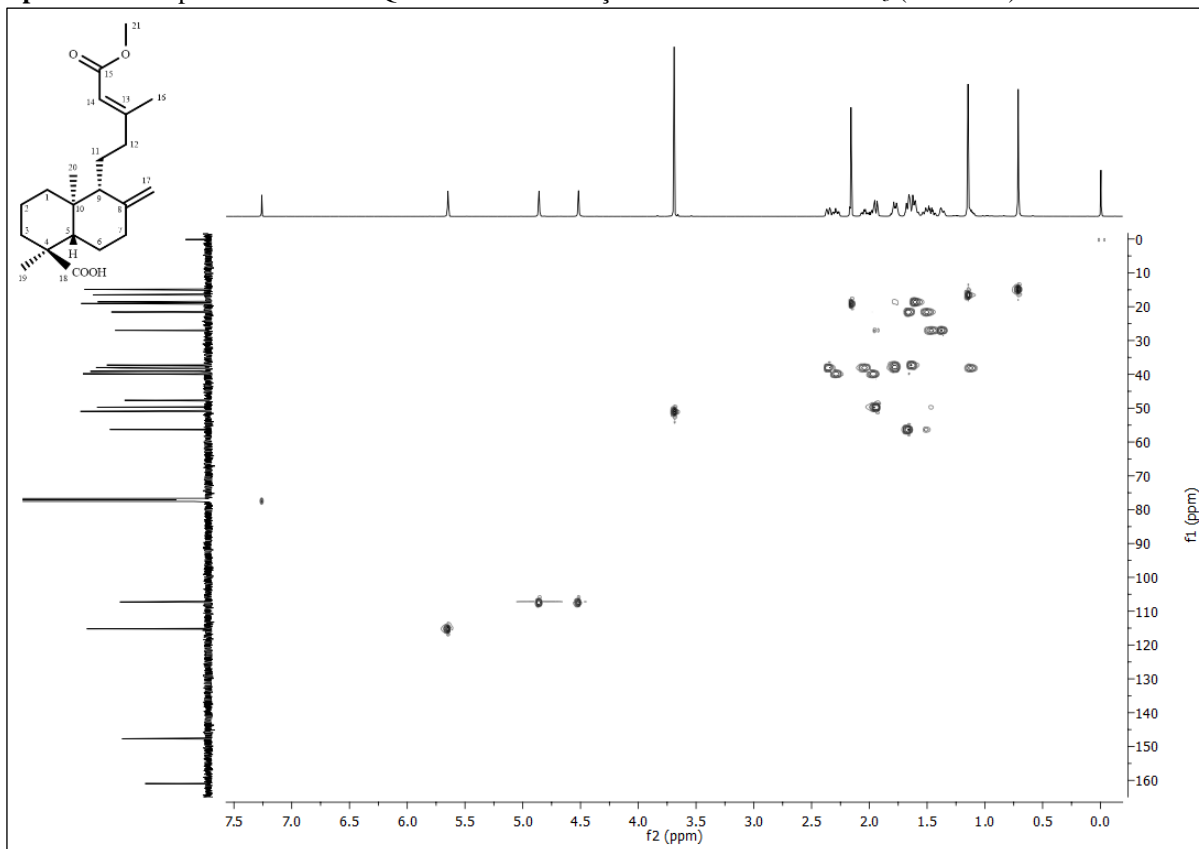
Apêndice 7. Espectro de RMN ^{13}C do isolado da fração ORCd-4.1.6 em CDCl_3 (125 MHz).



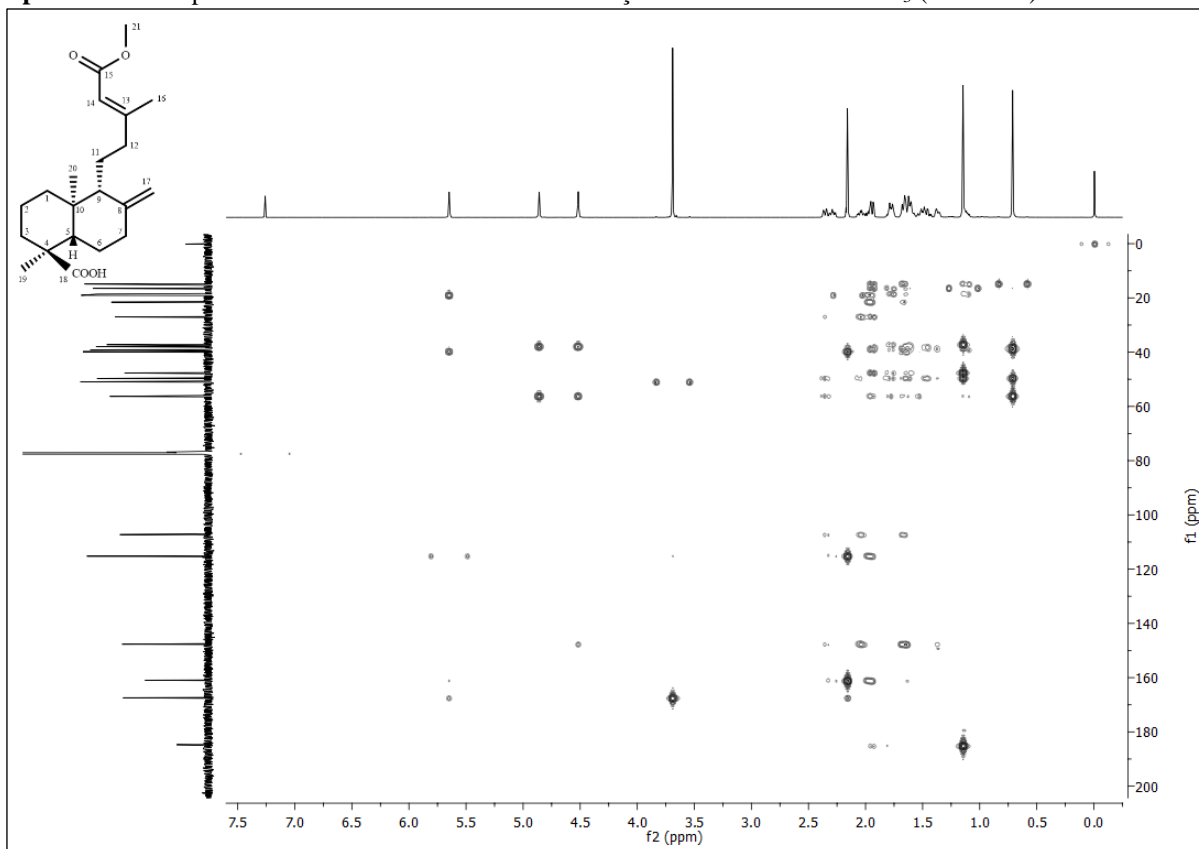
Apêndice 8. Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135) do isolado da fração ORCd-4.1.6 em CDCl_3 (125 MHz).



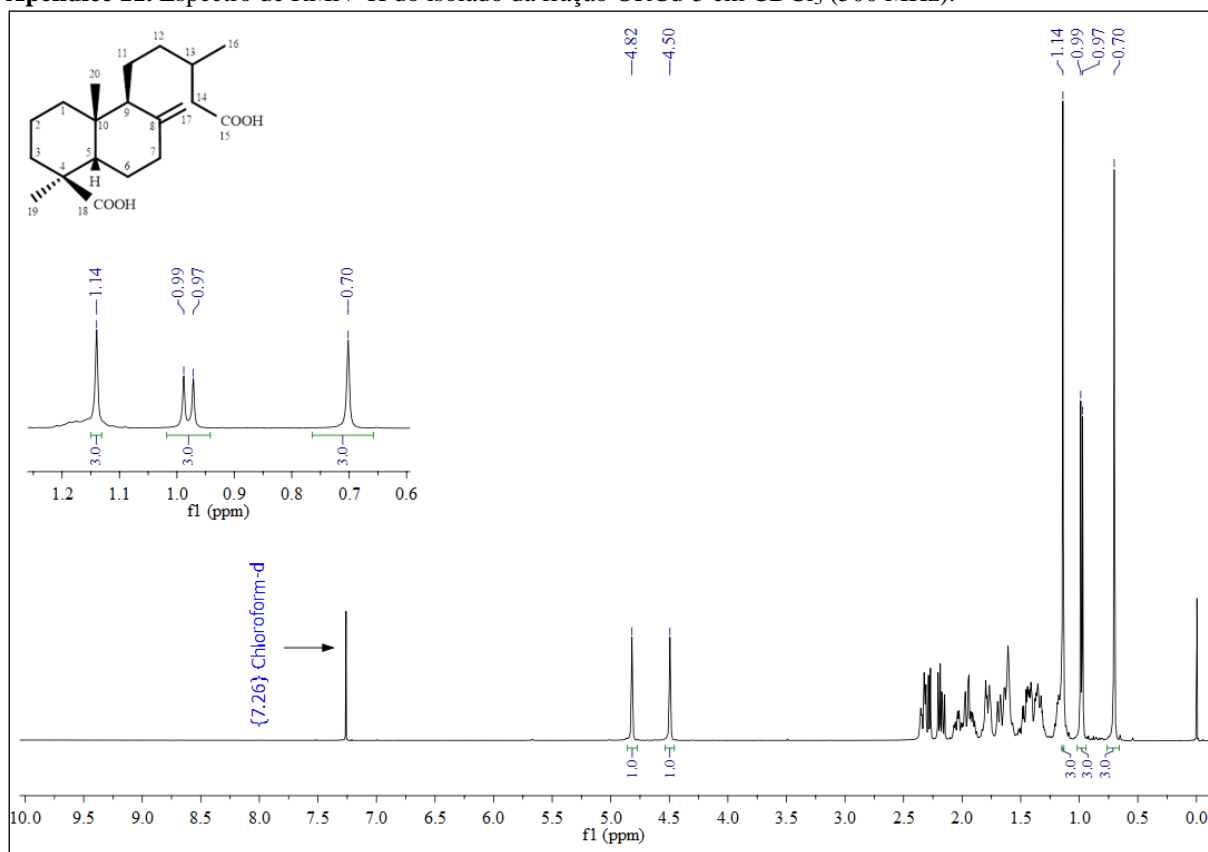
Apêndice 9. Mapa de contorno HSQC do isolado da fração ORCd-4.1.6 em CDCl₃ (500 MHz).



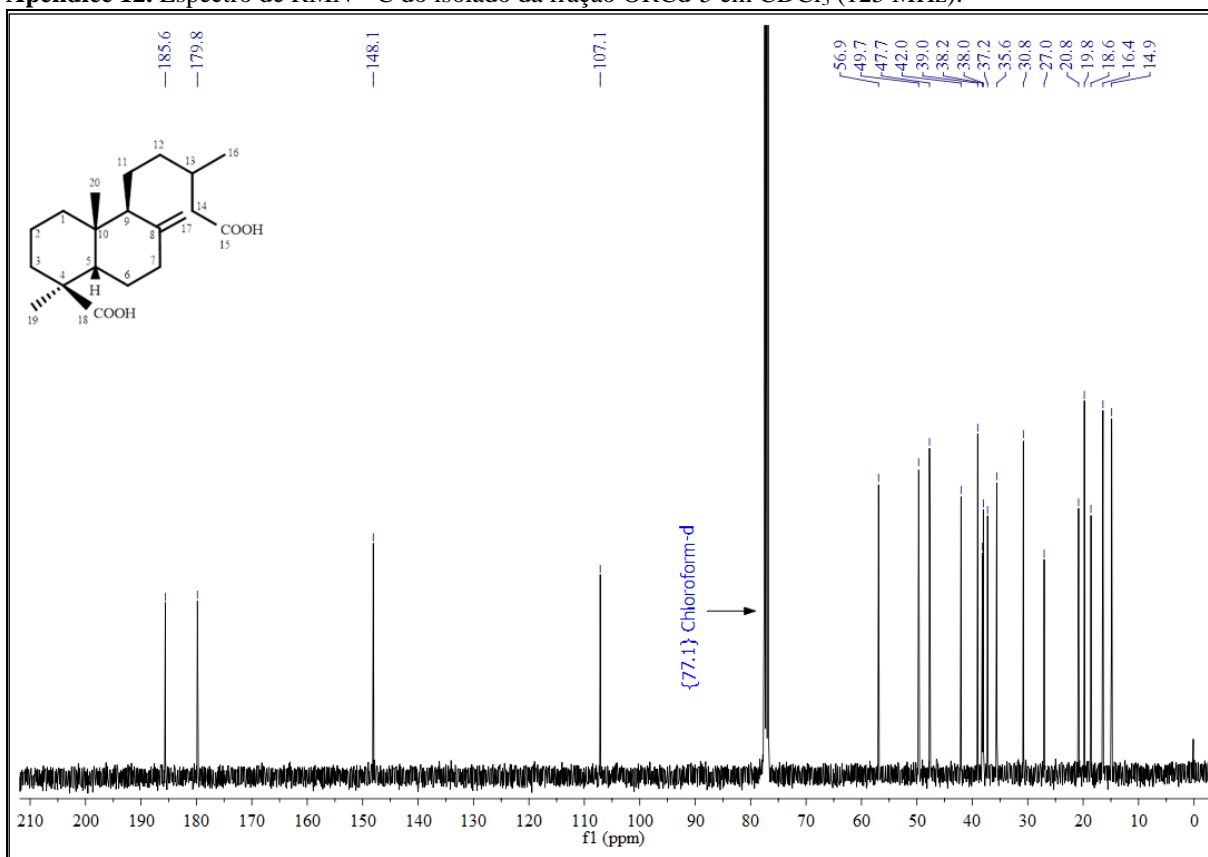
Apêndice 10. Mapa de contorno HMBC do isolado da fração ORCd-4.1.6 em CDCl₃ (500 MHz).



