



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de método analítico por cromatografia
gasosa para identificação e análise sazonal de compostos
voláteis de *Copaifera sp.* e avaliação da atividade
antimicrobiana**

Victor Pena Ribeiro

**Ribeirão Preto
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de método analítico por cromatografia gasosa
para identificação e análise sazonal de compostos voláteis de
Copaifera sp. e avaliação da atividade antimicrobiana**

Victor Pena Ribeiro

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de método analítico por cromatografia gasosa
para identificação e análise sazonal de compostos voláteis de
Copaifera sp. e avaliação da atividade antimicrobiana**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientado: Victor Pena Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 28/04/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

RIBEIRO, V. P.	Desenvolvimento de método analítico por cromatografia gasosa para identificação e análise sazonal de compostos voláteis de <i>Copaifera sp.</i> e avaliação da atividade antimicrobiana	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca	MESTRADO FCFRPUSP 2017
-------------------	--	---	------------------------------

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.

Ribeiro, Victor Pena.

Desenvolvimento de método analítico por cromatografia gasosa para identificação e análise sazonal de compostos voláteis de *Copaifera sp.* e avaliação da atividade antimicrobiana. Ribeirão Preto, 2017.

110p.; 30cm.

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

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

1. *Copaifera* 2. Voláteis 3. Cromatografia gasosa
4. Sazonalidade 5. Antimicrobiano

FOLHA DE APROVAÇÃO

Victor Pena Ribeiro

Desenvolvimento de método analítico por cromatografia gasosa para identificação e análise sazonal de compostos voláteis de *Copaifera sp.* e avaliação da atividade antimicrobiana.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre 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: _____

Aos meus pais, Osmar Borges Ribeiro e Maria Beatriz Pena Ribeiro por todo amor e dedicação depositados em mim. À minha irmã Iara Pena Ribeiro, pelo apoio.

Ao meu grande amigo, parceiro e companheiro Domingos Jácomo Neto por estar sempre ao meu lado e pela paciência.

Aos meus familiares que apesar da distância torcem por mim.

Ao meu amigo Dr. Adam Luiz Claudino que sempre me motivou a seguir o caminho da pós graduação.

A todos os meus amigos.

Dedico a vocês!

Agradecimento

Ao meu orientador Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela paciência ao transmitir o conhecimento ao longo desse caminho.

À Prof. Dra. Niede Niede Araçari Jacometti Cardoso Furtado por ter aberto as portas do laboratório de Farmacognosia para mim e pelo acolhimento proporcionado.

Ao Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal e à Dra. Fernanda Oliveira das Chagas pelos conselhos transmitidos durante o exame de qualificação.

À técnica Angélica pelos valiosos conselhos, pelas análises microbiológicas e pela amizade. Aos técnicos Mário e Walter pelo suporte proporcionado ao longo desses dois anos.

À amiga Caroline Arruda pela ajuda nos ensaios de validação e a Jennyfer pela parceria desenvolvida durante a realização do projeto de pesquisa. Ao Mohamed pela troca de conhecimentos durante esses anos. Ao Jonas pelo auxílio em várias etapas do projeto. A todos os amigos do laboratório de Farmacognosia.

Ao Dr. Eduardo José Crevelin, do Departamento de Química da FFCLRP-USP, por realizar as análises de CG/EM.

Ao técnico Vinicius, do Departamento de Química da FFCLRP-USP, por realizar as análises de RMN.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação Eleni e Rafael, pela ajuda durante o mestrado.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela infraestrutura e incentivos para o desenvolvimento desse trabalho. A todos os docentes e funcionários.

À CAPES pela bolsa de estudos.

*Por vezes, quando reflito sobre as tremendas
consequências que resultam das pequenas coisas...
Fico tentado a pensar...
que não há pequenas coisas.*

Bruce Barton

RESUMO

RIBEIRO, V. P. **Desenvolvimento de método analítico por cromatografia gasosa para identificação e análise sazonal de compostos voláteis de *Copaifera* sp. e avaliação da atividade antimicrobiana.** 2017. 110f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A *Copaifera* (*Fabaceae*, *Caesalpinioideae*), conhecida popularmente como “copaíba”, “copaibeira” ou “pau d’óleo”, é uma árvore de grande porte que se encontra amplamente distribuída pelo Brasil, desde a floresta amazônica até a vegetação do cerrado. A oleorresina é constituída principalmente por sesquiterpenos e diterpenos, sendo utilizada na medicina popular no tratamento de processos infecciosos e inflamatórios. Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos constituem cerca de 80% das oleorresinas representando uma fração de grande importância. Estudos sobre métodos analíticos capazes de quantificar os voláteis na oleorresina ainda são escassos. Sendo assim, foi proposto desenvolver e validar método analítico por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (DIC) para análise de compostos voláteis presentes nas oleorresinas e folhas de *Copaifera* sp. e avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos voláteis em mistura e isolados. Para tanto, os óleos voláteis foram obtidos por meio da hidrodestilação das oleorresinas das espécies *Copaifera langsdorffii* Desff; *C. duckey* Dewey; *C. multijuga* Hayne; *C. paupera* (Herzog) Dewey; *C. reticulata* Ducke e *C. publifora* Benth. Os óleos voláteis de *C. multijuga*, *C. paupera* e *C. publifora* foram submetidos ao destilador de bancada (800 Automatic Micro Spinning Band Distillation) visando o fracionamento dos compostos voláteis majoritários. Os compostos foram purificados por meio de cromatografia em coluna aberta utilizando-se sílica gel e identificados por CG/EM e por RMN ^1H e ^{13}C . Foram isolados os sesquiterpenos α -copaeno, β -elemeno, δ -cadineno, β -cariofileno, α -humuleno e O-cariofileno. O método analítico foi avaliado frente aos parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez e mostrou-se adequado para quantificação dos sesquiterpenos nas oleoresinas das diferentes espécies de *Copaifera* estudadas. O método analítico também foi utilizado no estudo de sazonalidade, que foi realizado nas folhas de *C. langsdorffii*, com o qual foi possível identificar três constituintes sesquiterpênicos, sendo eles β -cariofileno, germacreno D e β -elemeno, sendo que o germacreno D apresentou o maior teor. Na análise sazonal desses compostos o germacreno D foi o composto que mais variou durante o período estudado com variação de até 63%. Foi avaliado também o potencial antimicrobiano dos sesquiterpenos isolados e das oleoresinas. Os óleos voláteis de *C. paupera*, *C. duckey*, *C. langsdorffii* apresentaram baixa e moderada atividade contra *S. aureus*, apresentando efeito bactericida nas concentrações de 500, 500, 125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os mesmos óleos voláteis apresentaram efeito semelhante frente às linhagens de *S. choleraesuis*, mas apenas com efeito bacteriostático. Os óleos voláteis de *C. duckey* e *C. langsdorffii* apresentaram alta atividade contra *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. Nenhum dos constituintes sesquiterpênicos isolados foi ativo frente às bactérias e leveduras pois apresentaram atividade em uma concentração maior do que 400 $\mu\text{g/mL}$.

Palavras-chave: Cromatografia gasosa; *Copaifera*; Antimicrobiano.

ABSTRACT

RIBEIRO, V. P. **Development of a gas chromatography analytical method for identification and seasonal analyses of volatile compounds of *Copaifera* sp. and evaluation of their antimicrobial activity.** 2017. 110f. Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Copaifera (*Fabaceae*, *Caesalpinioideae*), popularly known as "copaiba", "copaibeira" or "pau d'óleo", is a large tree that is widely distributed throughout Brazil, from the Amazon forest to the vegetation of the cerrado. Its Oleoresin is composed mainly of sesquiterpenes and diterpenes, and it is used in folk medicine in the treatment of infectious and inflammatory disorders. Sesquiterpene hydrocarbons constitute approximately 80% of the oleoresins, representing an oleoresin fraction of great importance. Studies on analytical methods capable of quantifying volatiles in oleoresin are still scarce. Thus, it was proposed to develop and validate an analytical method by gas chromatography with flame ionization detector (FID) for the analysis of volatile compounds present in the oleoresins and leaves of *Copaifera* sp. and evaluation of the antimicrobial activity of volatile compounds in mixture and isolated. For this purpose, the volatile oils were obtained by hydrodistillation of the oleoresins of *Copaifera langsdorffii* Desff; *C. duckey* Dewey; *C. multijuga* Hayne; *C. paupera* (Herzog) Dewey; *C. reticulata* Ducke and *C. Publifora* Benth. The volatile oils of *C. multijuga*, *C. paupera* and *C. publifora* were submitted to the automatic distiller (800 Automatic Micro Spinning Band Distillation) for the fractionation of the major volatile compounds. The compounds were isolated by means of open column chromatography loaded with silica gel and were identified by GC/MS and by ^1H and ^{13}C NMR. The sesquiterpenes α -cubebene, β -elemene, δ -cadinene, β -caryophyllene, α -humulene and O-caryophyllene were isolated. The analytical method was evaluated for selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness parameters and was adequate for quantification of the sesquiterpenes in the oleoresins of the different *Copaifera* species studied. The analytical method was also used in the seasonality study, which was performed on the leaves of *C. langsdorffii*, allowing to identify three sesquiterpene constituents, being β -caryophyllene, β -elemene, and germacrene D with present in higher contents. In the seasonal analysis of these compounds, germacrene D was the compound that most varied during the evaluated period with variation up to 63%. The antimicrobial potential of isolated sesquiterpenes and oleoresins were also evaluated. The volatile oils of *C. paupera*, *C. duckey* and *C. langsdorffii* presented low and moderate activity against *S. aureus*, showing bactericidal effect at concentrations of 500, 500, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The same volatile oils had a similar effect against *S. choleraesuis* strains, but only with a bacteriostatic effect. The volatile oils of *C. duckey* and *C. langsdorffii* showed high activity against *C. glabrata*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. None of the isolated sesquiterpene constituents was active against bacteria and yeasts because they presented activity at a concentration higher than 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Keywords: Gas chromatography; *Copaifera*; Antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição do gênero <i>Copaifera</i>	4
Figura 2.	Sesquiterpenos e diterpenos comuns a óleorresina da copaíba.....	7
Figura 3.	Numeração e estereoquímica comuns aos esqueletos diterpênicos.....	8
Figura 4.	Biossíntese de terpenos.....	10
Figura 5.	Colunas cromatográficas utilizadas no processo de purificação.....	20
Figura 6.	Esquema de purificação do composto CM1 a partir do óleo de <i>Copaifera multijuga</i>	21
Figura 7.	Esquema de purificação do composto CM2 a partir do óleo de <i>Copaifera multijuga</i>	22
Figura 8.	Esquema de purificação do composto CB1 a partir do óleo de <i>Copaifera pubiflora</i>	23
Figura 9.	Esquema de purificação do composto CP1 a partir do óleo de <i>Copaifera paupera</i>	24
Figura 10.	Esquema de purificação do composto CP2 e CP3 a partir do óleo de <i>Copaifera paupera</i>	25
Figura 11.	Estrutura da benzofenona.....	26
Figura 12.	Esquema de diluições para a construção da curva analítica.....	27
Figura 13.	Fórmula matemática utilizada para obtenção do efeito de cada fator no Design Experimental de Plackett-Burman.....	30
Figura 14.	Localização da <i>C. langsdorffii</i> ao lado do Laboratório de Farmacognosia.....	30

Figura 15.	<i>C. langsdorffii</i> utilizada neste estudo e suas folhas.....	31
Figura 16.	Processo de esgotamento do material vegetal por sohxlet.....	32
Figura 17.	Perfil do óleo das espécies de <i>Copaifera</i> por CG – DIC.....	37
Figura 18.	Destilador de Bancada 800 <i>Automatic Micro Spinning Band Distillation</i>	41
Figura 19.	Comparação entre os CCDs das frações 7 (A) e 8 (B) de <i>Copaifera multijulga</i>	42
Figura 20.	Cromatogramas dos compostos CM1 (A) e CM2 (B) Obtidos do óleo de <i>Copaifera multijulga</i>	43
Figura 21.	Cromatogramas dos compostos CP1 (A), CP2 (B) e CP3 (C) Obtidos do óleo de <i>Copaifera paupera</i>	44
Figura 22.	Cromatograma do composto CB1 Obtido do óleo de <i>Copaifera pubiflora</i>	44
Figura 23.	Estrutura do β -cariofileno.....	45
Figura 24.	Espectro de massas do composto CM1.....	46
Figura 25.	Espectro de RMN ^1H do composto CM1 em CDCl_3	47
Figura 26.	Espectro de RMN ^{13}C do composto CM1 em CDCl_3	48
Figura 27.	Estrutura do α -humuleno.....	49
Figura 28.	Espectro de massas do composto CM2.....	50
Figura 29.	Espectro de RMN ^1H do composto CM2 em CDCl_3	51
Figura 30.	Espectro de RMN ^{13}C do composto CM2 em CDCl_3	52

Figura 31.	Estrutura do α -copaeno.....	53
Figura 32.	Espectro de massas do composto CP1.....	54
Figura 33.	Espectro de RMN ^1H do composto CP1 em CDCl_3	55
Figura 34.	Espectro de RMN ^{13}C do composto CP1 em CDCl_3	56
Figura 35.	Estrutura do δ -cadineno.....	57
Figura 36.	Espectro de massas do composto CP2.....	58
Figura 37.	Espectro de RMN ^1H do composto CP2 em CDCl_3	59
Figura 38.	Espectro de RMN ^{13}C do composto CP2 em CDCl_3	60
Figura 39.	Estrutura do Óxido de cariofileno.....	61
Figura 40.	Espectro de massas do composto CP3.....	62
Figura 41.	Espectro de RMN ^1H do composto CP3 em CDCl_3	63
Figura 42.	Espectro de RMN ^{13}C do composto CP3 em CDCl_3	64
Figura 43.	Estrutura do β -elemeno.....	65
Figura 44.	Espectro de massas do composto CB1.....	66
Figura 45.	Espectro de RMN ^1H do composto CB1 em CDCl_3	67
Figura 46.	Espectro de RMN ^{13}C do composto CB1 em CDCl_3	68
Figura 47.	Curvas analíticas para α -copaeno, β -elemeno, δ -cadineno, β -cariofileno, α -humuleno e O-cariofileno.....	73
Figura 48.	Compostos voláteis identificados nas folhas de <i>C. langsdorffii</i>	81