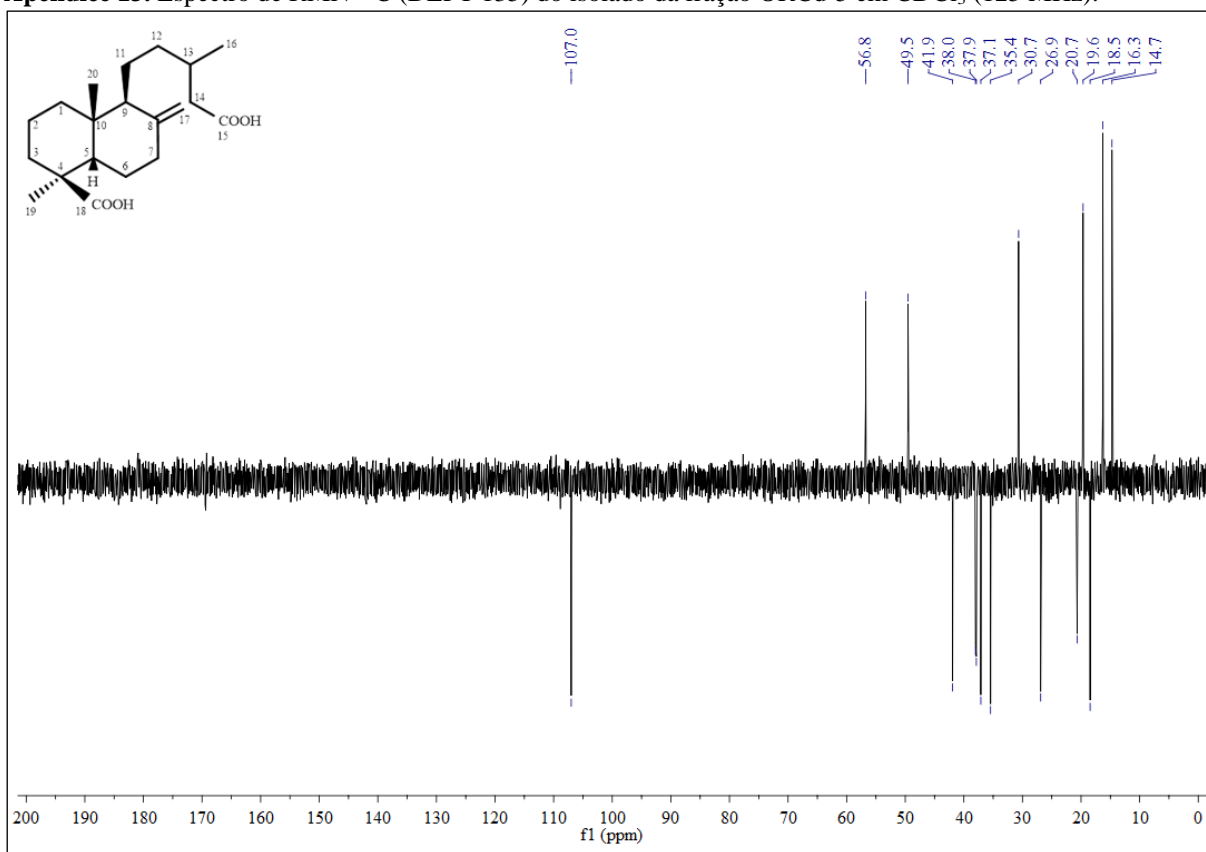
Apêndice 11. Espectro de RMN ^1H do isolado da fração ORCd-5 em CDCl_3 (500 MHz).



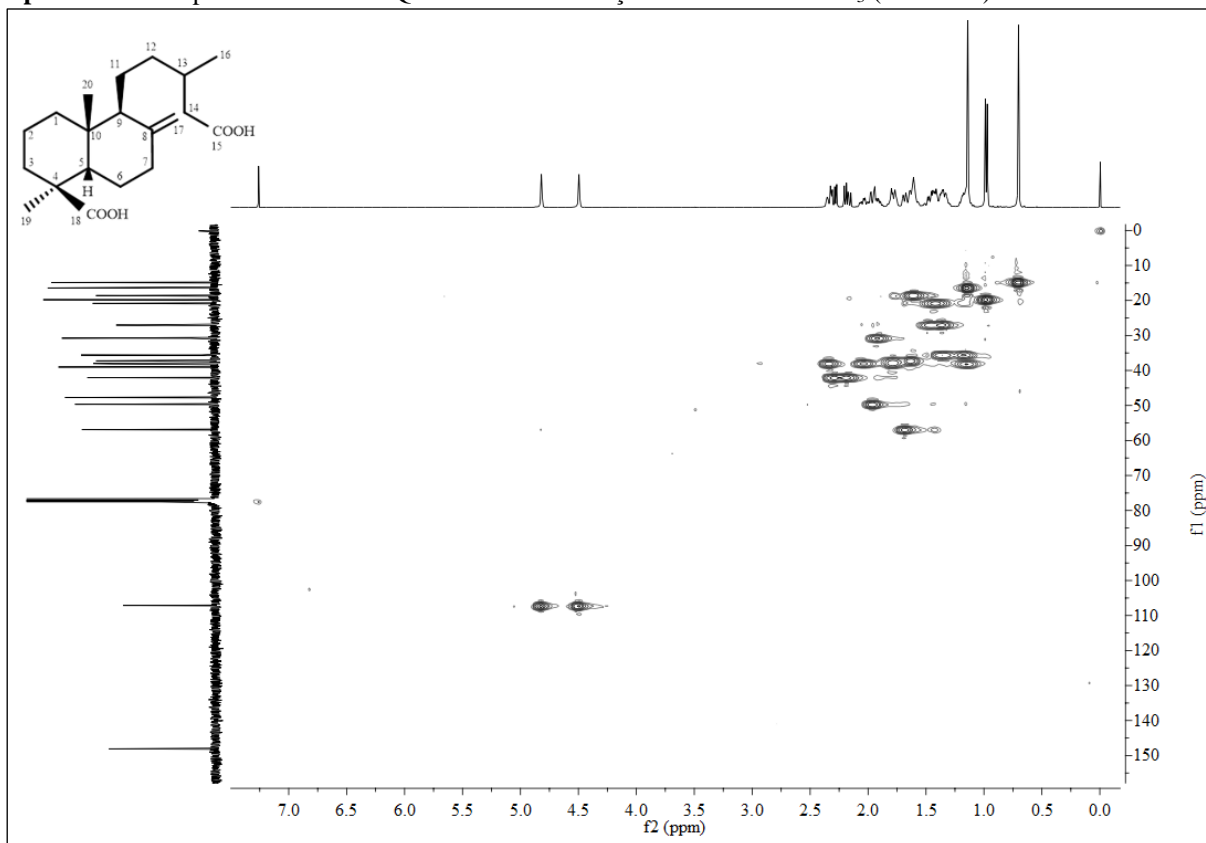
Apêndice 12. Espectro de RMN ^{13}C do isolado da fração ORCd-5 em CDCl_3 (125 MHz).



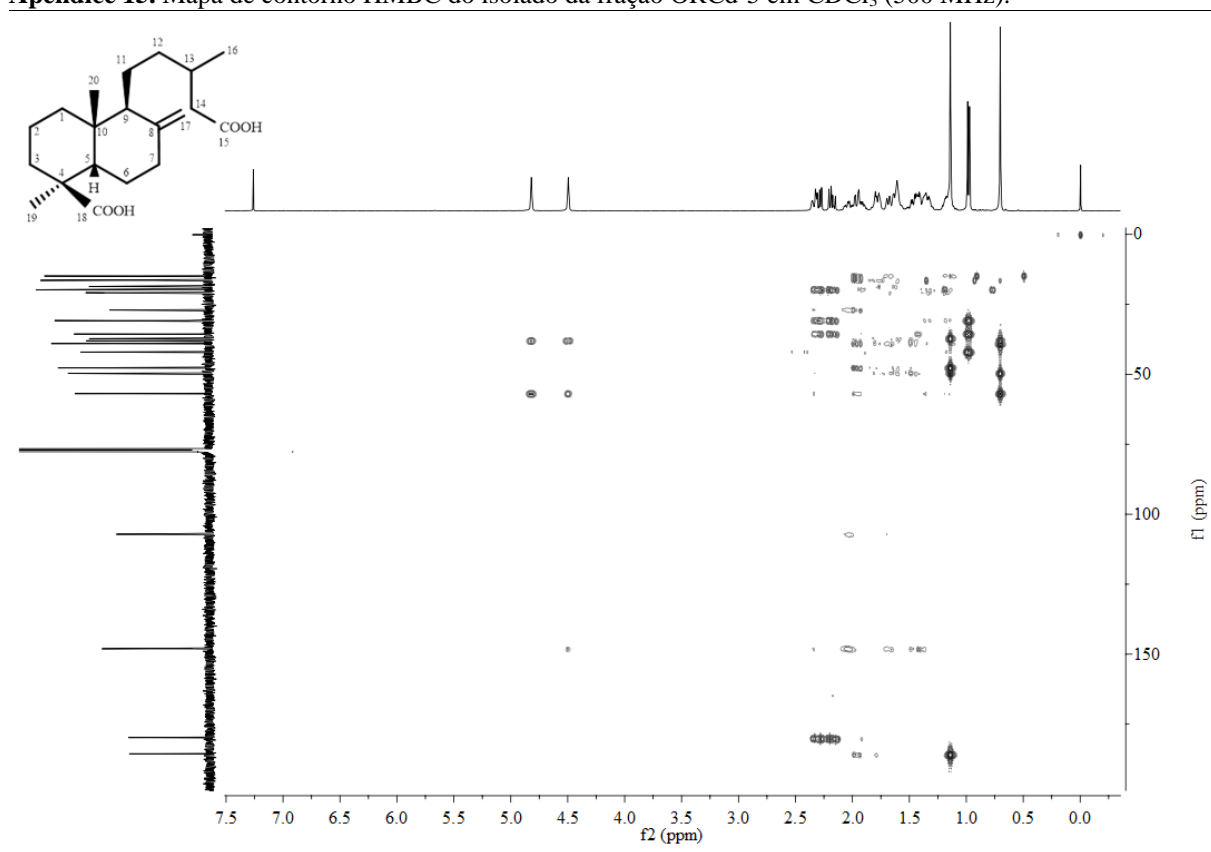
Apêndice 13. Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135) do isolado da fração ORCd-5 em CDCl_3 (125 MHz).



Apêndice 14. Mapa de contorno HSQC do isolado da fração ORCd-5 em CDCl_3 (500 MHz).



Apêndice 15. Mapa de contorno HMBC do isolado da fração ORCd-5 em $CDCl_3$ (500 MHz).



Apêndice 16. Análise de variância (ANOVA) para resposta *número de picos por cromatograma* utilizando o planejamento experimental Box-Behnken para três fatores.