Figura 49.	Perfis cromatográficos dos extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>C. langsdorffii</i> obtidos para o estudo sazonal.....	82
Figura 50.	Concentração relativa dos compostos voláteis das folhas de <i>C. langsdorffii</i>	83
Figura 51.	Matriz das folhas <i>Copaifera langsdorffii</i> após extração em aparelho de Soxhlet.....	84
Figura 52.	Curva analítica do tetrametilbenzeno.....	85
Figura 53.	Estrutura do tetrametilbenzeno.....	85
Figura 54.	CIM e CBM dos óleos de copaíba frente a <i>S. aureus</i>	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Parâmetros utilizados na destilação dos óleos de <i>Copaifera multijulga</i> , <i>Copaifera paupera</i> e <i>Copaifera pubiflora</i>	19
Tabela 2.	Equações utilizadas para avaliar a seletividade.....	27
Tabela 3.	Fatores e níveis investigados no teste de robustez considerando CG-DIC.....	29
Tabela 4.	Planejamento fatorial para sete fatores e oito experimentos, CG-DIC.....	29
Tabela 5.	Rendimento das frações voláteis obtidas por hidrodestilação.....	35
Tabela 6.	Composição dos componentes voláteis das oleorresinas das espécies de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desff, <i>C. duckey</i> Dewer, <i>C. multijuga</i> Hayne, <i>C. paupera</i> (Herzog) Dewer, <i>C. reticulata</i> Ducke e <i>C. publiflora</i> Benth, obtidas por análises de CG-MS.....	39
Tabela 7.	Respostas que compõem a seletividade do método (n = 5).....	69
Tabela 8.	Dados obtidos para construção da curva analítica de α -copaeno, β -Cariofileno e α -humuleno (n=5).....	70
Tabela 9.	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) (n = 5).....	71
Tabela 10.	Precisão do método analítico (n=5).....	74
Tabela 11.	Resultados obtidos nos estudos de exatidão dos sesquiterpenos.....	75
Tabela 12.	Resultados obtidos nos estudos de recuperação dos sesquiterpenos nos óleos.....	76
Tabela 13.	Valores numéricos obtidos em função dos parâmetros de variabilidade.....	78
Tabela 14.	Constituintes voláteis das folhas de <i>C. langsdorffii</i>	81

Tabela 15.	Resultados obtidos nos estudos de recuperação.....	84
Tabela 16.	Dados obtidos para o padrão secundário (Tetrametilbenzeno).....	85
Tabela 17.	Valores da concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial e dos sesquiterpenos frente a bactérias <i>gram</i> positivas e <i>gram</i> negativas.....	87
Tabela 18.	Valores da concentração bactericida mínima (CBM) em $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial e dos sesquiterpenos frente a bactérias <i>gram</i> positivas e <i>gram</i> negativas.....	88
Tabela 19.	Valores da concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial e dos sesquiterpenos frente a leveduras.....	89
Tabela 20.	Valores da concentração bactericida mínima (CBM) em $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial e dos sesquiterpenos frente a leveduras.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A.R.	Área Relativa
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCL ₃	Clorofórmio Deuterado
CG	Cromatografia Gasosa
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<i>D</i>	Dupleto
d.i.	Diâmetro interno
DIC	Detector de ionização por chamas
<i>Dd</i>	Duplo dupleto
EM	Espectrometria de Massas
Hex	Hexano
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m/z</i>	Razão massa carga
Pi	Padrão interno
Ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xviii
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Plantas medicinais.....	3
1.2 O gênero <i>Copaifera</i>	4
1.3 Óleos essenciais.....	9
1.4 Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama.....	11
1.5 Desenvolvimento e validação de método analítico.....	12
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Estudo fitoquímico.....	17
3.1.1 Obtenção das oleorresinas.....	17
3.1.2 Obtenção da fração volátil das oleorresinas.....	17
3.1.3 Condições cromatográficas.....	18
3.1.4 Fracionamento dos óleos de <i>Copaifera</i>	18
3.1.5 Isolamento dos compostos presentes nos óleos fracionados de <i>Copaifera</i>	20
3.1.6 Identificação estrutural das substâncias isoladas.....	25
3.2 Desenvolvimento e validação de método analítico por CG-DIC.....	26
3.3 Análise sazonal da composição dos componentes voláteis das folhas de <i>C. langsdorffii</i>	30
3.3.1 Coleta, secagem e moagem das folhas de <i>C. langsdorffii</i>	30
3.3.2 Preparação da amostra e análise por cromatografia gasosa.....	31
3.3.3 Estudo de recuperação do cariofileno nas folhas de <i>C. langsdorffii</i>	31
3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	32
3.4.1 Avaliação da atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas....	32
3.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana contra leveduras.....	33

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Obtenção das frações voláteis: rendimento, análise e identificação.....	35
4.2 Perfil cromatográfico dos óleos de <i>Copaífera</i> por CG – EM.....	38
4.3 Fracionamento da fração volátil das oleorresinas.....	40
4.4 Purificação dos compostos por cromatografia em coluna.....	42
4.5 Identificação estrutural dos compostos isolados.....	45
4.5.1 Identificação estrutural do composto CM1.....	45
4.5.2 Identificação estrutural do composto CM2.....	49
4.5.3 Identificação estrutural do composto CP1.....	53
4.5.4 Identificação estrutural do composto CP2.....	57
4.5.5 Identificação estrutural do composto CP3.....	61
4.5.6 Identificação estrutural do composto CB1.....	65
4.6 Desenvolvimento e validação de método analítico.....	69
4.6.1 Seletividade.....	69
4.6.2 Linearidade.....	70
4.6.3 Precisão.....	74
4.6.4 Recuperação e Exatidão.....	75
4.6.5 Robustez.....	78
4.7 Sazonalidade da composição dos voláteis das folhas de <i>C. langsdorffii</i>	80
4.8 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	86
4.8.1 Avaliação da atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas....	86
4.8.2 Avaliação da atividade antimicrobiana contra leveduras.....	89
5 CONCLUSÕES.....	91
6 REFERÊNCIAS.....	92

1.INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais são utilizadas pelo homem desde o início de sua história e, muito antes do surgimento da escrita, a humanidade já utilizava ervas para fins medicinais. Dessa forma, o uso terapêutico de produtos de origem natural constitui-se uma prática milenar, construída historicamente na sabedoria que envolve cultura e saúde (TOSCANO RICO, 2011). Frequentemente, a população dos países subdesenvolvidos ainda depende fortemente de plantas medicinais por razões espirituais, culturais ou econômicas (QUIROZ *et al.*, 2014).

O avanço expressivo da ciência e da tecnologia e a extensa pesquisa sobre diferentes espécies de plantas e seus princípios terapêuticos levaram a uma reavaliação do uso de plantas medicinais, que passaram a ter seu valor cada vez mais reconhecido, possibilitando diversos estudos como atividade biológica e toxicidade (GU, WANG, LONG, *et al.*, 2014).

À medida que mais pessoas se tornam conscientes da potência e dos efeitos adversos de drogas sintéticas, há cada vez mais interesse em medicamentos naturais com diversas estruturas químicas e bioatividade contra diferentes doenças (BOER, LAMXAY, BJORK, 2012). Tipicamente, muitos desses compostos naturais são metabólitos secundários de plantas farmacologicamente úteis (ABE, OHTANI, 2013). Esses metabólitos secundários não só são considerados fontes diretas de novos produtos farmacêuticos, mas também fornecem oportunidades ilimitadas para novas pistas de novos fármacos por causa de sua grande diversidade química. Portanto, a busca de compostos farmacologicamente ativos de plantas medicinais seria ideal em termos de eficiência, segurança, e economia (LONG, 2013).

Apesar da crescente demanda dos medicamentos oriundos de plantas medicinais, são necessários estudos a fim de se comprovarem a eficácia e segurança no uso de plantas. Estudos mostram que um grande número de plantas medicinais clinicamente úteis podem ser altamente tóxicas se usadas incorretamente, decorrente do uso de espécies de plantas com aparências semelhantes, adulterantes ou consumo de espécies desconhecidas. Muitas plantas ainda são utilizadas com base somente no saber popular, as quais são reconhecidas pelos efeitos curativos que produzem, apesar do desconhecimento dos constituintes químicos presentes nos mesmos (LIN *et al.*, 2015).

A comercialização de fitoterápicos e a possibilidade de exportação destes produtos são afetadas pela falta de certificação de eficácia, segurança e qualidade, parâmetros estes que devem ser prioritariamente analisados segundo métodos modernos, os quais são

imprescindíveis para produção de medicamentos (PINTO *et al.*, 2002; BARNES, *et al.*, 2003).

Dessa forma, há a necessidade de se realizarem pesquisas sobre plantas medicinais com o intuito de se descobrirem compostos químicos farmacologicamente ativos que possam ter aplicações terapêuticas importantes, bem como corroborar e dar segurança ao uso popular das plantas medicinais.

1.2 O gênero *Copaifera*

O gênero *Copaifera* pertencente à família Leguminosae (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002), o qual possui árvores frondosas, sendo encontradas facilmente nas regiões Amazônica e Centro-oeste do Brasil. Entre as espécies mais abundantes, destacam-se: *C. officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador), *C. guianensis* Desf. (Guianas), *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazônia), *C. confertiflora* Bth (Piauí), *C. langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguai), *C. coriacea* Mart. (Bahia), *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (ANDRADE *et al.*, 2000). A distribuição das espécies de Copaíba podem ser observadas na figura 1, sendo representadas pela área em verde.

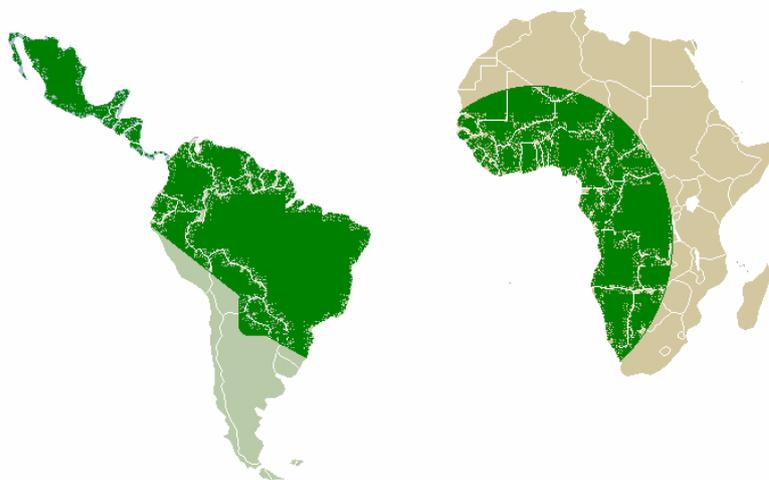


Figura 1. Distribuição do gênero *Copaifera*
Fonte: VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002

As copaibeiras se adaptam a uma grande variedade de ambientes, ocorrendo em florestas de terra firme, matas de transição, capoeiras, campos, campinaranas, em áreas alagadas e/ou nas margens de lagos e igarapés, bem como em dunas (MARTINS-DASILVA *et al.*, 2008). São encontradas tanto em solos arenosos como argilosos (ALENCAR, 1982), areno-argilosos, pedregosos ou rochosos e salinos do litoral (PLOWDEN, 2004).

A origem do nome copaíba pode ser atribuída ao tupi “cupa-yba”, a árvore de depósito, ou que tem jazida, em alusão clara ao óleo que guarda em seu interior. A casca é lisa, persistente, de coloração cinza a cinza-avermelhada, com estrias verticais e superficiais. O tronco é áspero de coloração escura. A forma do fuste geralmente é cônica, mas podem ocorrer fustes cilíndricos e os troncos podem apresentar sapopemas discretas. A copa é geralmente circular e irregular (DWYER, 1954; ALENCAR, 1981; VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002; BRUM *et al.*, 2007).

As folhas são compostas, alternadas, pecioladas, medindo de 12 a 23 cm, com 8-20 folíolos elípticos e alternos (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002; BRUM *et al.*, 2009). As flores são brancas, pequenas, apétalas, hermafroditas e arrançadas em panículos axilares (CLEMENT *et al.*, 1999). A polinização é realizada por abelhas, como *Trigona sp.* e *Apis mellifera* (RIGAMONTE-AZEVEDO *et al.*, 2004). A floração e frutificação das copaibas normalmente ocorrem a partir dos cinco anos de idade, mas a época de floração e frutificação não é uniforme entre as diferentes regiões ou espécies de copaíba (SANTOS, 1979). Os frutos são legumes que possuem formato globóide, contêm uma semente envolvida por um arilo abundante e colorido, o qual envolve mais da metade da semente com peso médio de 8,5 g. Inicialmente de coloração amarela a vermelha, tornando-se marrom-escuro com a maturação. (CAMARGO *et al.*, 2008; BRUM *et al.*, 2009). As sementes têm coloração preta, opaca e de consistência firme e peso médio de 1,8 g. Geralmente, há uma semente por fruto, mas já foram encontradas até três sementes em um fruto (CAMARGO *et al.*, 2008).

Espécies deste gênero produzem uma oleorresina com propriedades farmacológicas comprovadas. A oleorresina da *Copaifera* é um exsudato constituído por ácidos resinosos e compostos voláteis (LEANDRO *et al.*, 2012). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estima-se que no ano de 2010 foram comercializadas cerca de 580 toneladas de oleorresina, o que representou movimentação na economia da ordem de R\$ 1,5 bilhão, considerando-se apenas a produção de três estados da região amazônica do Brasil, sendo que a Amazônia respondeu por 90% desse total, dos quais grande parte foi exportada (IBGE, 2010).

A oleorresina pode ser classificada quanto a sua coloração, turbidez e viscosidade. Suas características físicas variam de transparente a opaco, mais ou menos viscoso, de coloração que varia do amarelo ao vermelho, podendo ser incolor. É insolúvel em água e parcialmente solúvel em álcool. Quando exposto ao ar, a oleorresina escurece e se torna mais viscosa. Apesar da ampla variação de suas características físicas, a oleorresina é um dos

produtos mais procurados pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (CASCON & GILBERT, 2000).

O óleo de copaíba pode ser encontrado em mercados populares, sendo conhecido por diferentes denominações. Dentre os produtos naturais que se destacam no país, o óleo de copaíba tem uma grande representação social e econômica, especialmente na região Amazônica onde é amplamente utilizado (VALDEVITE, 2007). O óleo de copaíba possui um grande valor comercial pois é uma matéria-prima importante na indústria de perfumes, de cosméticos, além de ser utilizado na manufatura de xampus, condicionadores e cremes para o cabelo. A casca da copaíba também encontra aplicações na tintura caseira (KAO CORPORATION, 2002).

O óleo de copaíba comercializado sem controle sofre constantes adulterações, sendo que as mais comuns são com óleos graxos e o álcool etílico. É possível encontrar, ainda, adição de água ou gordura animal, ou impurezas como cascas, cinzas e terra, as quais afetam a aparência e conteúdo do produto, ou ainda alterações causadas pela armazenagem inadequada em recipientes plásticos ou exposição à luz solar (LEANDRO *et al.*, 2012).

A oleorresina é comercializada pelas propriedades farmacológicas que possui, sendo que muitas dessas já foram comprovadas por estudos científicos desenvolvidos por diversos grupos de pesquisa. As propriedades anti-inflamatória e antitumoral *in vitro* e *in vivo* e antimicrobiana são claramente evidenciadas para diversas espécies de *Copaifera* (GOMES *et al.*, 2010; DOS SANTOS *et al.*, 2008). As atividades biológicas da oleorresina, em sua grande maioria, podem ser atribuídas aos mono-, sesqui- e diterpenos que são os principais constituintes químicos da oleorresina (CASCÓN E GILBERT, 2000; GELMINI *et al.*, 2013).

Quimicamente, o gênero *Copaifera* destaca-se por apresentar uma enorme diversidade de metabólitos secundários. Estudos realizados com o óleo de copaibeiras revelam em sua grande maioria a presença de sesquiterpenos e diterpenos (SOUSA, 2011). Dentre os diterpenos já descritos na literatura, todos pertencem aos esqueletos caurano, labdano e clerodano. (CASCÓN; GILBERT, 2000).

Craveiro e colaboradores (1981) descreveram a composição do óleo volátil obtido a partir da oleorresina de *Copaifera* sp., na qual os principais sesquiterpenos identificados foram o β -cariofileno, α -humuleno, β -bisaboleno, α -cubebeno, α -muuroleno, α -copaeno, trans- β -farneseno, δ -cadineno e α -bergamoteno (CRAVEIRO *et al.*, 1981). Outros sesquiterpenos relatados com frequência nas oleorresinas de copaíba são o óxido de cariofileno, α -selineno, β -selineno, β -elemeno, δ -elemeno, β -copaeno e β -humuleno. (ZOGHBI *et al.*, 2007).

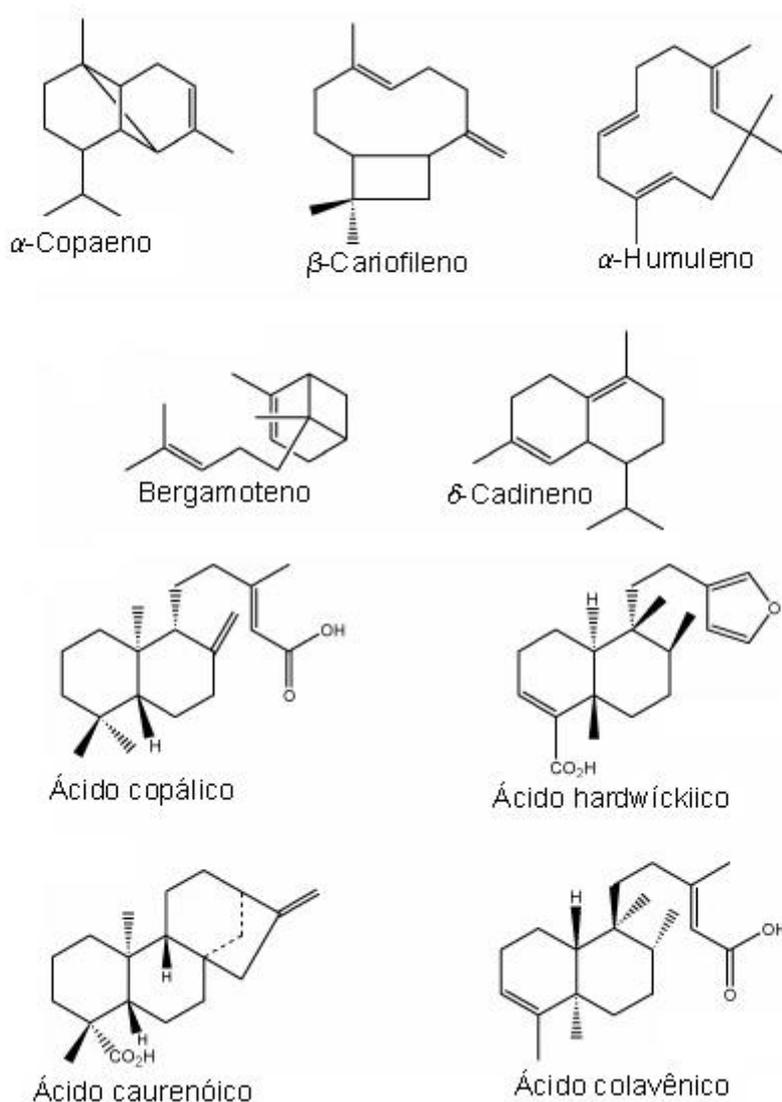


Figura 2. Sesquiterpenos e diterpenos comuns a óleorresina da copaíba

Entre os sesquiterpenos, o β -cariofileno e seu óxido são comumente encontrados em oleorresinas de copaíba e em óleos de muitas outras espécies de plantas (TUNG *et al.*, 2008; CHAVAN *et al.*, 2010). O β -cariofileno é considerado como um dos compostos mais importantes por ser majoritário nas oleorresinas de copaíba e por possuir propriedades biológicas importantes. Este composto pode se oxidar quando exposto ao ar, uma característica dos sesquiterpenos insaturados. Além disso, o β -cariofileno já foi descrito como um composto volátil emitido pelas plantas na atmosfera em resposta ao ataque de herbívoros (SABULAL *et al.*, 2006).

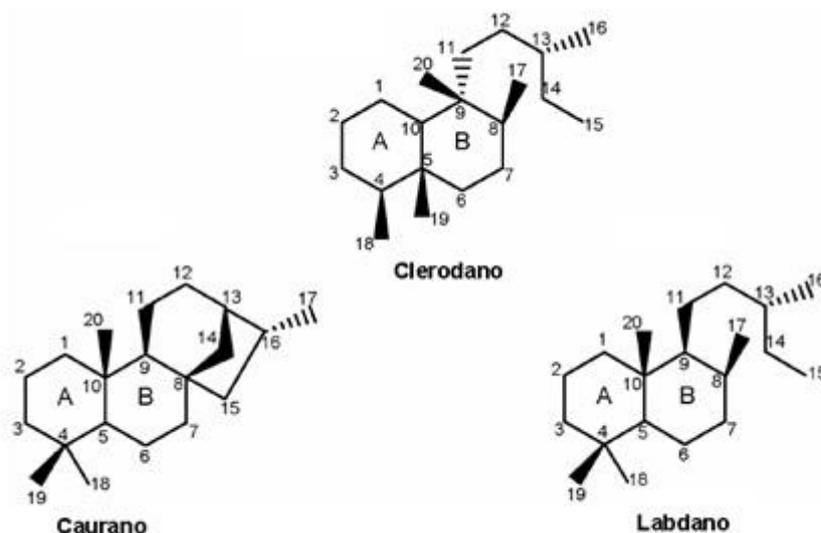


Figura 3. Numeração e estereoquímica comuns aos esqueletos diterpênicos: caurano, clerodano e labdano. Sistema decalínico representado pelos anéis A e B.

Além dos sesquiterpenos, já são conhecidos quinze diterpenos além daqueles já descritos na revisão feita por Veiga-Junior & Pinto (2002), sendo quatro diterpenos com esqueletos do tipo caurano: ent-caura-16-eno, ent-caura-16-eno-19-al, ent-caura-16-eno-19-ole 19-nor-caura-16-eno-4 α -ol (GRAMOSA, 2001; GRAMOSA *et al.*, 2010); três diterpenos com esqueleto do tipo clerodano: ácido clerodano-15,18-dióico (PINTO *et al.*, 2000), ácido 7 α -acetóxi-hardwíckiico (SPANVELLO & VILA, 1994) e 7 α -acetoxibacchotricuneatina D (MONTI *et al.*, 1996); e oito diterpenos com esqueleto do tipo labdano: ent-4-epi-agático (GRAMOSA *et al.*, 2010), ácido 3-hidróxi-copálico (MAHAJAN & FERREIRA, 1971), ácido 3-acetóxi-copálico (CASCON & GILBERT, 2000), 14, 15-dinorlabdana-8(17)-eno-13-ona (TINCUSI *et al.*, 2002), (-)-3- β -hidróxi-15,16-dinorlabda-8(17)-eno-13-ona (MONTI *et al.*, 1996), (-)-15,16-dinorlabda-8(17)-eno-3 β ,13-diol (MONTI *et al.*, 1999) e (-)-13(R)-14,15-dinorlabda-8(17)-eno-3,13-diol (ROMERO, 2007; ROMERO *et al.*, 2009) e o pauperol (TINCUSI *et al.*, 2002).

Nos diterpenos destacam-se: entre os cauranos os ácidos 19-ent-cauranóico e 19-ent-caurenóico; entre os clerodanos os ácidos hardwíckiico, 7-hidróxi-hardwíckiico e 7-acetóxi-hardwíckiico; e entre os labdanos os ácidos copálico, poliáltico e ent-agático.

1.3 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são alvos de diversos estudos e despertam grande interesse econômico, principalmente por suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, sendo utilizados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, por sua função aromática e também por suas propriedades biológicas. Estudos têm demonstrando a importância de substâncias antioxidante, visto que estas possuem papel importante sobre radicais livres e outros oxidantes que atuam no desenvolvimento de doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, além de doenças cardiovasculares, atividade anticâncer, e efeito no sistema imune (AMIRI *et al.*, 2017).

Óleos essenciais são compostos líquidos voláteis, aromáticos, também chamados de etéreos por serem solúveis em solventes orgânicos apolares como o éter. Em contato com a água apresentam pouca solubilidade, porém o suficiente para aromatizar a solução, os chamados hidrolatos (SIMÕES *et al.*, 2010). Os óleos essenciais são misturas complexas de baixo peso molecular e seus compostos são geralmente obtidos utilizando métodos como hidrodestilação, destilação a vapor ou extração com solventes e são obtidos de diversas partes da planta, pois as estruturas especializadas na produção desses óleos distribuem-se em diferentes órgãos (BIASI E DESCHAMPS, 2009).

Alguns fatores são determinantes na sua composição química, como sazonalidade, fase de desenvolvimento da planta, secagem pós-colheita, localização geográfica, características do solo, partes da planta, métodos de extração e tempo de extração, entre outros (RAVINDRA; KULKARNI, 2015). A produção de óleo pode estar associada à sobrevivência do vegetal em seu habitat, realizando papel fundamental na defesa contra micro-organismos e predadores, atração de insetos e outros agentes polinizadores (HARREWIJN *et al.*, 2012). Seus componentes incluem, principalmente, duas classes de metabólitos secundários de diferentes origens biossintéticas, o dos terpenos, principal grupo, e o dos fenilpropanóides (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

Os terpenos constituem uma classe de substâncias formadas a partir da condensação de unidades de isopreno (C_5H_{10}) e são classificados de acordo com o número destas unidades. Os principais terpenos são os monoterpenos (C_{10}); sesquiterpenos (C_{15}); diterpenos (C_{20}); triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) (UMLAUF *et al.*, 2004).

Estes compostos são metabólitos secundários, formados a partir do Pirofosfato de Isopentenilo (IPP) e Pirofosfato de Dimetilalilo (DMAPP). A biossíntese do IPP/DMAPP pode ocorrer através de duas rotas diferentes. Uma é oriunda da via do mevalonato (MVA),

que se forma a partir do ácido acético. A segunda é formada a partir do piruvato e do gliceraldeído-3-fosfato, através da rota do metileritritol-4-fosfato (MEP) (DEGENHARDT *et al.*, 2003; UMLAUF *et al.*, 2004) Como pode ser observado na Figura 4.

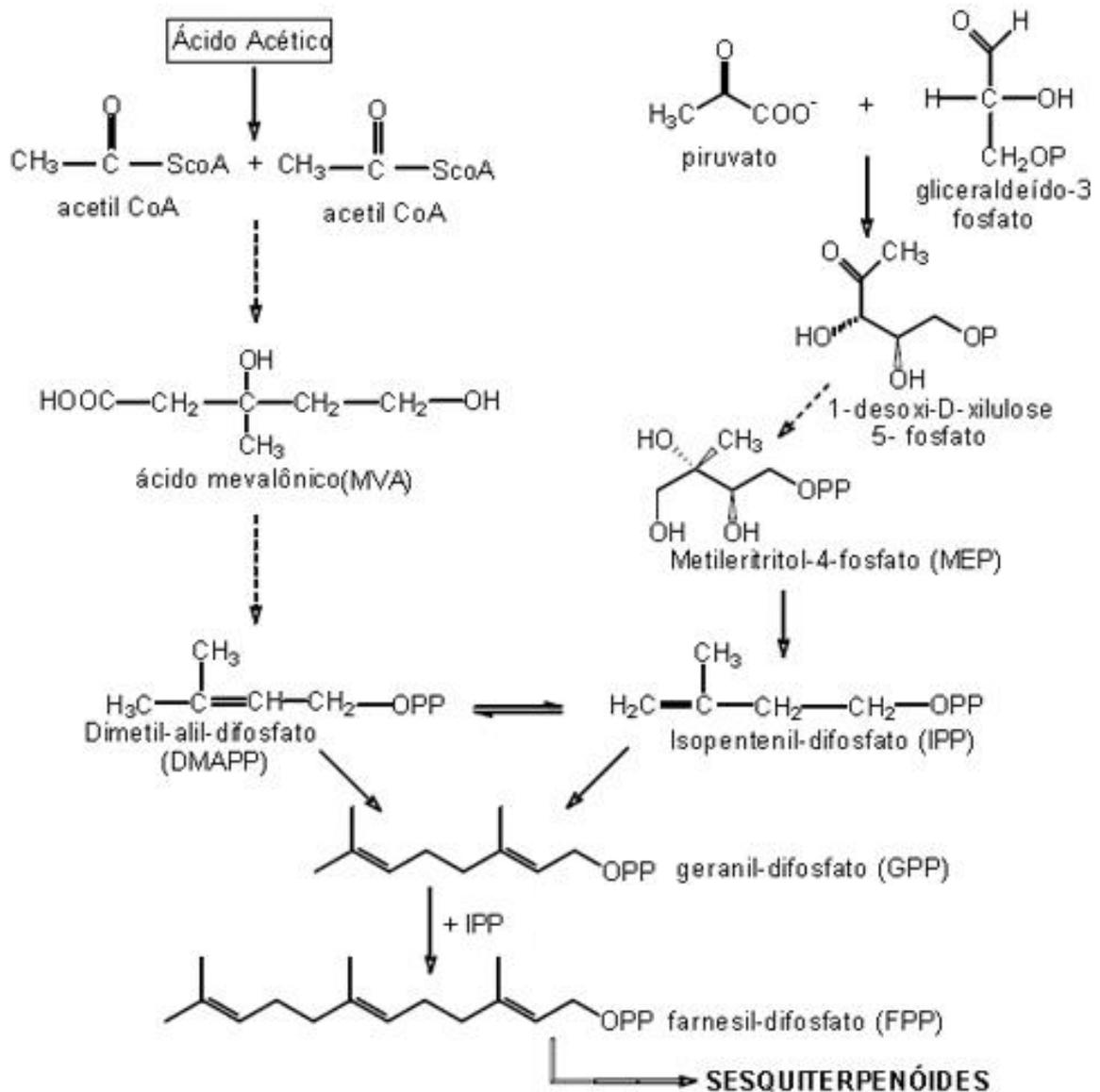


Figura 4. Biossíntese de terpenos
Fonte: Adaptado de Taiz e Zeiger, 2004

Nas plantas, a rota oriunda do metileritritol-4-fosfato (MEP) parece estar geralmente envolvida na formação de hemiterpenoides, monoterpenoides, diterpenoides e carotenoides. Os sesquiterpenoides e triterpenoides, por outro lado, seriam formados pela via do ácido mevalônico (MVA), ou a partir da combinação de ambas as rotas (UMLAUF *et al.*, 2004).