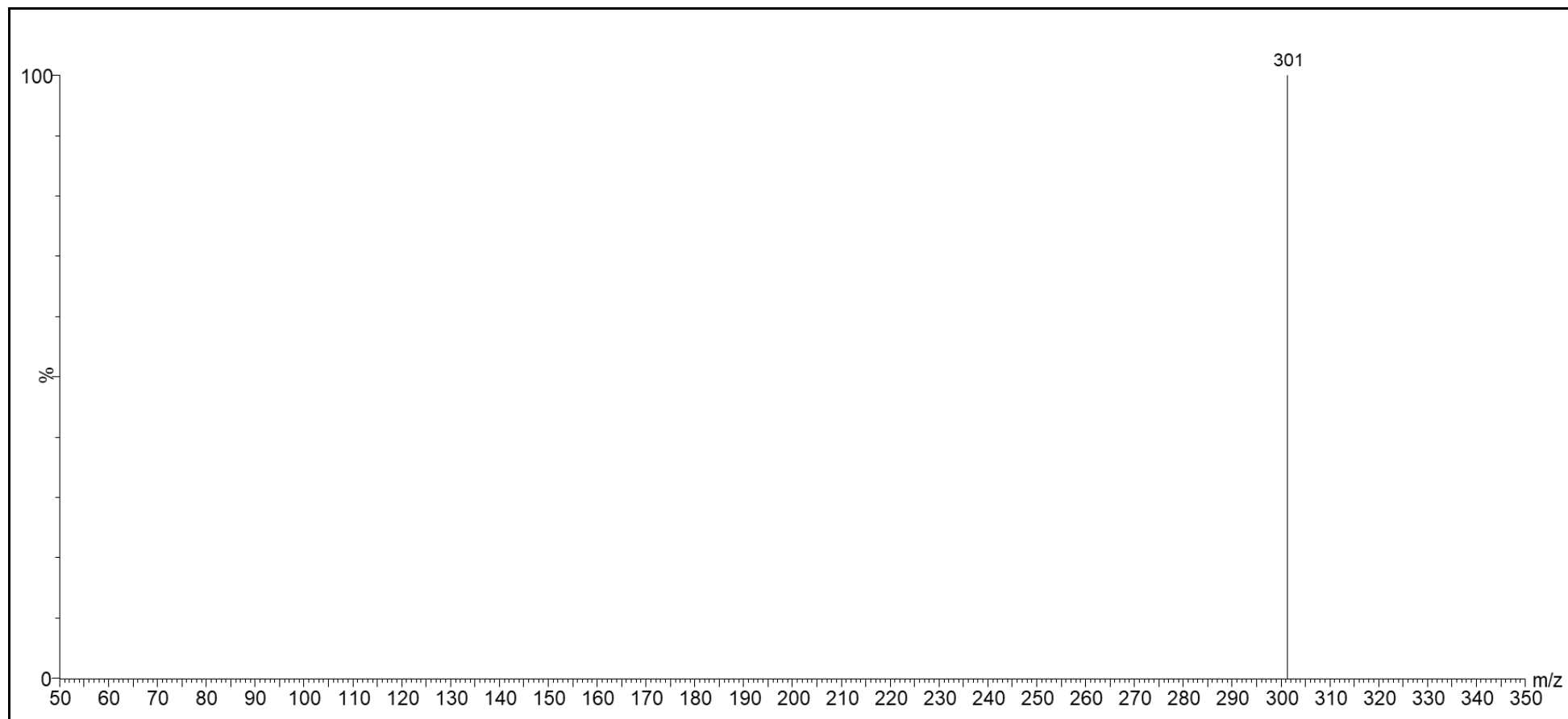
Fator	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p
t_{eq} (min) (L)	15,1250	1	15,1250	2,1416	0,1815
t_{ext} (min) (L)	16,6731	1	16,6731	2,3608	0,1630
T (°C) (L)	18,0000	1	18,0000	2,5487	0,1491
t_{eq} (min) (Q)	4,6731	1	4,6731	0,6617	0,4395
t_{ext} (min) (Q)	21,1250	1	21,1250	2,9912	0,1220
T (°C) (Q)	2,8269	1	2,8269	0,4003	0,5446
Erro puro	56,5000	8	7,0625	-	-
Total da soma quadrática	136,9333	14	-	-	-

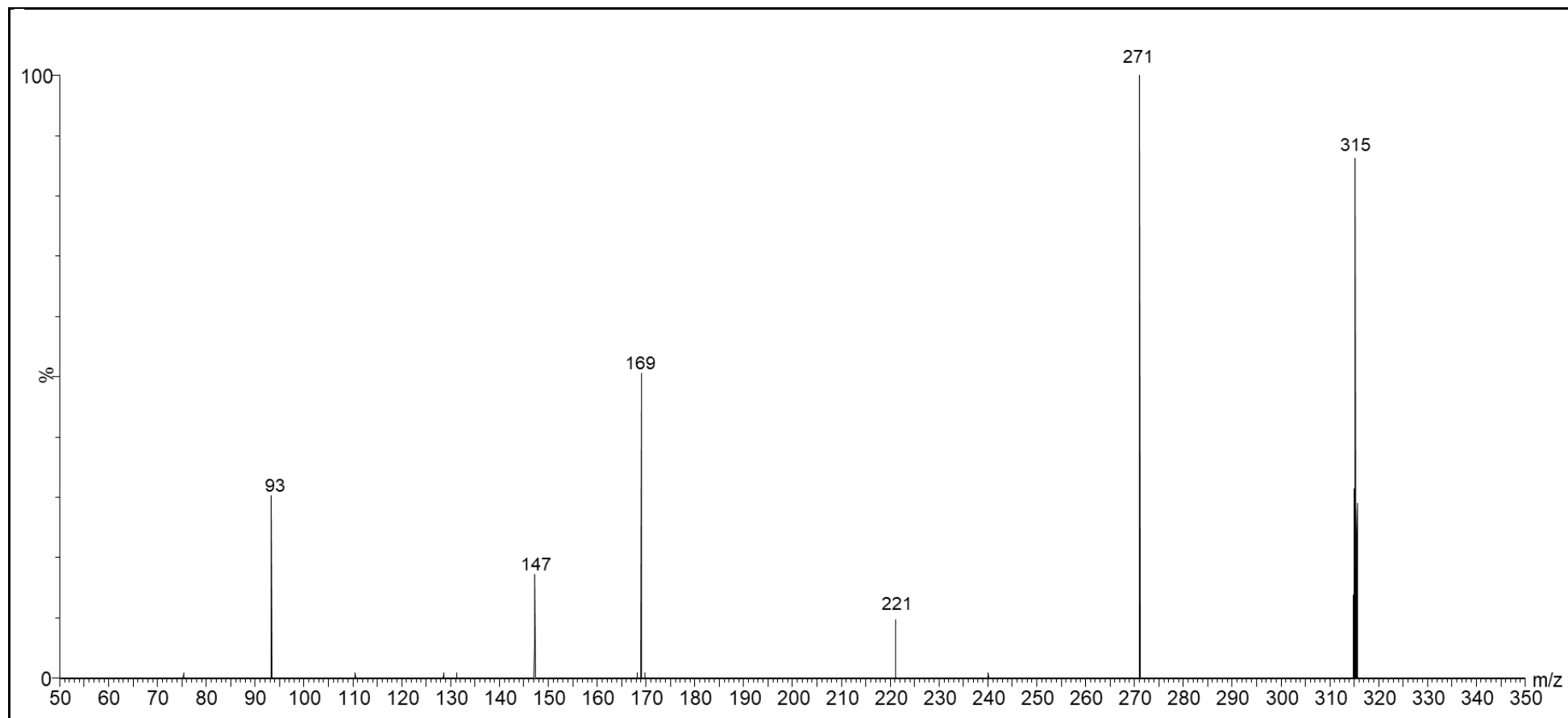
Onde: $r^2 = 0,5874$; $r_{adj} = 0,2780$; L = efeito linear; Q = efeito quadrático. * indica significância estatística com limite de confiança de 95%.

Apêndice 17. Análise de variância (ANOVA) para resposta *área total por cromatograma* utilizando o planejamento experimental Box-Behnken para três fatores.

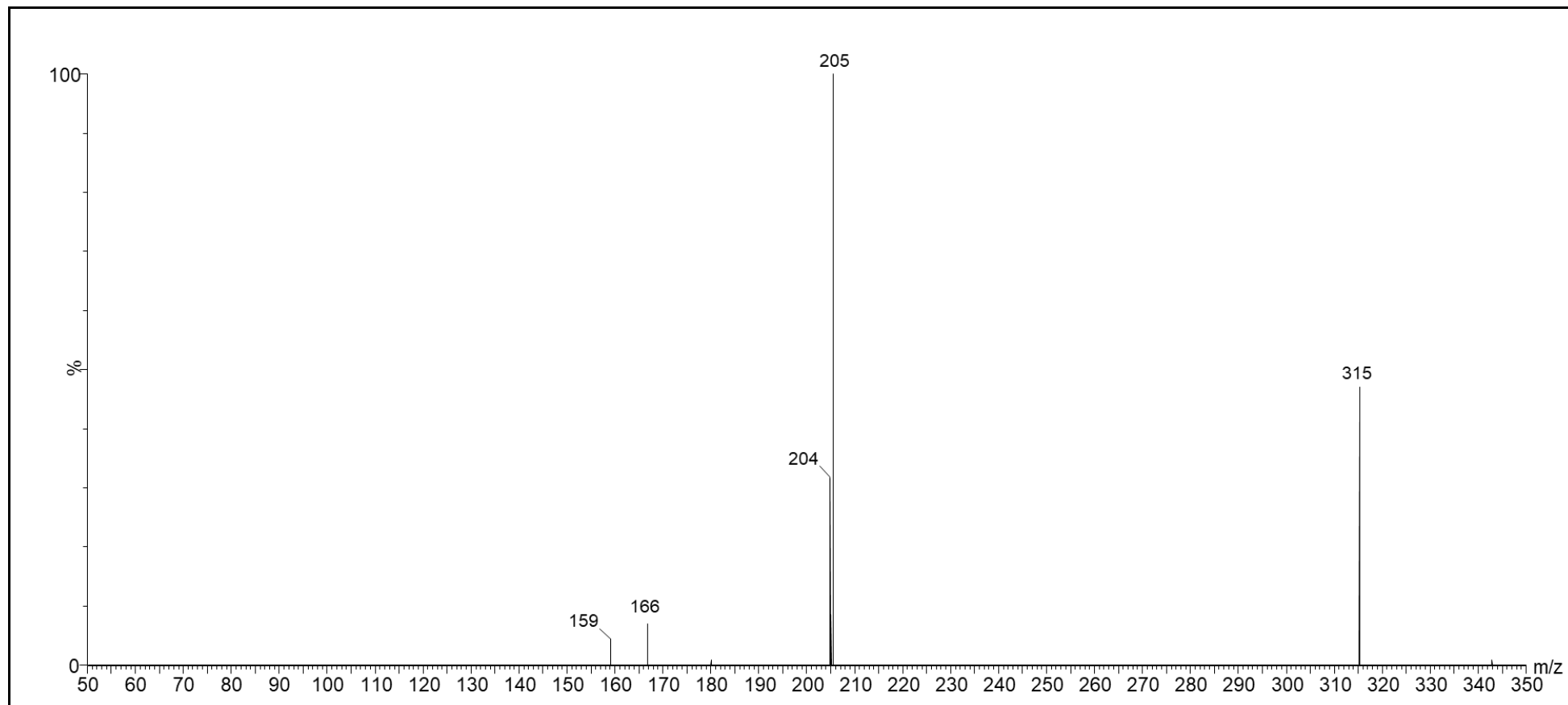
Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p
t_{eq} (min) (L)	$6,94 \times 10^{13}$	1	$6,94 \times 10^{13}$	0,0790	0,7858
t_{ext} (min) (L)	$2,35 \times 10^{15}$	1	$2,35 \times 10^{15}$	2,6748	0,1406
T (°C) (L)	$2,35 \times 10^{16}$	1	$2,35 \times 10^{16}$	26,7718	0,0008*
t_{eq} (min) (Q)	$5,09 \times 10^{15}$	1	$5,09 \times 10^{15}$	5,7885	0,0428*
t_{ext} (min) (Q)	$6,41 \times 10^{15}$	1	$6,41 \times 10^{15}$	7,2913	0,0271*
T (°C) (Q)	$3,30 \times 10^{14}$	1	$3,30 \times 10^{14}$	0,3752	0,5572
Erro puro	$7,04 \times 10^{15}$	8	$8,79 \times 10^{14}$	-	-
Total da soma quadrática	$4,55 \times 10^{16}$	14	-	-	-

Onde: $r^2 = 0,8473$; $r_{adj} = 0,7293$; L = efeito linear; Q = efeito quadrático. * indica significância estatística com limite de confiança de 95%.