Os sesquiterpenoides formam um grande grupo de produtos naturais, os quais podem ser encontrados em plantas, micro-organismos e em alguns organismos marinhos. Nas plantas, estes constituintes possuem uma função ecológica muito importante, agindo na interação com insetos e micróbios. Além disso, são componentes de muitos óleos essenciais, os quais são largamente utilizados na indústria como flavorizantes e aromatizantes (PROSSER *et al.*, 2002).

Os esqueletos sesquiterpênicos são predominantemente formados a partir de substratos simples: o farnesil difosfato (FPP) ou o nerolidil difosfato (NPP) (PROSSER *et al.*, 2002). A partir do FPP, ocorre uma série de reações enzimáticas, promovendo ciclizações, eliminações e subsequentes rearranjos na molécula, originando vários intermediários importantes que são os responsáveis pela formação dos diferentes esqueletos sesquiterpenoides. A partir da ciclização do FPP, também podem formar-se os derivados de esqueleto bisabolano, humulano e cariofilano (CAI *et al.*, 2002; PROSSER *et al.*, 2002).

1.4 Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama

Técnicas cromatográficas são conhecidas como potentes ferramentas de análise em vários campos da química e representa o mais relevante conjunto de técnicas analíticas disponíveis atualmente para análise de substâncias químicas. A cromatografia permite separar e quantificar componentes com características físico-químicas muito semelhantes e tem grande aplicabilidade em áreas tão diversas como ambiental, farmacêutica, análises clínicas, medicina legal e outras (LUONG *et al.*, 2013).

A cromatografia gasosa é uma das mais importantes técnicas analíticas disponíveis atualmente, sendo a principal técnica para separação e determinação de compostos voláteis e/ou volatilizáveis (LI, WANG, HE, 2015). O poder de resolução excelente alcançado permite a determinação de dezenas de compostos diferentes em matrizes complexas. A separação bem sucedida de uma mistura de múltiplos componentes é possível no caso de uma combinação otimizada entre a seletividade da coluna, eficiência e velocidade (PATRUSHEV, 2015).

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica consolidada para a análise de misturas que contêm compostos voláteis e semivoláteis, sendo que seu uso está amplamente difundido nos laboratórios de pesquisas das mais diversas áreas, como petroquímica, fragrâncias, farmacêutica e ambiental. Os detectores mais empregados em CG são o detector de ionização em chama (DIC), o detector de condutividade térmica, o detector de captura de elétrons e o espectrômetro de massas (EM) (SEQUINEL *et al.*, 2010).

Os detectores usados devem preencher certos requisitos como constante de tempo menor do que 10 min e a taxa de aquisição dos dados deve ser de 100 Hz para que possam ser empregados sem comprometer a separação cromatográfica ou a informação analítica. Alguns detectores, como os DIC e o EM com analisador por tempo de voo (TOF, time of flight - TOFMS), podem ser usados sem que nenhuma modificação seja feita. Com respeito aos detectores usados em CG, os mais usados são o DIC e o EM. O DIC apresenta taxa de aquisição de até 200 Hz, faixa dinâmica de aproximadamente 10^6 , limite de detecção de unidades de pg de carbono 1/s, além da robustez e fácil operação (MATISOVÀ *et al.* 2003).

O DIC é bastante popular devido aos seus níveis de detectabilidade e resposta quase universal. O gás de arraste chega ao detector e uma chama produzida pela combustão de ar e hidrogênio, presente no detector queima e ioniza alguma das moléculas presentes nessa corrente gasosa, gerando íons que produzem uma corrente da ordem de 10-14 A, registrada como a linha de base. Quando moléculas da amostra presentes no gás de arraste chegam ao detector, elas são queimadas, ocorrendo a formação de íons que são coletados por um eletrodo. A corrente gerada é convertida em voltagem, amplificada e captada pelo registrador. Dessa forma, o DIC apresenta grande aplicabilidade, alta sensibilidade e estabilidade (PEDROSO, 2011).

1.5 Desenvolvimento e validação de método analítico

Uma vez que a fitoterapia é uma parte regular de tratamento médico, a sua eficácia e segurança devem ser obrigatórias, havendo necessidade de realização de testes farmacológicos, toxicológicos e clínicos. A eficácia e segurança de produtos naturais acabados são diretamente dependentes da qualidade e da composição química da matéria-prima natural. Portanto, se faz necessário, além do perfil químico qualitativo a determinação quantitativa nos perfis fitoquímicos de plantas medicinais. Estas análises são mandatórias para assegurarem-se a segurança e eficácia de medicamentos naturais, as quais estão intrinsecamente ligadas à constância de perfis fitoquímicos (GOVINDARAGHAVAN, SUCHER, 2015).

O desenvolvimento tecnológico de um produto fitoterápico requer estudos prévios tais como: estudos botânicos, agrônômicos, químicos e pesquisas sobre sua atividade biológica, o que o diferencia das plantas medicinais e das preparações utilizadas na medicina popular. No ponto de vista da qualidade, verifica-se que, para garantir um produto uniforme e eficaz é necessário que todos os insumos intermediários (planta in natura, tinturas, extratos secos, etc), bem como o produto final, sejam caracterizados através de seus constituintes químicos, e/ou

atividades farmacológicas (DI STASI, 1996; SIMÕES *et al.*, 2010). Sendo assim, em muitos casos, o produto final pode ser padronizado por meio da quantificação de marcadores, que podem ser compostos químicos característicos de certa espécie, ou compostos presentes em grandes quantidades (BARNES, 2003).

Uma alternativa para a determinação da identidade de um material vegetal, além da identificação botânica é a utilização do *fingerprint* (impressão digital) cromatográfico. O *fingerprint* de um produto natural, mais precisamente de uma planta medicinal, é uma técnica cromatográfica padrão que relaciona características químicas e farmacológicas comuns dos componentes de uma amostra vegetal evidenciando suas semelhanças e diferenças (GONG, *et al.* 2003). Para obtenção dessas informações devem-se considerar fatores relacionados com a separação cromatográfica, com o número e com a concentração dos compostos presentes, fazendo com que haja segurança e confiabilidade nos resultados (OBRADOVIC, *et al.*, 2007).

Um método analítico é caracterizado pelo seu desempenho, cujos parâmetros devem ser avaliados para que possam fornecer os valores de desempenho correto. Estes valores de desempenho devem estar em conformidade com os requisitos previamente definidos que o método analítico deve satisfazer. Todos os procedimentos analíticos exigem algum tipo de validação, independentemente do método. Durante as últimas duas décadas, a validação tem-se tornado tradicional para representar o desempenho de métodos analíticos (GUMUSTAS, OZKAN, 2011).

O termo validação é definido como a avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que este está sob as condições nas quais ele deve ser aplicado. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária preconiza que a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

Com esta finalidade, métodos desenvolvidos utilizando-se técnicas cromatográficas, como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) têm sido largamente utilizados, tanto para o estudo fitoquímico, quanto na química analítica para o controle de qualidade de plantas medicinais, uma vez que proporcionam vantagens como a alta eficiência e rapidez (RIBANI *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou a implementação de um método conhecido envolvem um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório, o qual é denominado de validação (BRITO *et. al.*, 2003). A validação é imprescindível para garantir a confiabilidade dos resultados de um determinado procedimento analítico (PASCHOAL *et. al.*, 2008).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes dois órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos. Na Europa, Estados Unidos e Japão, a ICH (International Conference on Harmonization) e a USP (The United States Pharmacopeia) definem parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para processo de validação. Além destes, a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) e a FDA (Food and Drug Administration) também têm propostos guias sobre validação de métodos. Estes guias e/ou requerimentos, de forma geral, exibem os parâmetros de desempenho a serem seguidos para validação de um método (SHABIR, 2003).

O guia de validação da ANVISA foi escolhido para ser utilizado, pois o gui é aceito comercialmente, sendo assim, o método desenvolvido e validado neste trabalho poderá ser utilizado no controle de qualidade das oleorresinas das diferentes espécies de *Copaífera*.

Os parâmetros analíticos para a validação de métodos, conhecidos também como parâmetros de desempenho analítico são normalmente encontrados como: seletividade, linearidade, precisão, limite de quantificação, limite de detecção, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A Seletividade de um método refere-se à capacidade deste em distinguir um determinado analito presente em uma matriz complexa, sem interferência de outros componentes da mistura. Para tanto, a seletividade deve ser o primeiro passo a ser desenvolvido para validação de um método analítico. A seletividade é baseada nos parâmetros de separação e detecção, sendo que as técnicas cromatográficas hifenadas a detectores seletivos, como o espectômetro de massas, têm sido utilizadas em determinações de alta qualidade. Além disso, em técnicas cromatográficas, outros parâmetros de separação devem ser determinados e otimizados, tais como: resolução, fator de separação, fator de retenção, fator assimetria e número de pratos teóricos (VESSMAN, 2001).

A Linearidade corresponde à capacidade de um método analítico fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância na amostra, dentro de uma faixa de aplicação, sendo obtida pela confecção de curva analítica utilizando padrões interno ou externo (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

A Precisão é a habilidade do método em reproduzir resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (CASS; DEGANI, 2001). Já a exatidão de um método representa a

concordância entre o resultado de um determinado ensaio em relação ao valor de referência aceito como verdadeiro (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A robustez de um método mede a habilidade que este apresenta frente a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando o método é transferido para outros laboratórios sendo executado por diferentes analistas utilizando equipamentos e/ou materiais de consumo fornecidos por diferentes fabricantes (SHABIR, 2003).

Apesar das espécies de *Copaiba* apresentarem várias atividades farmacológicas já comprovadas, ser extensamente utilizada pela medicina popular do Brasil e constituir notável potencial para pesquisas científicas, ainda não foram desenvolvidos e validados procedimentos analíticos suficientes para quantificação dos seus metabolitos voláteis.

2.OBJETIVOS

Tendo em vista a carência de métodos analíticos validados para o estudo de compostos voláteis de *Copaifera sp.* e pelo seu alto potencial medicinal e econômico para o desenvolvimento de novos produtos, os objetivos do presente trabalho foram:

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar método analítico por cromatografia gasosa - Detector por ionização de chama (DIC) para análise de compostos voláteis presentes nas oleorresinas e folhas de *Copaifera sp.* e avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos voláteis em mistura e isolados.

2.2 Objetivos específicos

- Obter os óleos voláteis por meio da hidrodestilação da oleorresina de diferentes espécies de *Copaifera*;
- Fracionar dos compostos voláteis majoritários por meio da utilização do destilador de bancada (800 Automatic Micro Spinning Band Distillation);
- Utilizar cromatografia em coluna aberta com sílica gel e placas preparativas para auxiliar no isolamento e na purificação dos compostos voláteis de interesse;
- Identificar a estrutura das substâncias isoladas por meio da espectrometria de massas (CG/EM) e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C ;
- Desenvolver e validar método por Cromatografia Gasosa - Detector por ionização de chama (DIC), capaz de quantificar os componentes voláteis isolados presentes na oleorresina e no extrato das folhas de *Copaifera*;
- Realizar análise sazonal dos componentes voláteis das folhas de *Copaifera langsdorffii* utilizando-se o método desenvolvido;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos isolados e dos óleos voláteis frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudo fitoquímico

3.1.1 Obtenção das oleorresinas

As oleorresinas das espécies *Copaifera langsdorffii* Desff; *C. duckey* Dewey; *C. multijuga* Hayne; *C. paupera* (Herzog) Dewey; *C. reticulata* Ducke e *C. publiflora* Benth foram coletadas ao longo dos últimos quatro anos do desenvolvimento do projeto temático 2011/13630-7 intitulado: “Validação química e farmacológica de extratos e princípios ativos de espécies de *Copaifera*” por membros do laboratório de farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. A autorização de coleta junto ao SISBIO-ICMBio foi obtida em 2012, enquanto que a autorização de acesso ao patrimônio genético para fins de pesquisa científica foi solicitada ao CNPQ e teve o aval da Pró-Reitoria de pesquisa da USP em janeiro de 2014 (processo nº 010783/2013-0).

O procedimento para as coletas seguiu os principais parâmetros descritos por Medeiros e Vieira (2008). Para tanto, em uma árvore da espécie, com diâmetro acima de 30 cm, foi feita uma perfuração utilizando um perfurador manual (trado) medindo 1,2 m de comprimento e 2 cm de diâmetro. Esta perfuração foi feita cerca de 1 m do solo no centro da árvore. Durante a perfuração, no momento em que o trado atingiu o centro interior do tronco, coletaram-se cerca de 100 mL da amostra. Logo em seguida o orifício foi vedado adequadamente utilizando-se um tampão de madeira. As exsiccatas das espécies de *C. duckey*, *C. multijuga*, *C. paupera*, *C. reticulata*, e *C. publiflora* foram identificadas pela Dra. Silvane Tavares Rodrigues da EMBRAPA de Belém, PA, no qual estão depositadas no herbário (SPFR) da mesma instituição. As exsiccatas da espécie *C. langsdorffii* foram devidamente identificadas pelo Prof. Dr. Milton Groppo Junior do Departamento de Biologia da FFCLRP-USP e depositadas no herbário da mesma instituição.

3.1.2 Obtenção da fração volátil das oleorresinas

As oleorresinas de *Copaifera* são constituídas de uma fração fixa composta por diterpenos e triterpenos e uma fração volátil constituída principalmente por sesquiterpenos. Para obtenção da fração volátil, cerca de 50 g das oleorresinas foram transferidas para um balão de fundo redondo de 1 L, aos quais foram acrescentados mais 500 mL de água destilada. O balão foi acoplado ao aparelho de Clevenger e foi submetido à hidrodestilação até término da destilação dos componentes voláteis. A fração volátil foi recolhida, submetida a

secagem com Na_2SO_4 e armazenada em freezer -20°C em frasco âmbar até a realização do processo de fracionamento.

Após a obtenção dos óleos voláteis, 1 mg de cada amostra foi solubilizado, separadamente em 5 mL de hexano. Desta fração orgânica, 1 μL foi analisado por cromatografia de fase gasosa com detector de ionização por chama (CG-DIC).

3.1.3 Condições cromatográficas

As análises destes constituintes foram realizadas por CG-DIC da marca Hewlett Packard, modelo 6890N plus, equipado com injetor operando no modo split (50:1). Para as análises foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5 % fenil-metil-siloxano)(comprimento: 30 m, diâmetro interno: 0,32 mm, filme líquido: 0,25 μm). O hidrogênio foi usado como gás de arraste. Otimizaram-se as condições cromatográficas visando melhorar a resolução cromatográfica global, uma vez que a matriz é complexa e por esse motivo existe uma grande sobreposição dos metabólitos analisáveis.