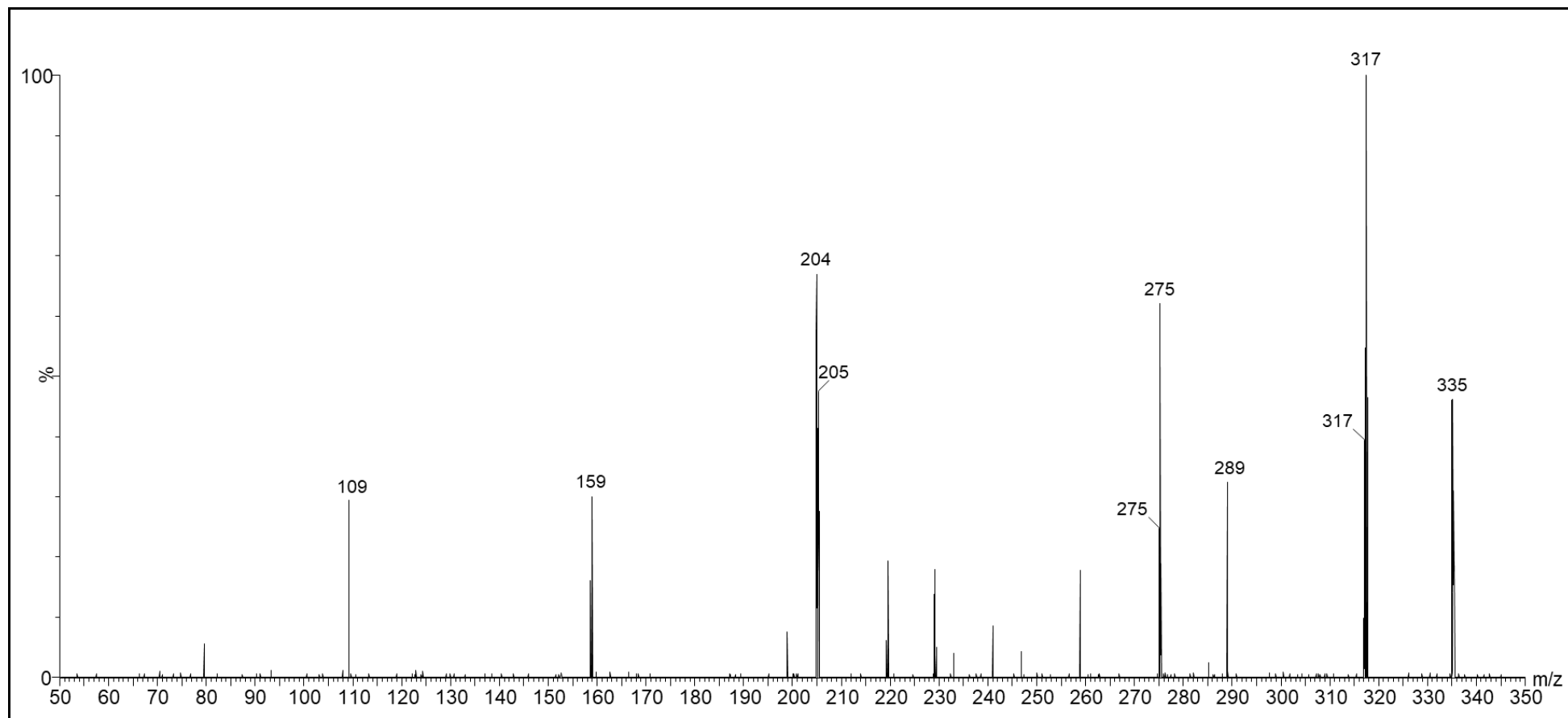
Apêndice 18. Espectro de massas do ácido *ent*-caurenoico (modo SIR).

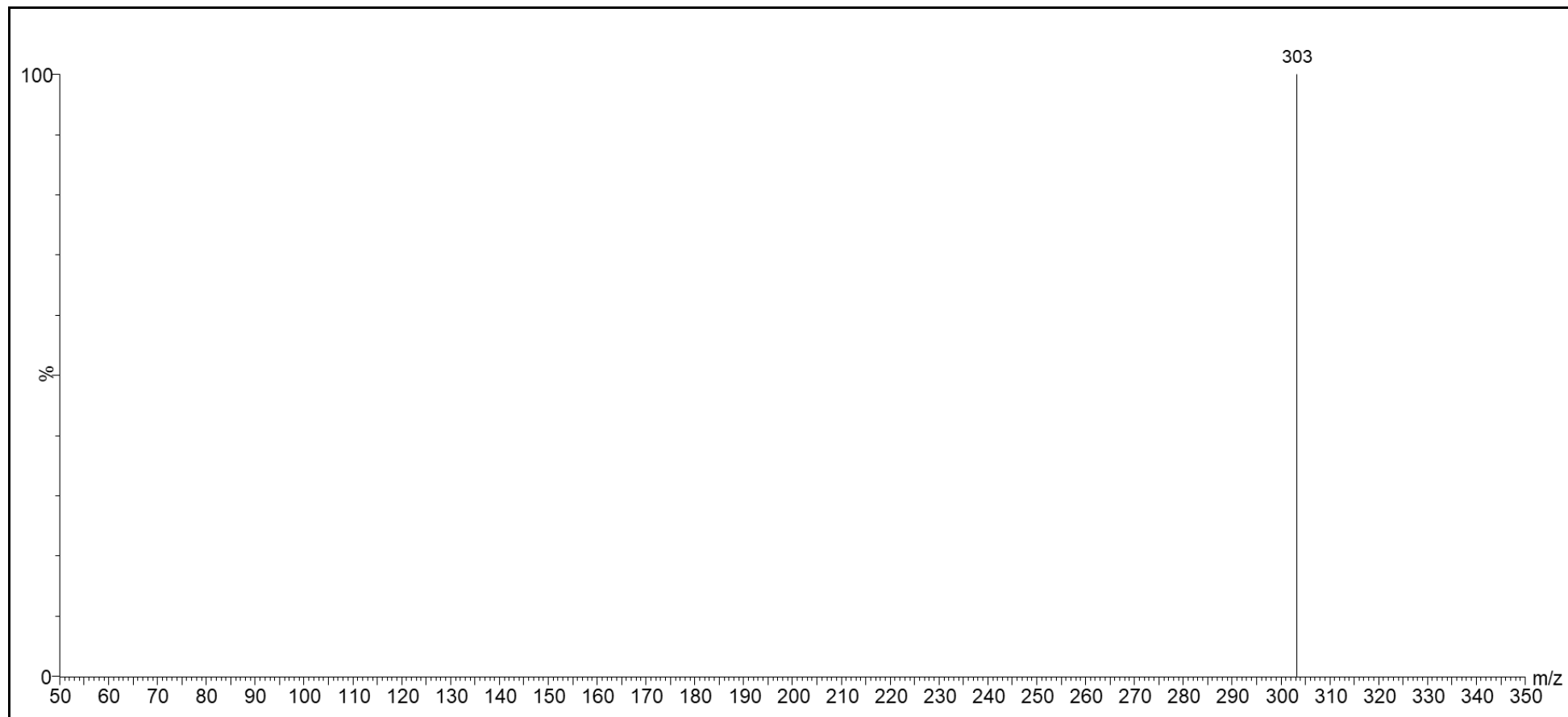
Apêndice 19. Espectro de massas do ácido *ent*-hardwiicko (modo MRM).

Apêndice 20. Espectro de massas do ácido *ent*-poliáltico (modo MRM).

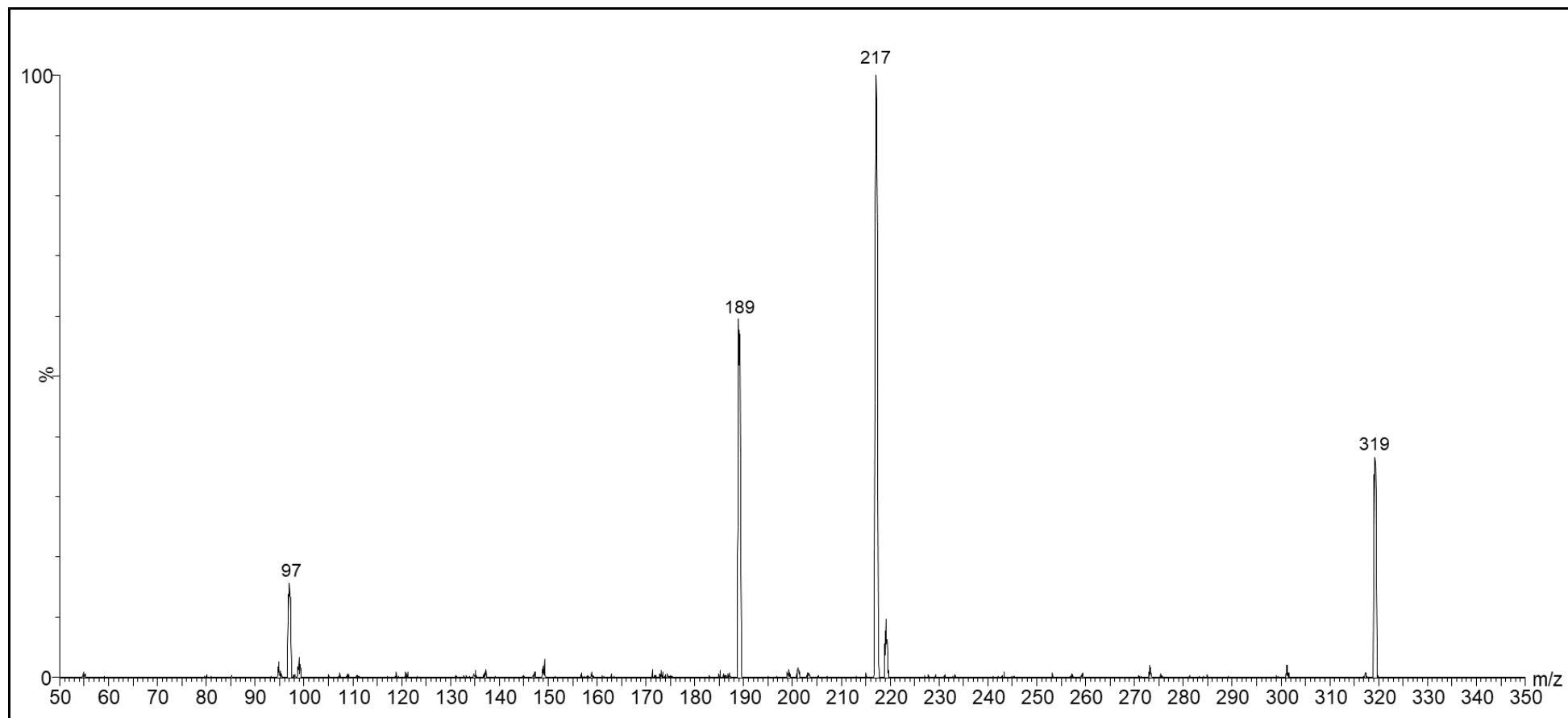


Apêndice 21. Espectro de massas do ácido *ent*-diidroagático (modo MRM).

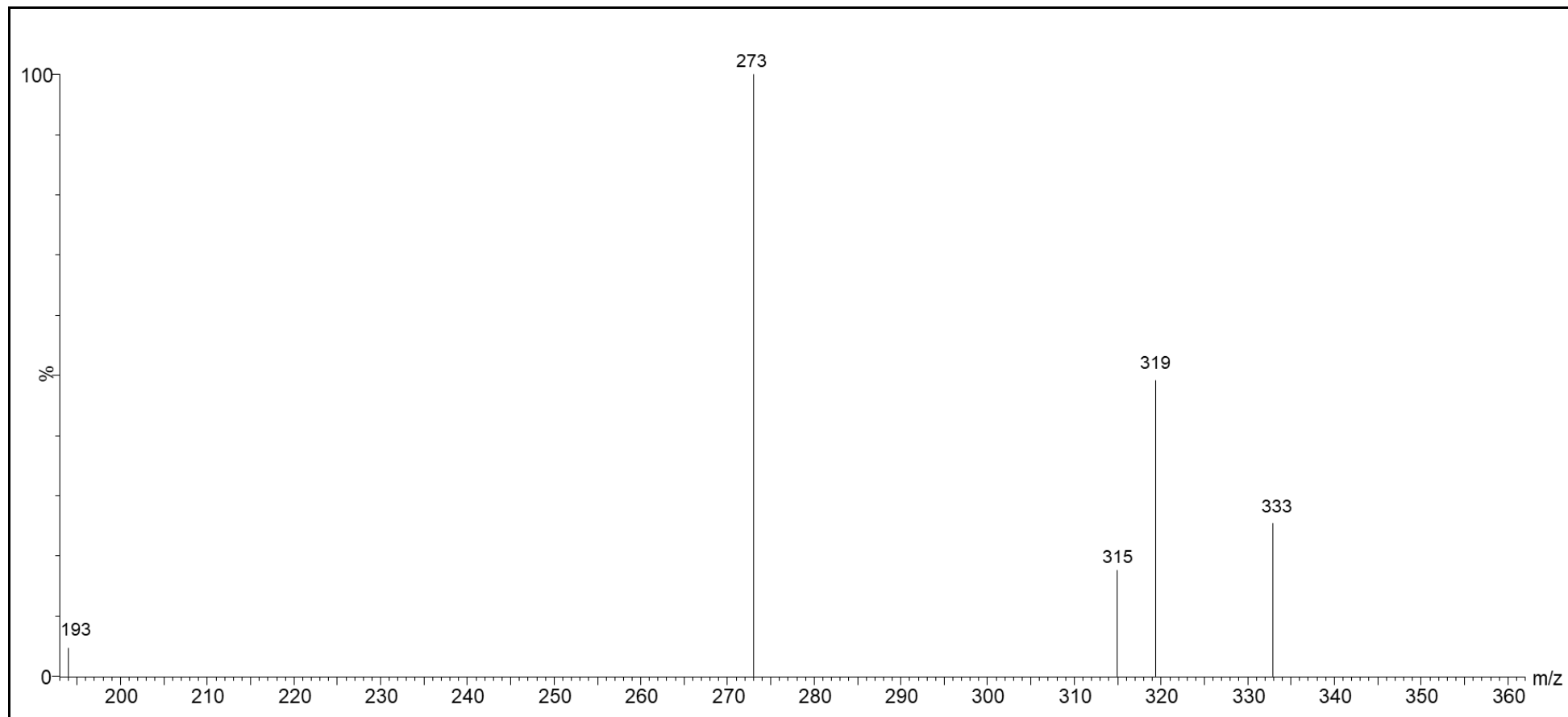


Apêndice 22. Espectro de massas do ácido *ent*-copálico (modo SIR).