A programação de temperatura, a qual foi utilizada para o forno, foi determinada da seguinte forma: iniciou-se com escala de 125°C a 135°C elevando-se a temperatura com proporção de $7^\circ\text{C}/\text{min}$ mantendo-se fixa por 1 minuto; na sequência a temperatura foi de 135 a 137°C de 137 a 139°C e de 139 a 141°C elevando-se a $1^\circ\text{C}/\text{min}$ mantendo-se fixa por 1 minuto. Em seguida, a temperatura foi de 141 a 145°C elevando-se a $1^\circ\text{C}/\text{min}$ mantendo-se fixa por 1 minuto e meio e, após, esta foi de 145 a 280°C a $25^\circ\text{C}/\text{min}$ finalizando a análise com o tempo de 23 min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 240°C e 280°C , respectivamente.

3.1.4 Fracionamento dos óleos de *Copaifera*

Os óleos voláteis das espécies de *C. multijulga*, *C. paupera* e *C. pubiflora* foram submetidos ao destilador de bancada (*800 Automatic Micro Spinning Band Distillation*) visando o fracionamento dos óleos para posterior isolamento dos compostos voláteis majoritários.

As frações obtidas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se cromatoplasmas de sílica gel 60 F 254 (Merck) (5 cm), sendo aplicadas alíquotas de 5 μL das amostras com auxílio de capilares de vidro, no qual foram eluídas com a fase móvel hexano-acetato de etila na proporção 7:3 (v/v) e reveladas com anisalaldeído. Algumas frações foram analisadas também por cromatografia gasosa utilizando o equipamento descrito no item 3.1.3.

Para o fracionamento dos óleos voláteis, utilizou-se um total de 5,00 gramas de óleo. Os melhores parâmetros obtidos no fracionamento seguem descritos na tabela 1. O tempo médio de destilação foi de aproximadamente 120 min. Ambos os óleos tiveram uma recuperação de 92 e 96% quando reunidas todas as frações.

Tabela1. Parametros utilizados na destilação dos óleos de *C. multijuga*, *C. pubiflora* e *C. paupera*

<i>Copaifera multijuga</i>						
Fração	TIC	TFC	Refluxo	Potência	TC	Pressão
1	125	155	06:01	55	7	17
2	155	175	06:01	55	7	17
3	175	195	06:01	55	7	17
4	195	205	06:01	55	7	17
5	205	215	05:01	50	7	17
6	215	225	04:01	45	7	17
7	225	235	04:01	45	7	17
8	235	245	04:01	40	7	17
<i>Copaifera pubiflora</i>						
1	110	130	06:01	65	7	20
2	130	150	06:01	60	7	20
3	150	170	06:01	60	7	20
4	170	190	06:01	60	7	20
5	190	205	05:01	55	7	20
6	205	215	05:01	55	7	20
7	215	225	05:01	55	7	20
8	225	240	05:01	55	7	20
<i>Copaifera paupera</i>						
1	105	125	15:01	80	4	20
2	125	150	15:01	75	4	20
3	150	170	10:01	70	4	20
4	170	200	07:01	70	4	20
5	200	215	07:01	55	4	20
6	215	235	05:01	55	4	20
7	235	255	02:01	40	4	20
8	255	275	01:01	35	4	20

TIC: temperatura inicial de corte em °C; TFC: temperatura final de corte em °C; Potência: em %; TC: temperatura do condensador em °C; Pressão: em mmHg.

3.1.5 Isolamento dos compostos presentes nos óleos fracionados de *Copaifera*

As frações obtidas dos óleos de *C. multijulga*, *C. paupera* e *C. pubiflora* provenientes do destilador de bancada foram submetidas a colunas cromatográficas, visando o isolamento dos compostos a fim de serem utilizados na validação de método analítico. As colunas cromatográficas (Figura 5) foram empacotadas com sílica gel 60H (*Sigma-Aldrich*, porosidade de 40 μm) na proporção de 1:100.

A fase móvel utilizada consistiu em um gradiente de hexano e acetato de etila nas proporções 98:2, 95:5, 90:10 e 50:50 (v/v). A eluição dos compostos foi acompanhada por cromatografia em camada delgada utilizando anisaldeído como revelador, seguido de aquecimento. As frações reunidas foram secadas em rotaevaporador da marca Buchi® com temperatura do banho em 35°C. Os esquemas a seguir demonstram as etapas realizadas no processo de isolamento dos compostos. As figuras 6 a 10 trazem os esquemas de isolamento dos compostos de interesses a partir das frações voláteis obtidas do destilador de bancada.

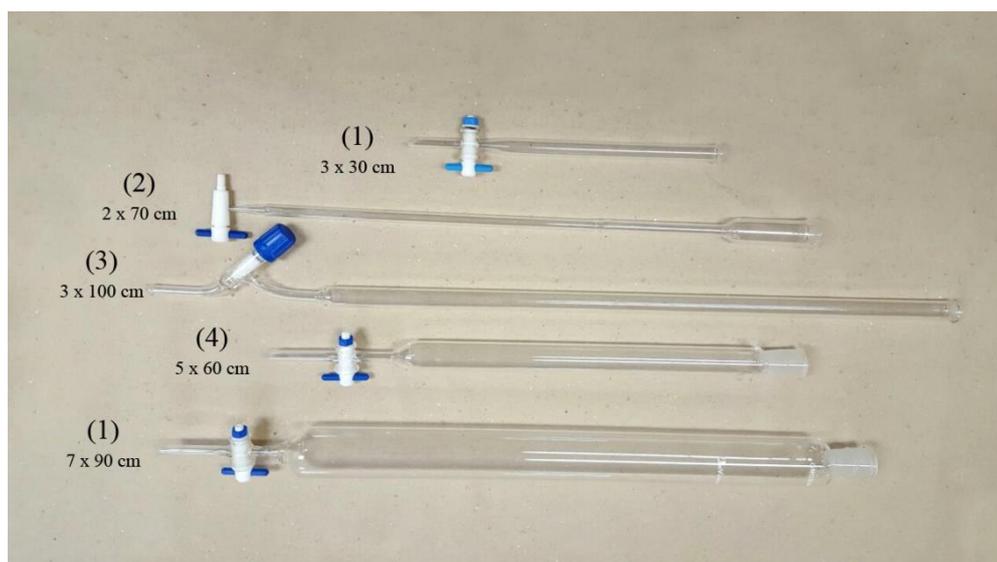


Figura 5. Colunas cromatográficas utilizadas no processo de isolamento.

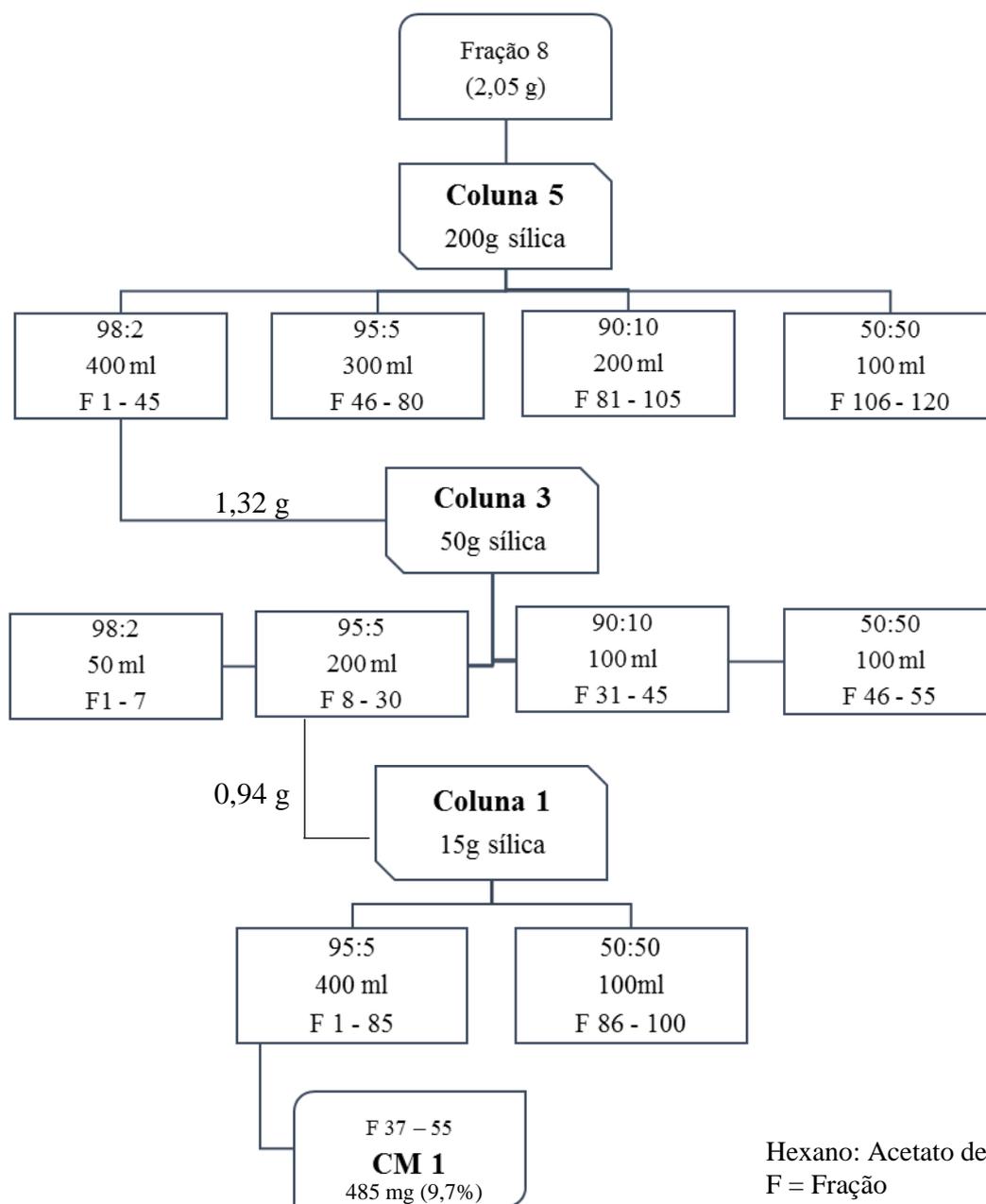


Figura 6. Esquema de isolamento do composto CM1 a partir do óleo de *C. multijuga*

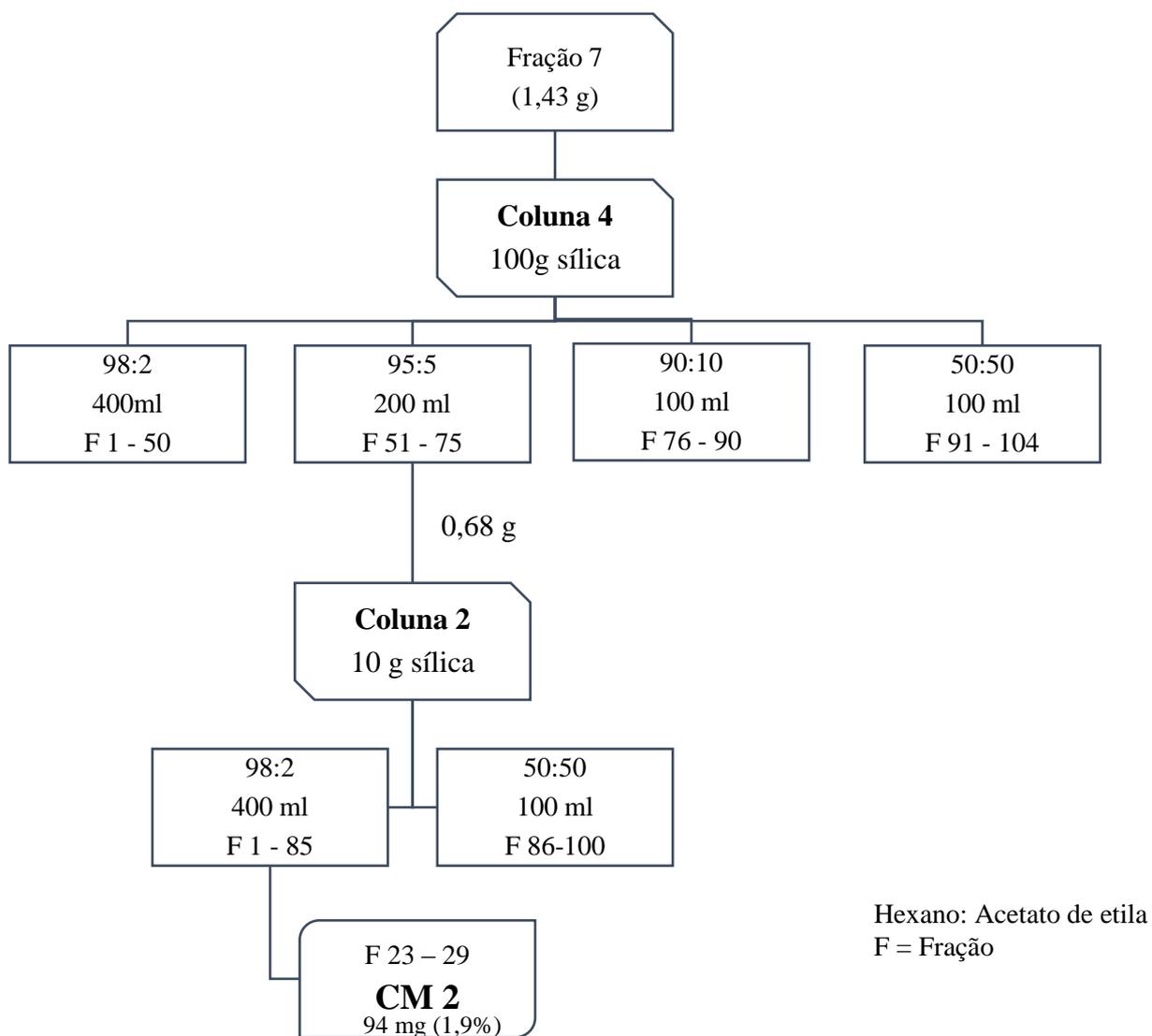


Figura 7. Esquema de isolamento do composto CM2 a partir do óleo de *C. multijuga*

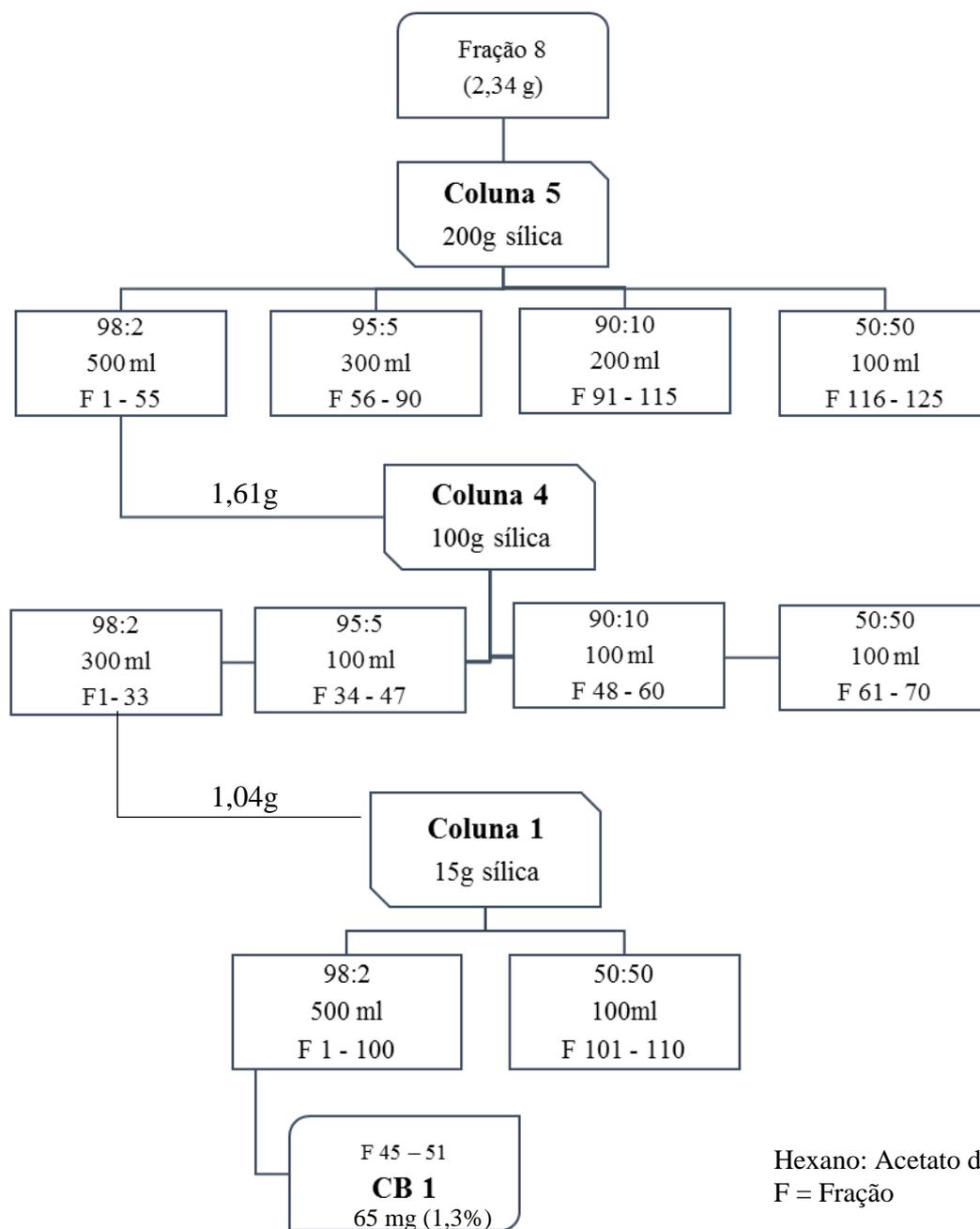


Figura 8. Esquema de isolamento do composto CB1 a partir do óleo de *C. pubiflora*

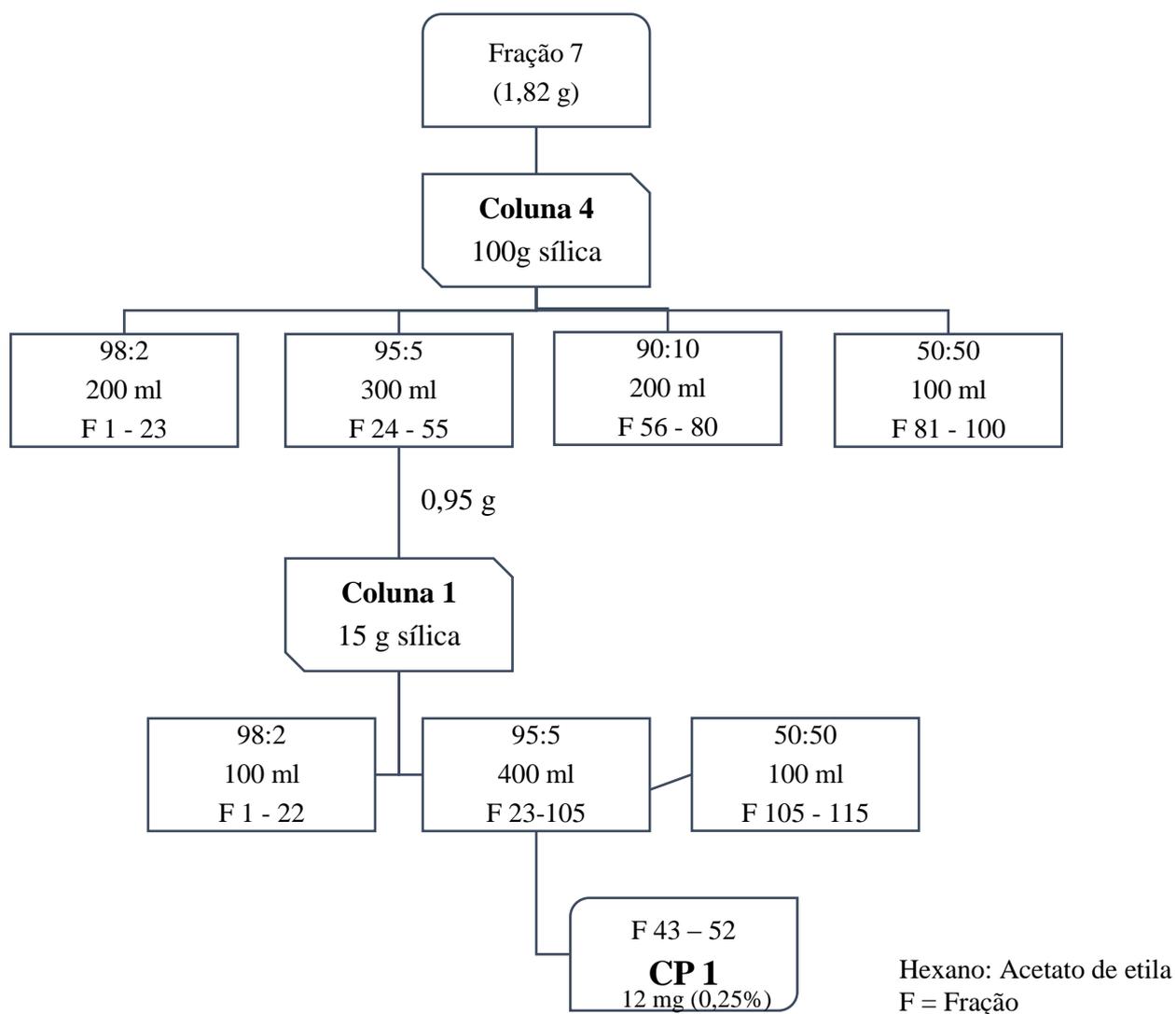


Figura 9. Esquema de isolamento do composto CP1 a partir do óleo de *C. paupera*

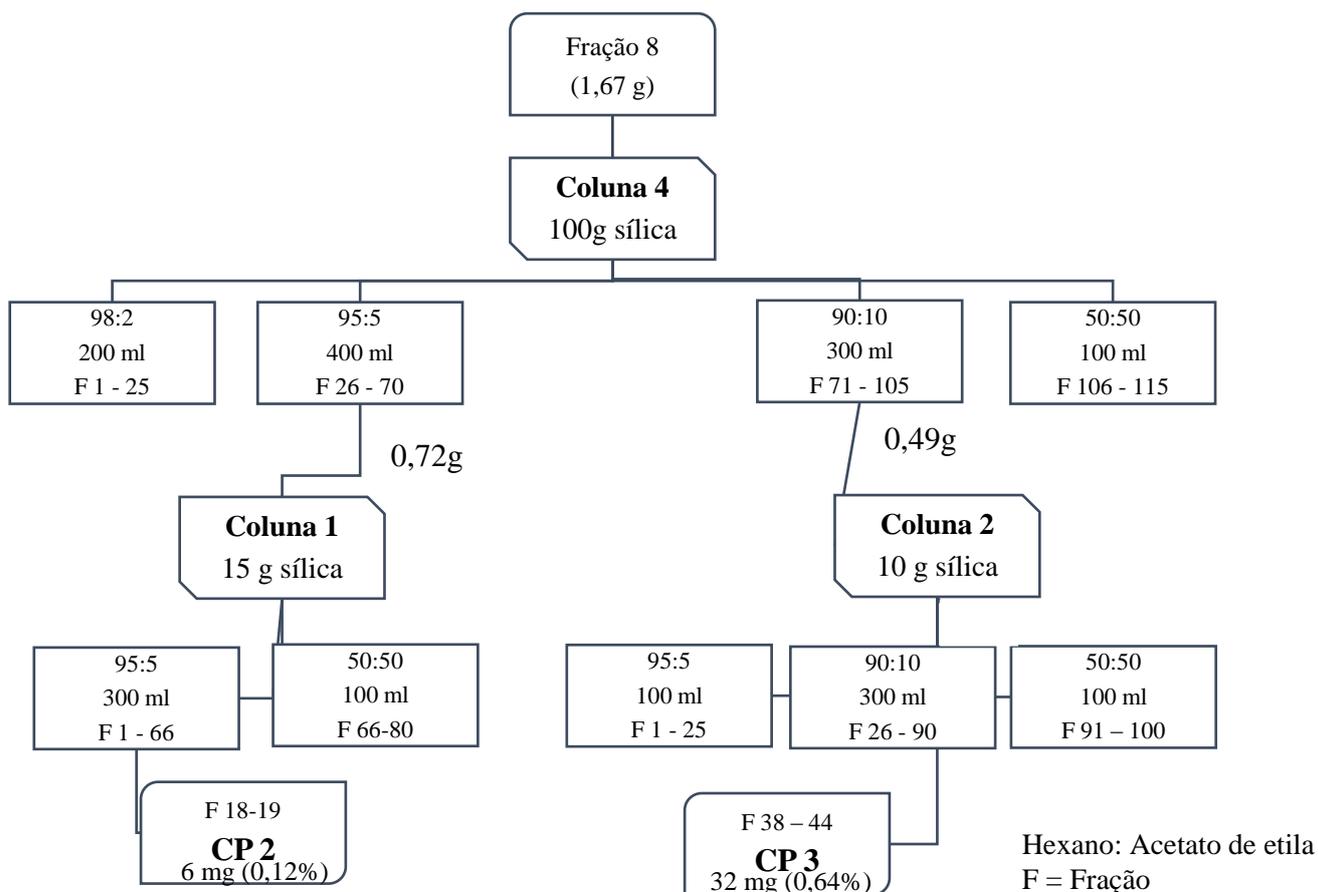


Figura 10. Esquema de purificação do composto CP2 e CP3 a partir do óleo de *C. paupera*

3.1.6 Identificação estrutural das substâncias isoladas

As estruturas químicas dos metabólitos isolados e purificados foram elucidadas utilizando-se métodos como espectrometria de massas e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C . Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram adquiridos em espectrômetros Bruker–Advance DRX₄₀₀, operando em 400 MHz empregando-se solventes deuterados da marca *Aldrich*®.

Os espectros de massas foram obtidos a partir do cromatógrafo de fase gasosa da marca Shimadzu – QP 2010 equipado com injetor automático AOC – 20Si acoplado com um espectrômetro de massas de ionização por elétrons. Estudos comparativos a partir do perfil de fragmentação foram obtidos levando-se em consideração o banco de dados da biblioteca Wiley e trabalhos divulgados na literatura.

Os índices de retenção dos principais voláteis foram determinados utilizando CG-DIC de acordo com o seguinte procedimento: injetou-se 1 µL de cada amostra na concentração de 1 mg/ml obtendo-se os tempos de retenção para cada componente. Em seguida, injetou-se 1 µL de solução de série homóloga de hidrocarbonetos (C8 a C20), utilizando as mesmas condições cromatográficas obtendo-se os tempos de retenção para cada hidrocarboneto. Calcularam-se os índices de retenção por meio da equação divulgada por Muhlen (2009).

$$LTPRI = 100n + 100 \frac{t_{R(i)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}}$$

Onde: t'_R é o tempo de retenção ajustado. i – analito n – número de carbonos do padrão adjacente menos retido, e $n + 1$ é o número de carbonos do padrão adjacente mais retido.

3.2 Desenvolvimento e validação de método analítico por CG-DIC

Para a quantificação dos compostos de interesse nos óleos voláteis, primeiramente, definiram-se os parâmetros a serem utilizados para análise por CG-DIC: Temperatura do injetor e detector, vazão dos gases H_2 e N_2 , temperatura inicial e final do forno, volume de injeção, e concentração das amostras. Ao mesmo tempo, selecionou-se a benzofenona como padrão interno, por ser solúvel em hexano e por possuir tempo de retenção distinto do tempo de retenção das substâncias presentes nas amostras.

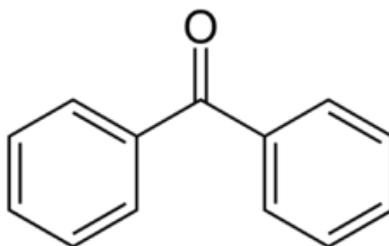


Figura11. Estrutura da benzofenona

Após o desenvolvimento do método analítico que foi utilizado para o processo de quantificação, este foi validado, sendo avaliado quanto aos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. A validação foi realizada segundo o protocolo preconizado pela RE 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

A seletividade foi avaliada por meio da verificação do desempenho analítico. Para tanto, avaliou-se a separação dos compostos utilizando-se o tempo de retenção, largura da base do pico, número de pratos teóricos, resolução e fator de separação. (COLLINS *et al.*, 2005).

Tabela 2. Equações utilizadas para avaliar a seletividade

Parâmetros	Equações
Resolução	$R_s = 2 \times (Tr_2 - Tr_1) / (Wb_1 + Wb_2)$
Pratos Teóricos	$N = 16 \times (Tr / Wb)^2$

Tr: Tempo de retenção, Wb: Largura de base do pico.

A linearidade do método foi verificada a partir da construção de uma curva analítica com os compostos isolados, a qual contemplou nove concentrações distintas (350 µg/mL; 300 µg/mL; 200 µg/mL; 100 µg/mL; 50 µg/mL; 35 µg/mL; 30 µg/mL; 20 µg/mL e 10 µg/mL). As diluições da curva analítica estão representadas na Figura 8. Esta foi realizada em triplicata, em três dias consecutivos. A partir dos resultados obtidos, os dados foram submetidos à regressão linear e obteve-se a equação da reta.