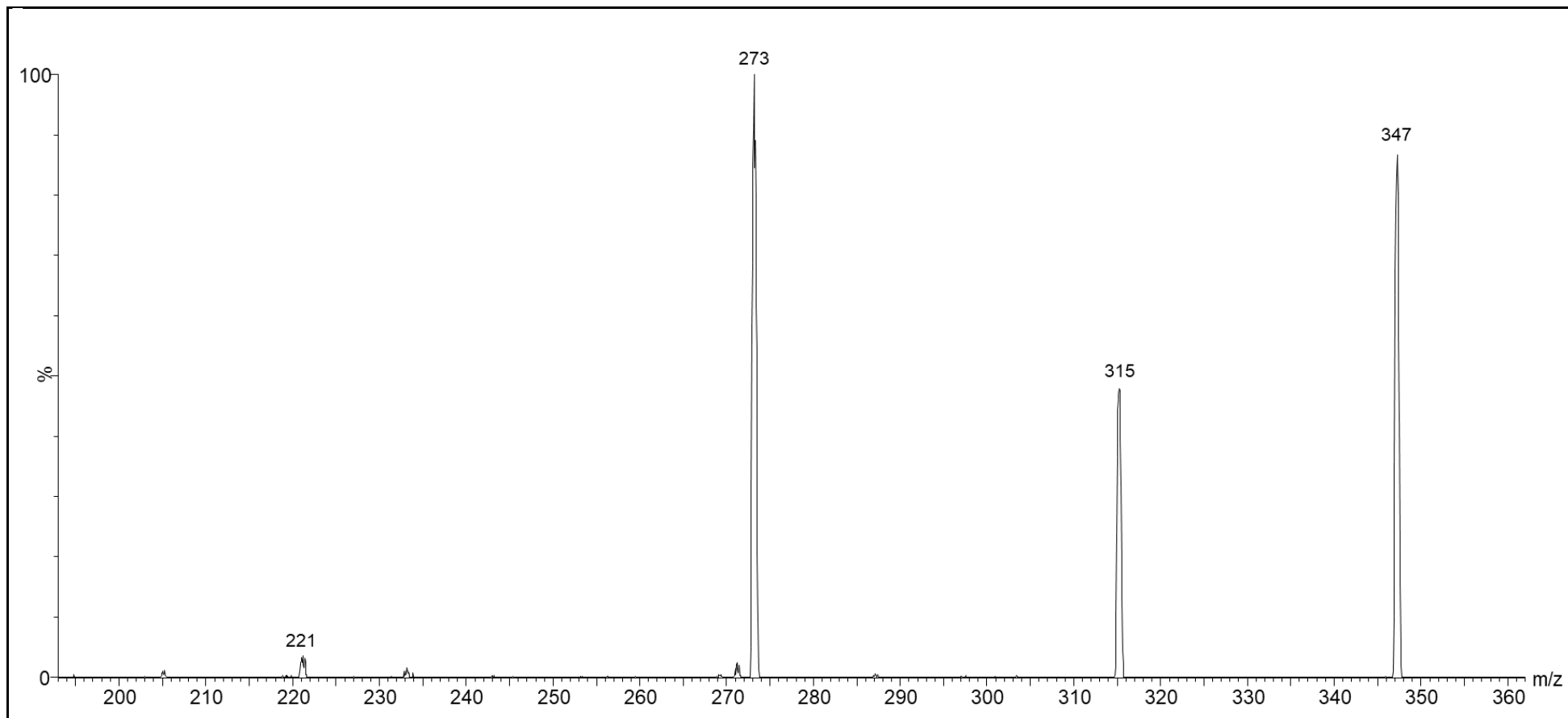
Apêndice 23. Espectro de massas do ácido *ent*-3 β -hidroxi copálico (modo MRM).



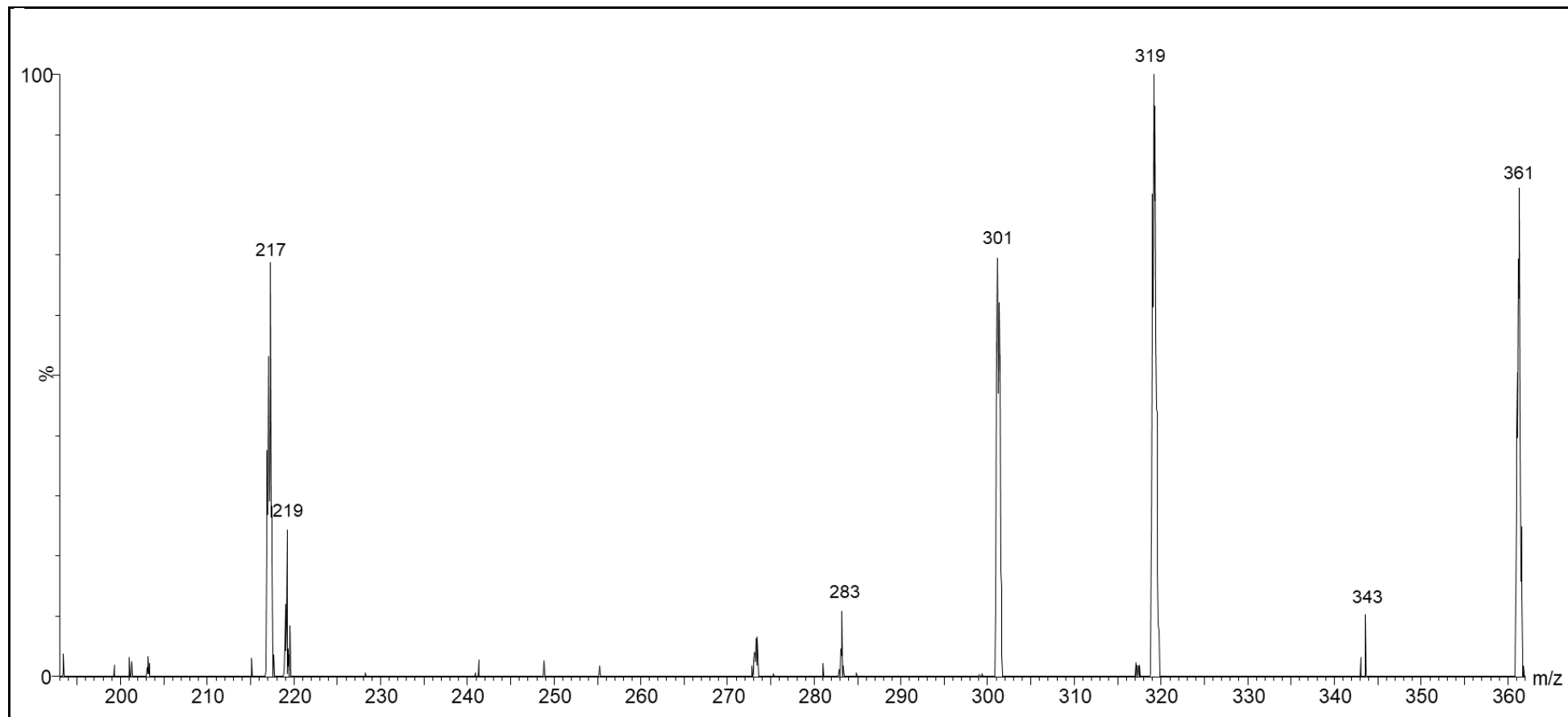
Apêndice 24. Espectro de massas do ácido *ent*-agático (modo MRM).



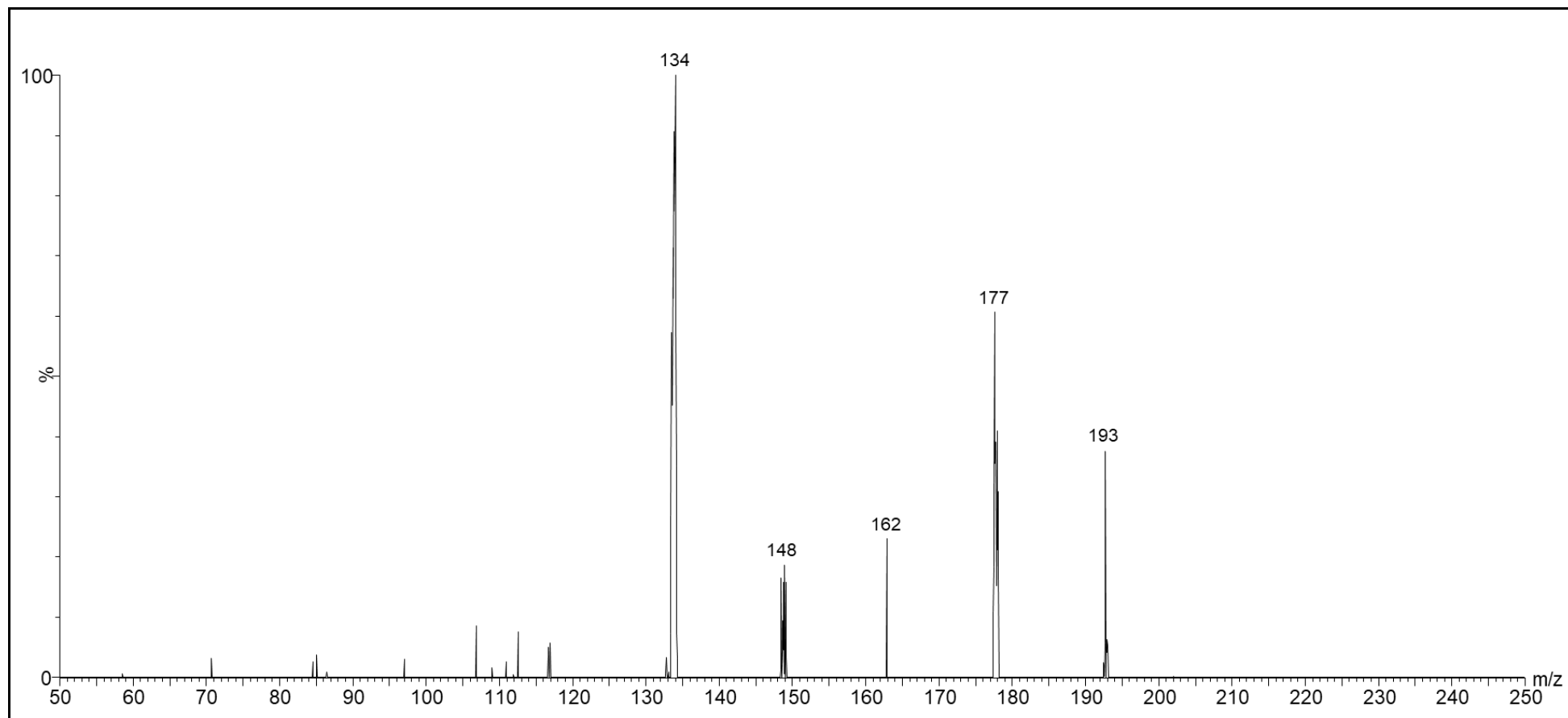
Apêndice 25. Espectro de massas do ácido *ent*-agático-15-metil éster (modo MRM).



Apêndice 26. Espectro de massas do ácido *ent*-3 β -acetoxi-copálico (modo MRM).



Apêndice 27. Espectro de massas do ácido ferúlico – padrão interno (modo MRM).



Apêndice 28. Dados da curva analítica do ácido *ent*-caurenoico no sistema CLUE-EM/EM.

Parâmetros matemáticos da curva analítica							
a		b		r		r ²	
353,6937		7,55513		0,9978		0,9956	
Dados experimentais da curva analítica							
Concentração (µg.mL ⁻¹)	Resposta experimental	Média	Desvio padrão	DPR (%)	Resposta calculada	Resíduo	Resíduo (%)
0,025	14,7348				16,3836	-1,6489	-10,06
0,025	14,5465	14,74	0,19	1,29	16,3836	-1,8371	-11,21
0,025	14,9258				16,3836	-1,4578	-8,90
0,050	29,4135				25,2260	4,1875	16,60
0,050	28,6856	28,97	0,39	1,35	25,2260	3,4596	13,71
0,050	28,8034				25,2260	3,5774	14,18
0,125	50,3801				51,7530	-1,3729	-2,65
0,125	53,9843	53,28	2,62	4,93	51,7530	2,2313	4,31
0,125	55,4874				51,7530	3,7344	7,22
0,200	74,3288				78,2800	-3,9512	-5,05
0,200	77,3483	76,00	1,54	2,02	78,2800	-0,9318	-1,19
0,200	76,3320				78,2800	-1,9481	-2,49
0,275	105,4810				104,8071	0,6740	0,64
0,275	100,0104	101,29	3,72	3,68	104,8071	-4,7967	-4,58
0,275	98,3709				104,8071	-6,4362	-6,14
0,500	191,3848				184,3881	6,9967	3,79
0,500	189,2401	186,56	6,59	3,53	184,3881	4,8520	2,63
0,500	179,0559				184,3881	-5,3323	-2,89

Onde: **a** é o coeficiente angular (inclinação), **b** é o coeficiente linear (interseção), **r** é o coeficiente de correlação e **r²** é o coeficiente de determinação, **DRP** é o desvio padrão relativo das repetições de cada nível de concentração da curva.

Apêndice 29. Dados da curva analítica do ácido *ent-hardwiicko* no sistema CLUE-EM/EM.

Parâmetros matemáticos da curva analítica							
a		b		r		r ²	
0,3985		0,4009		0,9981		0,9962	
Dados experimentais da curva analítica							
Concentração (µg.mL ⁻¹)	Resposta experimental	Média	Desvio padrão	DPR (%)	Resposta calculada	Resíduo	Resíduo (%)
0,500	0,5830				0,6001	-0,0171	-2,84
0,500	0,5828	0,58	0,00	0,61	0,6001	-0,0173	-2,89
0,500	0,5768				0,6001	-0,0233	-3,89
1,250	0,9155				0,8989	0,0166	1,84
1,250	0,9341	0,93	0,01	1,01	0,8989	0,0352	3,91
1,250	0,9265				0,8989	0,0276	3,07
2,000	1,1740				1,1978	-0,0238	-1,99
2,000	1,2153	1,20	0,02	2,01	1,1978	0,0175	1,46
2,000	1,2163				1,1978	0,0185	1,54
2,750	1,5634				1,4967	0,0667	4,46
2,750	1,5143	1,50	0,08	5,14	1,4967	0,0176	1,18
2,750	1,4126				1,4967	-0,0841	-5,62
3,500	1,7944				1,7955	-0,0011	-0,06
3,500	1,7618	1,78	0,02	0,92	1,7955	-0,0337	-1,88
3,500	1,7805				1,7955	-0,0150	-0,84
5,000	2,3749				2,3932	-0,0183	-0,77
5,000	2,3583	2,40	0,06	2,33	2,3932	-0,0349	-1,46
5,000	2,4622				2,3932	0,0690	2,88

Onde: **a** é o coeficiente angular (inclinação), **b** é o coeficiente linear (interseção), **r** é o coeficiente de correlação e **r²** é o coeficiente de determinação, **DRP** é o desvio padrão relativo das repetições de cada nível de concentração da curva.

Apêndice 30. Dados da curva analítica do ácido *ent*-poliáltico no sistema CLUE-EM/EM.

Parâmetros matemáticos da curva analítica							
a		b		r		r²	
0,0278		-0,0011		0,9966		0,9932	
Dados experimentais da curva analítica							
Concentração (µg.mL ⁻¹)	Resposta experimental	Média	Desvio padrão	DPR (%)	Resposta calculada	Resíduo	Resíduo (%)
0,250	0,0071				0,0084	-0,0013	-16,00
0,250	0,0070	0,0075	0,00	11,10	0,0084	-0,0014	-16,52
0,250	0,0085				0,0084	0,0001	0,95
0,500	0,0150				0,0154	-0,0004	-2,48
0,500	0,0132	0,0136	0,00	9,09	0,0154	-0,0022	-14,53
0,500	0,0127				0,0154	-0,0027	-17,72
1,250	0,0329				0,0363	-0,0034	-9,47
1,250	0,0372	0,0346	0,00	6,81	0,0363	0,0009	2,62
1,250	0,0336				0,0363	-0,0027	-7,50
2,000	0,0510				0,0572	-0,0062	-10,85
2,000	0,0515	0,0525	0,00	4,07	0,0572	-0,0056	-9,85
2,000	0,0549				0,0572	-0,0023	-3,95
2,750	0,0761				0,0781	-0,0020	-2,55
2,750	0,0724	0,0729	0,00	4,09	0,0781	-0,0057	-7,30
2,750	0,0702				0,0781	-0,0079	-10,11
3,500	0,0907				0,0990	-0,0083	-8,38
3,500	0,0912	0,0928	0,00	3,44	0,0990	-0,0077	-7,80
3,500	0,0965				0,0990	-0,0025	-2,52
5,000	0,1490				0,1407	0,0083	5,89
5,000	0,1359	0,1416	0,01	4,77	0,1407	-0,0049	-3,46
5,000	0,1398				0,1407	-0,0010	-0,71

Onde: **a** é o coeficiente angular (inclinação), **b** é o coeficiente linear (interseção), **r** é o coeficiente de correlação e **r²** é o coeficiente de determinação, **DRP** é o desvio padrão relativo das repetições de cada nível de concentração da curva.

Apêndice 31. Dados da curva analítica do ácido *ent*-diidroagático no sistema CLUE-EM/EM.

Parâmetros matemáticos da curva analítica							
a		b		r		r ²	
5,3515		0,0366		0,9944		0,9889	
Experimental data of analytical curve							
Concentração (µg.mL ⁻¹)	Resposta experimental	Média	Desvio padrão	DPR (%)	Resposta calculada	Resíduo	Resíduo (%)
0,250	1,5532				1,3744	0,1788	13,01
0,250	1,6269	1,57	0,05	2,89	1,3744	0,2524	18,37
0,250	1,5440				1,3744	0,1695	12,33
1,250	6,5768				6,7259	-0,1491	-2,22
1,250	6,6629	6,74	0,21	3,19	6,7259	-0,0630	-0,94
1,250	6,9846				6,7259	0,2587	3,85
2,000	10,1386				10,7395	-0,6009	-5,59
2,000	10,5853	10,34	0,23	2,19	10,7395	-0,1542	-1,44
2,000	10,3016				10,7395	-0,4379	-4,08
2,750	14,5097				14,7531	-0,2433	-1,65
2,750	14,5896	15,55	1,74	11,18	14,7531	-0,1635	-1,11
2,750	17,5600				14,7531	2,8069	19,03
3,500	18,0496				18,7666	-0,7171	-3,82
3,500	17,5165	17,69	0,31	1,77	18,7666	-1,2501	-6,66
3,500	17,5006				18,7666	-1,2660	-6,75
5,000	27,5086				26,7938	0,7148	2,67
5,000	26,6094	27,25	0,56	2,06	26,7938	-0,1844	-0,69
5,000	27,6421				26,7938	0,8483	3,17

Onde: **a** é o coeficiente angular (inclinação), **b** é o coeficiente linear (interseção), **r** é o coeficiente de correlação e **r²** é o coeficiente de determinação, **DRP** é o desvio padrão relativo das repetições de cada nível de concentração da curva.

Apêndice 32. Dados da curva analítica do ácido *ent*-copálico no sistema CLUE-EM/EM.

Parâmetros matemáticos da curva analítica							
a		b		r		r ²	
17,2721		2,3190		0,9980		0,9960	
Dados experimentais da curva analítica							
Concentração (µg.mL ⁻¹)	Resposta experimental	Média	Desvio padrão	DPR (%)	Resposta calculada	Resíduo	Resíduo (%)
0,250	6,7400				6,6370	0,1030	1,55
0,250	6,7139	6,57	0,27	4,17	6,6370	0,0769	1,16
0,250	6,2530				6,6370	-0,3840	-5,79
0,625	12,7757				13,1140	-0,3383	-2,58
0,625	13,1931	13,37	0,70	5,27	13,1140	0,0791	0,60
0,625	14,1496				13,1140	1,0356	7,90
1,000	19,3227				19,5910	-0,2684	-1,37
1,000	18,8101	18,96	0,32	1,68	19,5910	-0,7809	-3,99
1,000	18,7391				19,5910	-0,8519	-4,35
1,375	27,1973				26,0680	1,1292	4,33
1,375	27,3805	27,06	0,41	1,50	26,0680	1,3124	5,03
1,375	26,6038				26,0680	0,5357	2,06
1,750	32,0669				32,5451	-0,4782	-1,47
1,750	30,5327	31,88	1,27	3,97	32,5451	-2,0124	-6,18
1,750	33,0432				32,5451	0,4981	1,53
2,500	46,3847				45,4991	0,8856	1,95
2,500	45,4694	45,61	0,71	1,56	45,4991	-0,0297	-0,07
2,500	44,9872				45,4991	-0,5119	-1,13

Onde: **a** é o coeficiente angular (inclinação), **b** é o coeficiente linear (interseção), **r** é o coeficiente de correlação e **r²** é o coeficiente de determinação, **DRP** é o desvio padrão relativo das repetições de cada nível de concentração da curva.

Apêndice 33. Dados da curva analítica do ácido *ent-3β*-hidroxi-copálico no sistema CLUE-EM/EM.

Parâmetros matemáticos da curva analítica							
a		b		r		r ²	
4,3131		1,4240		0,9987		0,9974	
Dados experimentais da curva analítica							
Concentração (µg.mL ⁻¹)	Resposta experimental	Média	Desvio padrão	DPR (%)	Resposta calculada	Resíduo	Resíduo (%)
0,500	3,5973				3,5905	0,0067	0,19
0,500	3,4624	3,46	0,15	4,23	3,5905	-0,1281	-3,57
0,500	3,3053				3,5905	-0,2852	-7,94
1,250	6,8123				6,8253	-0,0130	-0,19
1,250	6,9932	6,93	0,10	1,46	6,8253	0,1679	2,46
1,250	6,9801				6,8253	0,1548	2,27
2,000	9,8577				10,0601	-0,2024	-2,01
2,000	10,2367	10,04	0,19	1,89	10,0601	0,1765	1,75
2,000	10,0282				10,0601	-0,0319	-0,32
2,750	13,7878				13,2949	0,4929	3,71
2,750	13,4595	13,65	0,17	1,26	13,2949	0,1645	1,24
2,750	13,7107				13,2949	0,4157	3,13
3,500	16,1732				16,5298	-0,3566	-2,16
3,500	16,1874	16,18	0,01	0,04	16,5298	-0,3423	-2,07
3,500	16,1803				16,5298	-0,3495	-2,11
5,000	23,1514				22,9994	0,1520	0,66
5,000	22,3134	23,04	0,68	2,96	22,9994	-0,6859	-2,98
5,000	23,6633				22,9994	0,6639	2,89

Onde: **a** é o coeficiente angular (inclinação), **b** é o coeficiente linear (interseção), **r** é o coeficiente de correlação e **r²** é o coeficiente de determinação, **DRP** é o desvio padrão relativo das repetições de cada nível de concentração da curva.

Apêndice 34. Dados da curva analítica do ácido *ent*-agático no sistema CLUE-EM/EM.