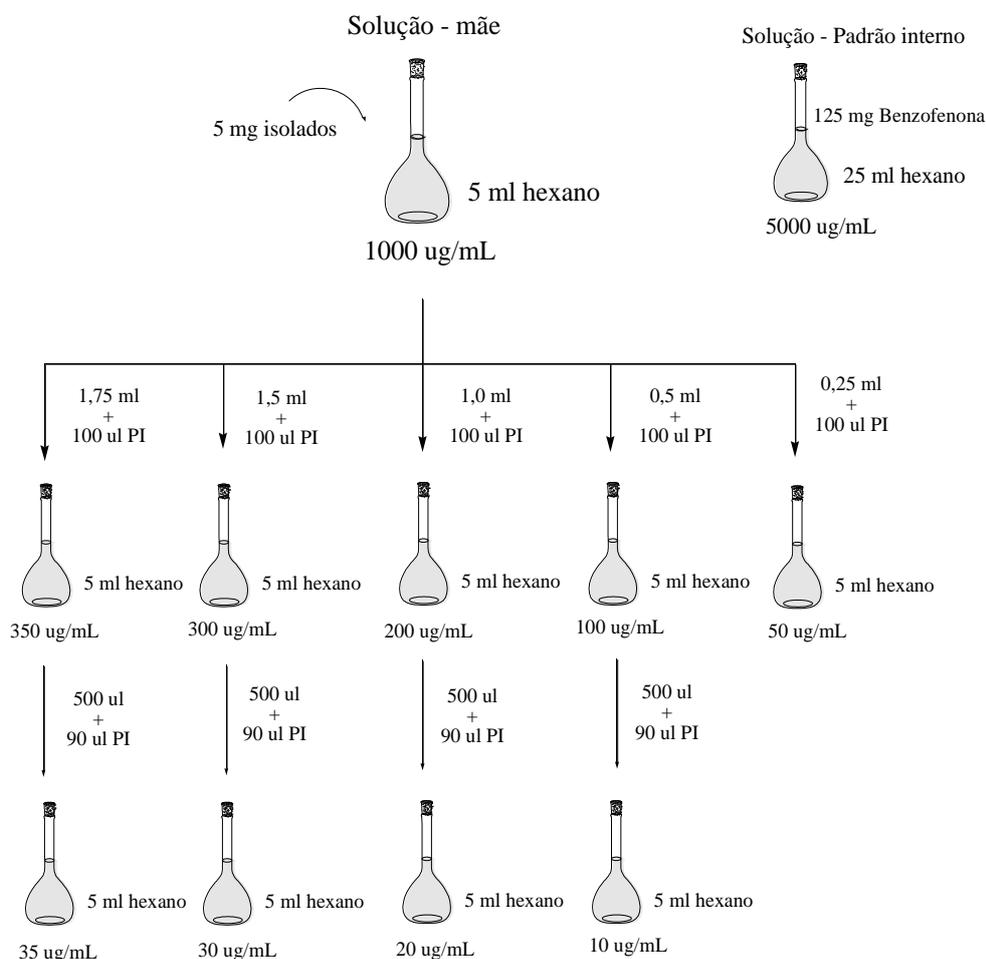


Figura 12. Esquema de diluições para a construção da curva analítica

Os limites de detecção e de quantificação foram estabelecidos através do ruído da linha de base. Foi considerada como limite de detecção a concentração que gerou pico com intensidade equivalente a três vezes o ruído da linha de base, enquanto que para o limite de quantificação foi considerada a concentração que apresentou pico equivalente a 10 vezes ruído da linha de base, através das equações:

$$\text{LD} = 3,3.(s/S) \quad \text{LQ} = 10.(s/S)$$

LD: Limite de detecção, LQ: Limite de quantificação. Onde, s é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e S é a média do coeficiente angular

, obtendo-se os limites operacionais de detecção e quantificação, respectivamente.

A precisão do método proposto foi mensurada através da repetibilidade (precisão intra-dia) e da precisão intermediária (precisão inter-dia). Para tanto, foram realizadas análises de três concentrações (300 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 20 $\mu\text{g/mL}$) avaliadas na curva analítica em um mesmo dia para verificar a repetibilidade e em três dias distintos para avaliar a precisão intermediária do método proposto. Os dados obtidos foram avaliados através do cálculo do coeficiente de variação (CV%).

$$\text{CV}(\%) = (S/X) \cdot 100$$

Em que S = estimativa do desvio padrão das respostas medidas e X = medida das respostas.

Destaca-se que S é dado por:

$$S = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)},$$

Em que: x_i = valor individual de uma medição; \bar{x} = média aritmética de um pequeno número de determinações; n = número de medições.

A exatidão foi verificada a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações: baixa (20 $\mu\text{g/mL}$), média (100 $\mu\text{g/mL}$) e alta (300 $\mu\text{g/mL}$), em triplicata. Os resultados para este parâmetro foram expressos através do erro padrão relativos (EPR) em relação à concentração experimental e teórica correspondente, sendo aceitáveis valores com variações de $\pm 5\%$ da concentração teórica. A recuperação dos compostos também foi avaliada. A recuperação foi realizada com a fortificação do óleo de *Copaifera langsdorffii*, *C. duckey*, *C. multijuga*, *C. paupera*, *C. reticulata* e *C. publifora* em diferentes concentrações em níveis baixa (15 $\mu\text{g/mL}$), média (30 $\mu\text{g/mL}$) e alta (60 $\mu\text{g/mL}$).

A robustez do método foi determinada a partir do design experimental de Plackett–Burman para sete fatores e oito experimentos, conforme descrito por Heyden *et al*, 2001;

sendo os fatores escolhidos e a definição da faixa de variabilidade de cada um dos fatores em relação ao método nominal, dada pelos níveis (- 1), quando o fator seguir o limite negativo, e (+ 1) quando o mesmo seguir o limite positivo mostrados nas tabelas 3 e 4.

Tabela3. Fatores e níveis investigados no teste de robustez considerando CG-DIC.

Fatores	Limite	Nível (-1)	Nível (+1)	Nominal
A Temperatura do injetor °C	± 5.0	235	245	240
B Temperatura do detector °C	± 5.0	275	285	280
C <i>Split</i> (divisor de amostra)	± 2.0	48	52	50
D Vazão de gás H2 (mL/min)	± 0.2	1.1	1.5	1.3
E Temperatura inicial do forno °C	± 5.0	120	130	125
F Temperatura final do forno °C	± 5.0	245	255	250
G Vazão(mL/min)	± 3.0	42	48	45

Tabela 4. Planejamento fatorial para sete fatores e oito experimentos, CG-DIC.

Fatores	A	B	C	D	E	F	G	Respostas
Experimentos								
1	245	285	52	1.1	130	245	42	y1
2	235	285	52	1.5	120	255	42	y2
3	235	275	52	1.5	130	245	48	y3
4	245	275	48	1.5	130	255	42	y4
5	235	285	48	1.1	130	255	48	y5
6	245	275	52	1.1	120	255	48	y6
7	245	285	48	1.5	120	245	48	y7
8	235	275	48	1.1	120	245	42	y8

As letras correspondem aos fatores da tabela 1

Os experimentos foram realizados conforme as Tabelas acima em quintuplicata nas concentrações de 300 µg/mL, 100 µg/mL e 20 µg/mL. Cada experimento foi realizado seguindo os níveis (- 1) e (+ 1) já pré-determinados para cada um dos fatores. Ao final de cada experimento foi obtida uma resposta y, a qual foi a concentração do componente de interesse. Para o cálculo de cada resposta ou efeito de cada fator foi utilizada a fórmula na Figura 13, sendo Ex correspondente à resposta, $\Sigma y (+)$ à soma dos fatores que foram variados positivamente, $\Sigma y (-)$ à soma dos fatores variados negativamente e n o número total de

experimentos. Para cada efeito ou resposta foi calculado seu desvio padrão relativo em porcentagem para a comparação ao valor máximo permitido de variação (MOREIRA *et al*, 2013).

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

Figura 13. Fórmula matemática utilizada para obtenção do efeito de cada fator no Design Experimental de Plackett-Burman

3.3. Análise sazonal da composição dos componentes voláteis das folhas de *C. langsdorffii*

3.3.1. Coleta, secagem e moagem das folhas de *C. langsdorffii*

Cerca de 100 g das folhas de *C. langsdorffii* foram coletadas mensalmente por um período de 12 meses compreendendo os meses de fevereiro de 2016 a janeiro de 2017, de um indivíduo da planta existente no Campus da USP de Ribeirão Preto, demonstrado na figura 14.

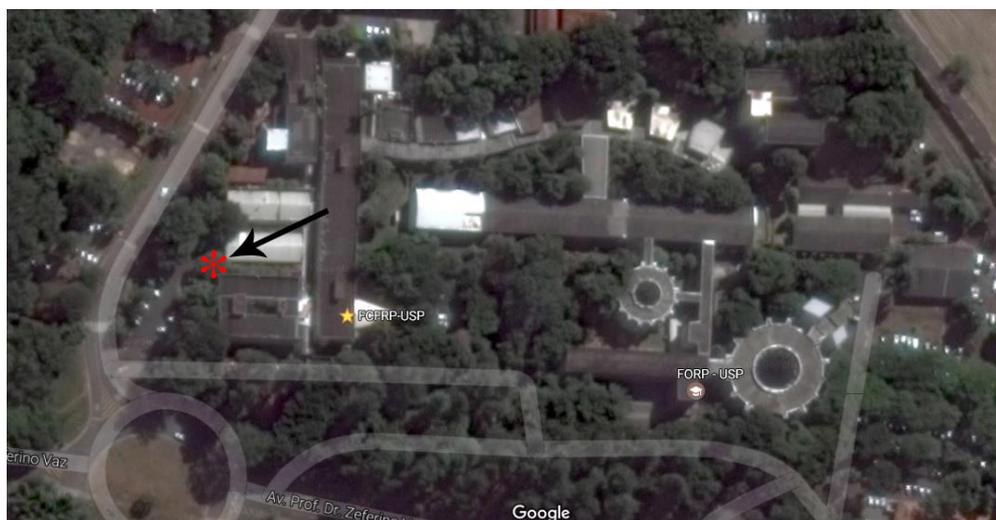


Figura 14. Localização da *C. langsdorffii* ao lado do Laboratório de Farmacognosia.

Fonte: Google Maps®

O material vegetal foi submetido a secagem à temperatura de 35°C por 12 h tendo em vista a eliminação de umidade, evitando assim o crescimento microbiano. Em seguida, foi armazenado em sacos plásticos selados em freezer a -18°C. No momento da análise as folhas foram moídas em moinho portátil de café da marca Cadence modelo MDR301. Este indivíduo de *C. langsdorffii* mede cerca de 10 m de altura e seu tronco mede cerca de 50 cm de diâmetro na base (Figura 15).



Figura 15. *C. langsdorffii* utilizada neste estudo e suas folhas.

3.3.2. Preparação da amostra e análise por cromatografia gasosa

Para a extração das folhas de *C. langsdorffii*, uma porção de 0,5 g de folhas secas e em pó foram transferidas para um Erlenmeyer de 125 mL de capacidade, ao qual foram adicionados 20,0 mL de hexanos contendo 100 µg/mL de benzofenona como padrão interno. Em seguida, o frasco foi selado e submetido à maceração dinâmica num agitador mecânico operando a 150 rpm, a 40°C e durante 2 h. Em seguida, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente e uma alíquota de 1 µL do sobrenadante foi analisado por GC-DIC.

3.3.3. Estudo de recuperação do cariofileno nas folhas de *C. langsdorffii*

Os estudos de recuperação foram feitos com fortificação da amostra em três níveis diferentes de concentração: alto, médio e baixo, em quadruplicata.

Para tanto, cerca de 20 g de folhas desidratadas de *C. langsdorffii* foram pulverizadas e o tamanho da partícula uniformizado com o auxílio de um tamis de 86 mesh. Em seguida, com a finalidade de se extrair os compostos de interesse, para posterior enriquecimento da amostra, o material vegetal foi submetido ao processo de extração exaustiva utilizando-se aparelho de Soxhlet durante o período de 12 h (Figura 16). Nesse processo foram usados 500 mL de acetato de etila como solvente extrator. Ao final de todo procedimento, o material vegetal esgotado foi mantido em estufa de ar circulante a 40°C por um período de 3 h. Logo após este período, em 12 frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL de capacidade, pesaram-se 500 mg da planta seca e esgotada, sendo que estes foram divididos em três grupos.



Figura 16. Processo de esgotamento do material vegetal por Soxhlet

No primeiro grupo (quatro replicatas correspondentes à concentração baixa) adicionou-se 0,5 mL de uma solução contendo 450 $\mu\text{g/mL}$ de β -cariofileno em hexano cromatográfico, no segundo grupo (concentração média) adicionou-se 1 mL da solução padrão e, finalmente, no terceiro grupo (concentração alta) adicionaram-se 2 mL da solução padrão. Após homogeneização e incorporação do β -cariofileno nas amostras, evaporou-se o hexano à temperatura ambiente. A seguir adicionaram-se 20 mL de uma solução de benzofenona 100 $\mu\text{g/mL}$ em hexano e procedeu-se à extração utilizando-se o protocolo descrito no item 5.3.2. Terminado o processo de extração, a amostra foi filtrada e alíquotas de 4 mL foram transferidas para frascos contendo 1 mL de solução de tetrametilbenzeno 500 $\mu\text{g/mL}$ usado como padrão secundário, totalizando as seguintes concentrações finais de β -cariofileno: 11,25 $\mu\text{g/mL}$ (baixa), 22,5 $\mu\text{g/mL}$ (média) e 45 $\mu\text{g/mL}$ (alta). Os padrões interno e secundário tiveram concentrações finais de 100 $\mu\text{g/mL}$.

3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

3.4.1 Avaliação da atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas

Foram avaliadas as amostras de óleos das diferentes espécies de *Copaifera* e os compostos isolados frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305. O estudo antimicrobiano foi realizado no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em parceria com a Profa. Dra. Niede A. J. C Furtado.

Para determinação da concentração inibitória mínima foi utilizado o método de microdiluição em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards”, atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com adaptações. Para a preparação dos inóculos e posterior realização dos ensaios foram utilizadas bactérias de crescimento de 24 h em ágar Muller Hinton. Os inóculos foram padronizados em espectrofotômetro com leitura em 625 nm apresentando valor de absorvância entre 100 e 110.

Em microplacas foram depositados o caldo Mueller Hinton contendo os extratos e as frações a serem testadas em várias concentrações e os inóculos, obtendo-se o volume final de 100 µL em cada poço. Penicilina (5,9 a 0,012 µg/mL) e estreptomicina (259 a 0,058 µg/mL) foram utilizadas como controles positivos para a avaliação das culturas bacterianas. Foram realizados os controles de esterilidade do caldo, amostras e padrões, bem como os controles de crescimento das culturas. As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 24 h. Após o tempo de incubação foram adicionados 20 µL de cloreto de trifeniltetrazólio a cada poço, na concentração de 0,02% em solução aquosa. Neste ensaio também foi determinado o efeito bactericida ou bacteriostático das amostras. Para o ensaio de Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram retiradas e alíquotas dos poços e aplicados em placas contendo meio de cultura Àgar Mueller Hinton, em seguida essas placas foram encubadas em estufa bacteriológica por 24 horas. Após esse período foi verificado a ausência ou presença de crescimento microbiológico.