Parâmetros matemáticos da curva analítica							
a		b		r		r ²	
0,9538		0,0999		0,9997		0,9995	
Dados experimentais da curva analítica							
Concentração (µg.mL ⁻¹)	Resposta experimental	Média	Desvio padrão	DPR (%)	Resposta calculada	Resíduo	Resíduo (%)
0,050	0,1293				0,1476	-0,0183	-12,38
0,050	0,1499	0,13	0,01	9,83	0,1476	0,0023	1,55
0,050	0,1251				0,1476	-0,0225	-15,24
0,250	0,3529				0,3384	0,0146	4,31
0,250	0,3441	0,35	0,00	1,36	0,3384	0,0058	1,71
0,250	0,3455				0,3384	0,0072	2,12
1,250	1,3128				1,2921	0,0207	1,60
1,250	1,3119	1,31	0,00	0,21	1,2921	0,0198	1,53
1,250	1,3076				1,2921	0,0155	1,20
2,000	1,9777				2,0074	-0,0297	-1,48
2,000	1,9835	1,98	0,01	0,32	2,0074	-0,0239	-1,19
2,000	1,9710				2,0074	-0,0364	-1,81
2,750	2,7666				2,7227	0,0438	1,61
2,750	2,7638	2,75	0,03	1,21	2,7227	0,0410	1,51
2,750	2,7078				2,7227	-0,0149	-0,55
3,500	3,4746				3,4380	0,0365	1,06
3,500	3,4302	3,43	0,05	1,31	3,4380	-0,0078	-0,23
3,500	3,3844				3,4380	-0,0536	-1,56

Onde: **a** é o coeficiente angular (inclinação), **b** é o coeficiente linear (interseção), **r** é o coeficiente de correlação e **r²** é o coeficiente de determinação, **DRP** é o desvio padrão relativo das repetições de cada nível de concentração da curva.

Apêndice 35. Dados da curva analítica do ácido *ent*-agático-15-metil éster no sistema CLUE-EM/EM.

Parâmetros matemáticos da curva analítica							
a		b		r		r ²	
45,9607		12,7123		0,9981		0,9962	
Dados experimentais da curva analítica							
Concentração (µg.mL ⁻¹)	Resposta experimental	Média	Desvio padrão	DPR (%)	Resposta calculada	Resíduo	Resíduo (%)
0,250	23,0056				24,2025	-1,1969	-4,95
0,250	23,3976	23,12	0,24	1,05	24,2025	-0,8049	-3,33
0,250	22,9513				24,2025	-1,2511	-5,17
0,625	42,2384				41,4377	0,8007	1,93
0,625	41,3680	41,91	0,48	1,13	41,4377	-0,0697	-0,17
0,625	42,1357				41,4377	0,6979	1,68
1,000	57,0477				58,6730	-1,6253	-2,77
1,000	60,2121	58,64	1,58	2,70	58,6730	1,5391	2,62
1,000	58,6720				58,6730	-0,0010	0,00
1,375	79,7384				75,9082	3,8302	5,05
1,375	75,8690	77,85	1,94	2,49	75,9082	-0,0392	-0,05
1,375	77,9314				75,9082	2,0231	2,67
1,750	91,9844				93,1435	-1,1591	-1,24
1,750	92,1214	92,36	0,53	0,57	93,1435	-1,0220	-1,10
1,750	92,9642				93,1435	-0,1793	-0,19
2,500	122,5784				127,6140	-5,0356	-3,95
2,500	126,4115	127,10	4,90	3,86	127,6140	-1,2025	-0,94
2,500	132,3095				127,6140	4,6955	3,68

Onde: **a** é o coeficiente angular (inclinação), **b** é o coeficiente linear (interseção), **r** é o coeficiente de correlação e **r²** é o coeficiente de determinação, **DRP** é o desvio padrão relativo das repetições de cada nível de concentração da curva.

Apêndice 36. Dados da curva analítica do ácido *ent-3β*-acetoxi-copálico no sistema CLUE-EM/EM.

Parâmetros matemáticos da curva analítica							
a		b		r		r ²	
1,5573		1,0231		0,9990		0,9980	
Dados experimentais da curva analítica							
Concentração (µg.mL ⁻¹)	Resposta experimental	Média	Desvio padrão	DPR (%)	Resposta calculada	Resíduo	Resíduo (%)
0,500	1,8492				1,8017	0,0475	2,63
0,500	1,7632	1,82	0,05	2,78	1,8017	-0,0385	-2,13
0,500	1,8523				1,8017	0,0506	2,81
1,250	3,0688				2,9697	0,0991	3,34
1,250	3,0053	3,02	0,04	1,31	2,9697	0,0356	1,20
1,250	2,9960				2,9697	0,0263	0,89
2,000	4,0367				4,1376	-0,1009	-2,44
2,000	4,2630	4,14	0,11	2,74	4,1376	0,1254	3,03
2,000	4,1328				4,1376	-0,0048	-0,12
2,750	5,2645				5,3056	-0,0411	-0,77
2,750	5,1873	5,25	0,06	1,13	5,3056	-0,1183	-2,23
2,750	5,3042				5,3056	-0,0014	-0,03
3,500	6,2212				6,4735	-0,2523	-3,90
3,500	6,4725	6,35	0,13	1,98	6,4735	-0,0010	-0,02
3,500	6,3468				6,4735	-0,1267	-1,96
5,000	8,8633				8,8094	0,0539	0,61
5,000	9,0351	8,91	0,11	1,24	8,8094	0,2257	2,56
5,000	8,8301				8,8094	0,0207	0,23

Onde: **a** é o coeficiente angular (inclinação), **b** é o coeficiente linear (interseção), **r** é o coeficiente de correlação e **r²** é o coeficiente de determinação, **DRP** é o desvio padrão relativo das repetições de cada nível de concentração da curva.

Apêndice 37. Dados da curva analítica do ácido α -copaeno no sistema CG-DIC.

Parâmetros matemáticos da curva analítica							
a		b		r		r ²	
0,0109		-0,2633		0,9981		0,9963	
Dados experimentais da curva analítica							
Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Resposta experimental	Média	Desvio padrão	DPR (%)	Resposta calculada	Resíduo	Resíduo (%)
100	0,95				0,82	-0,12	-15,1
100	0,95	0,95	0,00	0,16	0,82	-0,13	-15,4
100	0,95				0,82	-0,12	-15,1
200	1,80				1,91	0,11	5,7
200	1,81	1,80	0,00	0,20	1,91	0,10	5,3
200	1,80				1,91	0,11	5,5
300	2,89				2,99	0,10	3,5
300	2,88	2,88	0,01	0,24	2,99	0,11	3,8
300	2,88				2,99	0,12	3,9
400	4,08				4,08	-0,01	-0,1
400	4,08	4,08	0,00	0,09	4,08	0,00	0,0
400	4,08				4,08	0,00	0,0
500	5,14				5,16	0,02	0,5
500	5,15	5,15	0,01	0,12	5,16	0,01	0,3
500	5,15				5,16	0,01	0,2
600	6,49				6,25	-0,24	-3,8
600	6,51	6,50	0,01	0,22	6,25	-0,26	-4,2
600	6,50				6,25	-0,25	-4,0
700	7,18				7,34	0,16	2,2
700	7,21	7,19	0,01	0,21	7,34	0,13	1,8
700	7,19				7,34	0,14	2,0

Onde: **a** é o coeficiente angular (inclinação), **b** é o coeficiente linear (interseção), **r** é o coeficiente de correlação e **r²** é o coeficiente de determinação, **DRP** é o desvio padrão relativo das repetições de cada nível de concentração da curva.

Apêndice 38. Dados da curva analítica do ácido β -elemeno no sistema CG-DIC.

Parâmetros matemáticos da curva analítica							
a	b			r	r ²		
0,0085	-0,1222			0,9973	0,9947		
Dados experimentais da curva analítica							
Concentração (µg.mL ⁻¹)	Resposta experimental	Média	Desvio padrão	DPR (%)	Resposta calculada	Resíduo	Resíduo (%)
100	0,81				0,73	-0,08	-10,6
100	0,81	0,81	0,00	0,14	0,73	-0,08	-10,7
100	0,81				0,73	-0,08	-10,4
200	1,64				1,58	-0,06	-3,5
200	1,63	1,63	0,00	0,29	1,58	-0,05	-2,9
200	1,63				1,58	-0,05	-3,2
300	2,43				2,43	0,00	0,1
300	2,41	2,41	0,02	0,69	2,43	0,02	1,0
300	2,40				2,43	0,03	1,4
400	3,18				3,28	0,11	3,2
400	3,17	3,18	0,00	0,10	3,28	0,11	3,4
400	3,18				3,28	0,11	3,3
500	4,07				4,14	0,07	1,7
500	4,05	4,06	0,01	0,22	4,14	0,09	2,1
500	4,06				4,14	0,07	1,8
600	4,87				4,99	0,12	2,4
600	4,79	4,83	0,04	0,78	4,99	0,20	3,9
600	4,83				4,99	0,16	3,2
700	6,08				5,84	-0,24	-4,1
700	6,07	6,07	0,00	0,08	5,84	-0,23	-3,9
700	6,07				5,84	-0,24	-4,0

Onde: **a** é o coeficiente angular (inclinação), **b** é o coeficiente linear (interseção), **r** é o coeficiente de correlação e **r²** é o coeficiente de determinação, **DRP** é o desvio padrão relativo das repetições de cada nível de concentração da curva.

Apêndice 39. Dados da curva analítica do ácido β -cariofileno no sistema CG-DIC.

Parâmetros matemáticos da curva analítica							
a		b		r		r ²	
0,0085		-0,2032		0,9982		0,9966	
Dados experimentais da curva analítica							
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Resposta experimental	Média	Desvio padrão	DPR (%)	Resposta calculada	Resíduo	Resíduo (%)
100	0,74				0,64	-0,10	-14,9
100	0,74	0,74	0,00	0,23	0,64	-0,10	-15,4
100	0,74				0,64	-0,10	-15,0
200	1,40				1,49	0,09	5,7
200	1,41	1,41	0,00	0,26	1,49	0,08	5,2
200	1,41				1,49	0,08	5,5
300	2,25				2,33	0,08	3,5
300	2,25	2,25	0,00	0,17	2,33	0,09	3,7
300	2,25				2,33	0,09	3,8
400	3,18				3,18	0,00	0,0
400	3,18	3,18	0,00	0,04	3,18	0,00	0,0
400	3,18				3,18	0,00	0,0
500	4,01				4,03	0,02	0,4
500	4,01	4,01	0,00	0,11	4,03	0,01	0,3
500	4,02				4,03	0,01	0,2
600	5,05				4,87	-0,18	-3,8
600	5,08	5,07	0,01	0,24	4,87	-0,21	-4,2
600	5,07				4,87	-0,19	-4,0
700	5,59				5,72	0,12	2,1
700	5,62	5,60	0,01	0,18	5,72	0,10	1,8
700	5,60				5,72	0,11	1,9

Onde: **a** é o coeficiente angular (inclinação), **b** é o coeficiente linear (interseção), **r** é o coeficiente de correlação e **r²** é o coeficiente de determinação, **DRP** é o desvio padrão relativo das repetições de cada nível de concentração da curva.

Apêndice 40. Dados da curva analítica do ácido α -humuleno no sistema CG-DIC.

Parâmetros matemáticos da curva analítica							
a		b		r		r ²	
0,0085		-0,2087		0,9981		0,9962	
Dados experimentais da curva analítica							
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Resposta experimental	Média	Desvio padrão	DPR (%)	Resposta calculada	Resíduo	Resíduo (%)
100	0,74				0,64	-0,10	-15,5
100	0,75	0,75	0,00	0,24	0,64	-0,10	-16,0
100	0,75				0,64	-0,10	-15,7
200	1,41				1,50	0,08	5,5
200	1,42	1,42	0,00	0,28	1,50	0,07	5,0
200	1,42				1,50	0,08	5,3
300	2,27				2,35	0,08	3,3
300	2,25	2,26	0,01	0,65	2,35	0,10	4,1
300	2,24				2,35	0,11	4,5
400	3,21				3,20	0,00	-0,2
400	3,19	3,20	0,01	0,33	3,20	0,02	0,5
400	3,20				3,20	0,01	0,2
500	4,04				4,06	0,01	0,3
500	4,04	4,05	0,00	0,12	4,06	0,01	0,3
500	4,05				4,06	0,00	0,1
600	5,09				4,91	-0,19	-3,8
600	5,12	5,11	0,01	0,22	4,91	-0,21	-4,3
600	5,11				4,91	-0,20	-4,0
700	5,64				5,76	0,12	2,1
700	5,66	5,65	0,01	0,16	5,76	0,10	1,8
700	5,65				5,76	0,11	1,9

Onde: **a** é o coeficiente angular (inclinação), **b** é o coeficiente linear (interseção), **r** é o coeficiente de correlação e **r²** é o coeficiente de determinação, **DRP** é o desvio padrão relativo das repetições de cada nível de concentração da curva.

Apêndice 41. Lista de publicações relacionadas a presente tese de doutorado.

#	Título do Trabalho	Autores	Periódico	Ano
1	Development of a validated ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of acid diterpenes in <i>Copaifera</i> oleoresins.	SILVA, J. J. M.; CREVELIN, E. J.; CARNEIRO, L. J.; ROGEZ, H.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBROSIO, S. R.; MORAES, L. A. B.; BASTOS, J. K.	Journal of Chromatography A	2017
2	Development and validation of a rapid and reliable RP-HPLC-PDA method for the quantification of six diterpenes in <i>Copaifera duckei</i> , <i>Copaifera reticulata</i> and <i>Copaifera multijuga</i> oleoresins	CARNEIRO, L. J.; BIANCHI, T. C.; SILVA, J. J. M.; OLIVEIRA, L. C.; BORGES, C. H. G.; LEMES, D. C.; BASTOS, J. K.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.	Journal of Brazilian Chemical Society	2017
3	Skin wound healing potential and mechanisms of the hydroalcoholic extract of leaves and oleoresin of <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. Kuntze in rats	GUSHIKEN, L. F. S.; HUSSNI, C. A.; ROZZA, A. L.; BESERRA, F. P.; LEMOS, M.; POLIZELLO JUNIOR, M.; SILVA, J. J. M.; NOBREGA, R. H.; MARTINEZ, E. R. M.; PELLIZZON, C. H	Evidence-based Complementary and Alternative Medicine	2017
4	<i>Copaifera duckei</i> oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> .	COSTA, J. C.; VALLADAO, G. M. R.; PALA, G.; GALLANI, S. U.; KOTZENT, S.; CROTTI, A. E. M.; FRACAROLLI, L.; SILVA, J. J. M.; PILARSKI, F.	Aquaculture	2017
5	<i>Copaifera duckei</i> oleoresin and its main non-volatile terpenes: <i>in vitro</i> schistosomicidal properties.	BORGES, C. H. G.; CRUZ, M. G.; CARNEIRO, L. J.; SILVA, J. J. M.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C.; DE OLIVEIRA, P. F.; RODRIGUES, V.; VENEZIANI, R. C. S.; PARREIRA, R. L. T.; CARAMORI, G. F.; NAGURNIAK, G. R.; MAGALHÃES, L. G.; AMBRÓSIO, S. R.	Chemistry & Biodiversity	2016
6	<i>Copaifera reticulata</i> oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens.	BARDAJI, D. K. R.; SILVA, J. J. M.; BIANCHI, T. C.; EUGENIO, D. S.; OLIVEIRA, P. F.; LEANDRO, L. F.; ROGEZ, H.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBROSIO, S. R.; TAVARES, D. C.; BASTOS, J. K.; MARTINS, C. H. G.	Anaerobe	2016
7	Immunomodulatory action of <i>Copaifera spp</i> oleoresins on cytokine production by human monocytes	SANTIAGO, K. B.; CONTI, B. J.; MURBACH, T.; ANDRADE, B. F.; MANGABEIRA DA SILVA, J. J.; ROGEZ, H. L. G.; CREVELIN, E. J.; BERALDO DE MORAES, L. A.; VENEZIANI, R.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M.	Biomedicine & Pharmacotherapy	2015

Anexos

9 ANEXOS

Anexo 1. Autorização emitida pelo CGEN ao Projeto Temático (Parte 1).



4502842184779129

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010225/2014-5

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 248, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 104/2011, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO - USP

CNPJ: 630.255.300/0001-04

Representante Legal: MARCO ANTONIO ZAGO

Cargo/Função: Pró-Reitor de Pesquisa

CPF: 348.967.088-49 **RG:** 3579713

Projeto: VALIDAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS E PRINCÍPIOS ATIVOS DE ESPÉCIES DE COPAIFERA

Coordenador do Projeto: Jairo Kenupp Bastos

CPF: 564.337.947-34 **RG:** 47614243 - IFP / RJ

Finalidade do projeto: Propõe-se o estudo de espécies de *Copaifera* visando a validação química e farmacológica, bem como a padronização de extratos dessas espécies. Para tanto, serão realizados o estudo metabólico das oleoresinas e dos extratos das folhas, o desenvolvimento de métodos analíticos, bem como ensaios biológicos, farmacológicos e toxicológicos. As amostras serão depositadas no Herbário do Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e de Ribeirão Preto (SPFR) da Universidade de São Paulo, credenciada sob o número 072/2012/SECEX/CGEN.

Amostras a serem acessadas:

Grupos Taxonômicos: *Copaifera duckei* Dwyer, *C. martii* Hayne, *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. piresii* Ducke, *C. paupera* (Herzog) Dwyer, *C. guyanensis* Desf., *C. pubiflora* (Benth), *C. coriacea* Mart., *C. langsdorffii* Desff, *C. trapezifolia* Hayne e *C. lucens* (Dwyer), *C. oblongifolia*, bem como outras espécies do gênero *Copaiba* não previstas.

Tipo de material/quantidade de amostras: Serão coletados cerca de 2 litros de óleo e 3 kg de folhas de cada uma das seguintes espécies: *Copaifera duckei* Dwyer, *C. martii* Hayne, *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne e *C. piresii* Ducke, *C. paupera* (Herzog) Dwyer, *C. guyanensis* Desf., *C. pubiflora* (Benth), *C. coriacea* Mart., *C. langsdorffii* Desff, *C. trapezifolia* Hayne e *C. lucens* (Dwyer), bem como de espécies não previstas.

Local de depósito de subamostra: FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRAO PRETO

Equipe do projeto: JAIRO KENUPP BASTOS / CPF 564.337.947-34

LUIZ ALBERTO BERALDO DE MORAES / CPF 110.544.698-06

SERGIO AKIRA UYEMURA / CPF 058.519.228-69

WILSON ROBERTO CUNHA / CPF 062.607.778-84

RODRIGO CASSIO SOLA VENEZIANI / CPF 183.322.738-70

VANDERLEI RODRIGUES / CPF 551.714.438-15

JOSE MAURICIO SFORCIN / CPF 088.077.898-58

VLADIMIR CONSTANTINO GOMES HELENO / CPF 145.524.768-58

MARCIO LUIS ANDRADE E SILVA / CPF 668.478.776-34

VERA LUCIA LANCHOTE / CPF 033.163.688-33

LUIS ALEXANDRE PEDRO DE FREITAS / CPF 088.488.978-17

HERVE LOUIS GHISLAIN ROGEZ / CPF 508.489.252-20

NIEGE ARACARI JACOMETTI CARDOSO FURTADO / CPF 183.200.628-02

CLAUDIA HELENA PELLIZZON / CPF 139.315.628-24

Anexo 1. Autorização emitida pelo CGEN ao Projeto Temático (Parte Final).

DENISE CRISPIM TAVARES / CPF 071.494.028-36
JONAS JOAQUIM MANGABEIRA DA SILVA / CPF 702.676.182-04
ERICK VICENTE DA SILVA MOTTA / CPF 097.822.106-09
CARLOS HENRIQUE GOMES MARTINS / CPF 592.006.856-68
JULIANA DE CARVALHO DA COSTA / CPF 115.695.377-47
MARIVANE LEMOS / CPF 046.682.919-19
SERGIO RICARDO AMBROSIO / CPF 196.340.888-80

Validade da Autorização: 15/05/2014 a 01/04/2019

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio do Coordenador do Projeto, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.948/2003. O roteiro para confecção do relatório está disponível em <http://www.cnpq.br/web/guest/relatorio-de-atividades>. Os relatórios devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico, para o endereço apg@cnpq.br e, preferencialmente, em formato .pdf.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010225/2014-5. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

Se ocorrer coleta de espécie não autorizada ou não identificada, deverá ser observado o que consta no Decreto nº 6.514, de 22/07/2008, no que refere à flora e fauna, e em particular sobre espécies ameaçadas de extinção ou de endemismo estrito.



A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRTM). A remessa para instituições nacionais está isenta de autorização prévia. Contudo, a remessa para instituições sediadas no exterior depende de autorização prévia do CNPq, nos termos das resoluções do CGEN 15/2004 e 20/2006. Os modelos dos termos, assim como as citadas resoluções, estão disponíveis em <http://www.cnpq.br/web/guest/remessa-e-transporte> e devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico para o endereço apg@cnpq.br, preferencialmente em formato .pdf. Ainda, para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, especialmente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 15 de Maio de 2014

Marcelo Marcos Morales
Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 4592842184779129 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.

Anexo 2. Autorização emitida pelo MMA-SISBIO-ICMBio-IBAMA ao Projeto Temático (Parte 1).

		Ministério do Meio Ambiente - MMA Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO			
Autorização para atividades com finalidade científica					
Número: 35143-1		Data da Emissão: 12/07/2012 10:13			
Dados do titular					
Nome: Herve Louis Ghislain Rogez		CPF: 508.489.252-20			
Título do Projeto: VALIDAÇÃO QUÍMICA-FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS E PRINCÍPIOS ATIVOS DE ESPÉCIES DE COPAÍFERA					
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ		CNPJ: 34.621.748/0001-23			
Cronograma de atividades					
#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)		
1	Primeira coleta das oito espécies de copaíba selecionadas em campo (ano 2012)	07/2012	09/2012		
2	Segunda coleta das oito espécies de copaíba selecionadas em campo (ano 2013)	07/2013	09/2013		
3	Terceira coleta das oito espécies de copaíba selecionadas em campo (ano 2014)	07/2014	09/2014		
De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.					
Observações e ressalvas					
1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.				
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.				
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.				
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte: www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.				
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.				
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.				
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.				
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da Infra-estrutura da unidade.				
Outras ressalvas					
1	O pesquisador estrangeiro Herve Louis Ghislain Rogez possui vínculo empregatício efetivo com instituição científica brasileira. Dispensado de autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.				
Equipe					
#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Jonas Joaquim Mangabeira da Silva	Colaborador	702.676.182-04	4179661 SSP-PA	Brasileira
2	Jairo Kenupp Bastos	Coordenador Geral do Projeto	564.337.947-34	04761424-3 IFF-RJ	Brasileira
Locais onde as atividades de campo serão executadas					
#	Município	UF	Descrição do local	Tipo	
1	PARAUPEBAS	PA	FLORESTA NACIONAL DE CARAJÁS	UC Federal	
Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).					
Código de autenticação: 88744648					Página 1/3

Anexo 2. Autorização emitida pelo MMA-SISBIO-ICMBio-IBAMA ao Projeto Temático (Parte 2).



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 35143-1	Data da Emissão: 12/07/2012 10:13
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Herve Louis Ghislain Rogez	CPF: 508.489.252-20
Título do Projeto: VALIDAÇÃO QUÍMICA-FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS E PRINCÍPIOS ATIVOS DE ESPÉCIES DE COPAIFERA	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	CNPJ: 34.621.748/0001-23

2	SANTAREM	PA	Flores do Tapajós	Fora de UC Federal
3	SALINOPOLIS	PA	Região do Salgado	Fora de UC Federal
4	MARABÁ	PA	Sudeste do Pará	Fora de UC Federal
5	MANAUS	AM	Reserva Adolpho Ducke	Fora de UC Federal
6	RIBEIRÃO PRETO	SP	Ribeirão Preto	Fora de UC Federal
7	SALVADOR	BA	Salvador	Fora de UC Federal
8	RIO DE JANEIRO	RJ	Rio de Janeiro	Fora de UC Federal
9	SANTO ANTONIO DO LEVERGER	MT	Santo Antônio	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta de material botânico, fúngico ou microbiológico	Copaifera trapezifolia, Copaifera multijuga, Copaifera reticulata, Copaifera coriacea, Copaifera multijuga, Copaifera marginata, Copaifera officinalis, Copaifera reticulata, Copaifera langsdorffii, Copaifera arenicola, Copaifera guyanensis, Copaifera luetzelburgii, Copaifera nana, Copaifera langsdorffii, Copaifera duckel, Copaifera guianensis, Copaifera luetzelburgii, Copaifera glycyarpa, Copaifera duckel, Copaifera trapezifolia, Copaifera officinalis, Copaifera martii, Copaifera sabulicola, Copaifera piresii, Copaifera oblongifolia, Copaifera martii, Copaifera glycyarpa, Copaifera lucens

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Plantas)	Folhas, Selva
2	Método de captura/coleta (Plantas)	Outros métodos de captura/coleta (Oleoessinas através da perfuração do tronco com trado e as folhas a partir de podas de galhos.)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FACULDADE CIÊNCIAS FARM.RIB.PRETO - USP	
2	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 88744648



Página 2/3