3.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana contra leveduras

Foram avaliadas as amostras de óleos das diferentes espécies de *Copaifera* e os compostos isolados frente às seguintes leveduras: *Candida albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Para determinação da concentração inibitória mínima foi utilizado o método de microdiluição em caldo segundo metodologia preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006, 2007), com adaptações. Os procedimentos foram os mesmos utilizados nos ensaios com bactérias, exceto o preparo do inóculo, o qual foi preparado em solução salina esterilizada (0,85%) e, em seguida, padronizado em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 530 nm, por comparação com o tubo 0,5 da escala de McFarland, fornecendo inóculo após diluições de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Foi utilizado caldo RPMI-1640 para cultura e para controle positivo utilizou-se o fluconazol para todas as espécies de

Candida avaliadas. Foram utilizadas microplacas de 96 poços, esterilizadas, as quais foram incubadas a 35°C durante 48 h.

Após o tempo de incubação foram adicionados 20 µL de resazurina a cada poço, na concentração de 0,01% em solução aquosa como indicador da viabilidade celular. A verificação da cor rosa nos orifícios foi interpretada como presença de crescimento microbiano, enquanto que a cor azul como inibição do crescimento do micro-organismo testado. Neste ensaio também foi determinado o efeito fungicida ou fungistático das amostras. Para tanto, uma alíquota de cada poço foi retirada, antes da revelação com indicador de viabilidade celular e, em seguida, foi inoculada em placas de *Petri*, contendo meio de cultura TSA (ágar tripton de soja). As placas foram incubadas e a detecção ou ausência de crescimento microbiano indicaram efeito fungistático ou fungicida, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das frações voláteis: rendimento, análise e identificação

A proposição inicial durante o estudo fitoquímico foi o isolamento e a identificação dos marcadores, a partir dos óleos voláteis provenientes das oleorresinas de *Copaifera*, para serem utilizados na validação do método analítico. Por isso, buscou-se extrair a fração volátil das oleorresinas por hidrodestilação em aparelho de Clevenger. Os rendimentos obtidos podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5. Rendimento das frações voláteis obtidas por hidrodestilação

Espécies	Fração Volátil (g)	Rendimento (%)
<i>C. multijuga</i> Hayne	37,8	75,6
<i>C. paupera</i> (Herzog) Dewer	21,6	43,2
<i>C. publifora</i> Benth	20,7	41,4
<i>Copaifera langsdorffii</i> Desff	18,2	36,4
<i>C. duckey</i> Dewer	10,6	21,2
<i>C. reticulata</i> Ducke	18,3	36,6

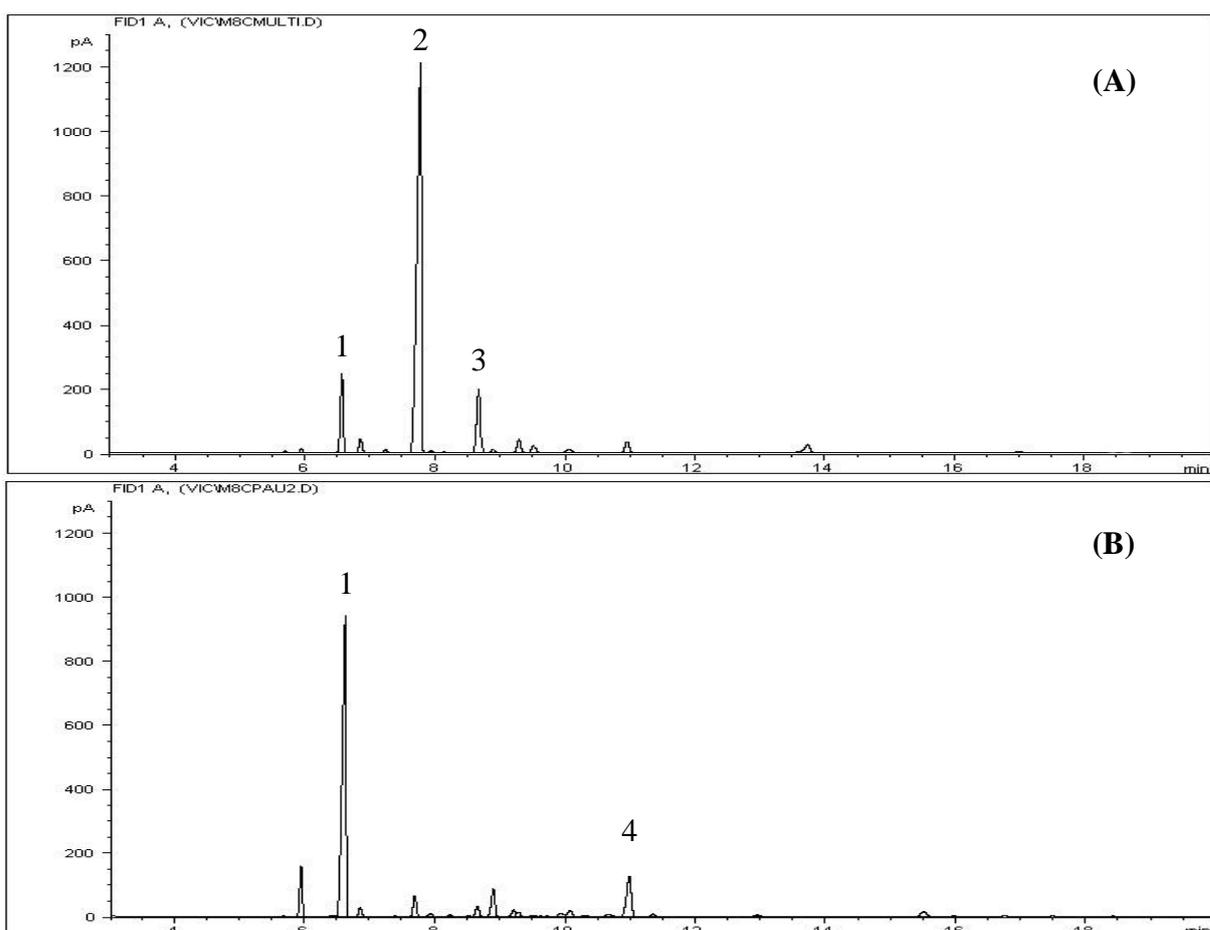
O processo de extração empregado para a obtenção da fração volátil da oleorresina de *Copaifera multijuga* resultou em 37,8 g equivalentes a 75% de rendimento, para *C. paupera* 21,6 g que equivalem a 43% e para *C. publifora* em 41,4 g equivalentes a 41% de rendimento, caracterizando, assim, as três espécies que possuem maior fração volátil em suas oleoresinas. Já a obtenção da fração volátil da oleorresina de *C. langsdorffii* resultou em 18,2g que correspondem a 36,4% de rendimento. Para a *C. duckey* 10,6g equivalentes a 21% e para a *C. reticulata* 18,3g equivalentes a 36% de rendimento, configurando as três espécies com menor teor de voláteis.

Segundo Cascon (2004), os hidrocarbonetos sesquiterpênicos representam cerca de 80% dos constituintes das oleorresinas de copaíba. Ferrari e colaboradores (1971) relataram que a oleorresina obtida a partir da *C. langsdorffii* é constituída por 50% de hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Sousa e colaboradores (2011) utilizaram a hidrodestilação para obtenção dos voláteis de oleorresinas de *C. langsdorffii* e obtiveram um rendimento de 40% da fração volátil, o que está de acordo com os rendimentos obtidos neste estudo.

A cromatografia gás-líquido é uma potente ferramenta utilizada para a separação de compostos presentes em matrizes complexas como os óleos essenciais. A base para esta separação consiste na partição do soluto entre duas fases, uma fase líquida estacionária e uma fase gasosa móvel. Quando os solutos interagem fortemente com a fase líquida as rampas de

temperaturas do forno podem ser alteradas com a finalidade de se obterem cromatogramas com boa separação e resolução dos constituintes da amostra. A cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama é usualmente o método de escolha para separar e quantificar componentes de óleos voláteis (SOUSA *et al.*, 2011).

O detector de ionização de chama é um dispositivo que tem seu funcionamento baseado no princípio de que a condutividade elétrica de um gás é diretamente proporcional à quantidade de partículas carregadas, nele presentes. Portanto, compostos suscetíveis à combustão como, por exemplo, compostos orgânicos, geram partículas portadoras de carga, as quais conduzem corrente elétrica que é medida e convertida na forma de picos. Este dispositivo é capaz de acusar a presença e medir traços de componentes no efluente da coluna (PATRUSHEV, 2015). Tendo em vista a disponibilidade do CG-DIC em nosso laboratório e a as vantagens oferecidas por esta técnica, os óleos voláteis das espécies de *Copaifera* foram analisados por CG-DIC e seus perfis podem ser observados na figura 17.



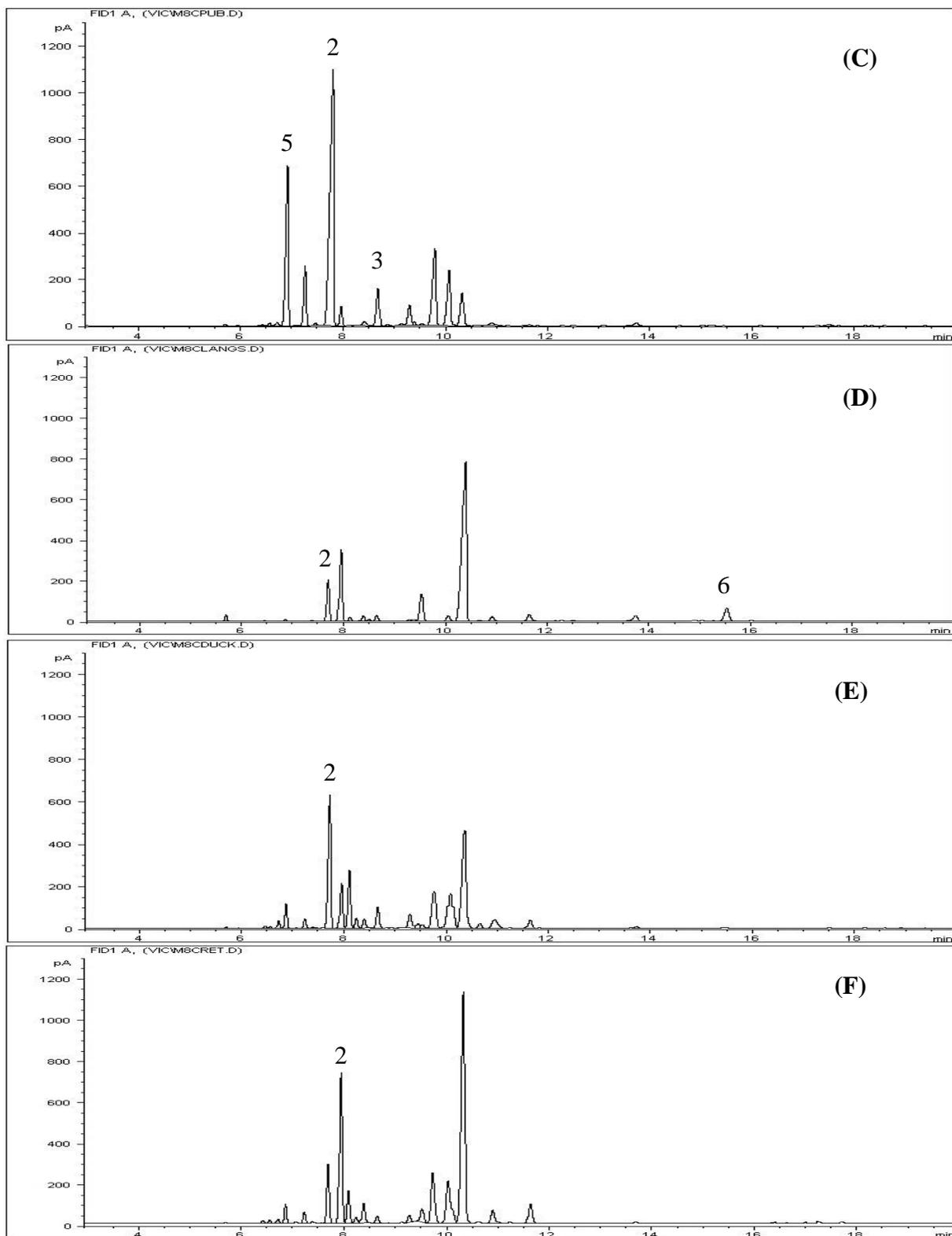


Figura 17. Perfis das frações voláteis das oleorresinas das espécies de *Copaifera* por CG – DIC. (A) *C. multijuga* Hayne; (B) *C. paupera* (Herzog) Dewer; (C) *C. publifora* Benth; (D) *C. langsdorffii* Desff; (E) *C. duckey* Dewer; (F) *C. reticulata* Ducke. 1. α -copaeno, 2. β -cariofileno, 3. α -humuleno, 4. δ -cadineno, 5. β -elemeno, 6. O-cariofileno

4.2 Perfil cromatográfico dos óleos de *Copaífera* por CG – EM

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas é utilizada especialmente para auxiliar com elevada eficiência à confirmação e ou identificação de componentes de uma amostra. Este método permite, como a CG – DIC, a separação dos constituintes e fornece, ainda, um espectro de massas para cada pico. O princípio básico é dado pela produção de íons, através de um processo de ionização molecular, os quais serão posteriormente fragmentados (MASTOVSKA E LEHOTAY, 2003).

Os íons formados são separados de acordo com a relação carga-massa e a abundância relativa de cada íon é determinada. Por meio da análise dos fragmentos encontrados pode-se determinar o peso e a fórmula molecular, informações importantes que podem ajudar na confirmação da estrutura química de uma substância (KIRCHNER *et al.*, 2005). Sendo assim, os componentes presentes nos óleos voláteis de *Copaífera* foram identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas, por meio de comparações do perfil de fragmentação em banco de dados da biblioteca Wiley e na literatura.

A identificação prévia de compostos individuais também foi realizada por meio da comparação do tempo de retenção relativo da amostra com o tempo de retenção de padrões de hidrocarbonetos. Este índice relaciona o tempo de retenção dos compostos de uma determinada amostra ao tempo de retenção de uma série homóloga de hidrocarbonetos. Tais índices permitem melhor avaliação dos dados obtidos podendo ser realizadas comparações de resultados entre diferentes laboratórios, com tabelas descritas na literatura (ADAMS, 2001) e com bibliotecas como a Wiley do sistema HP. Na tabela 6 apresentam-se os índices de retenção dos compostos presentes nos óleos voláteis, bem como a área relativa de cada composto obtido por CG/EM.

Tabela 6 Composição dos componentes voláteis das oleorresinas das espécies de *Copaifera langsdorffii* Desff, *C. duckey* Dewer, *C. multijuga* Hayne, *C. paupera* (Herzog) Dewer, *C. reticulata* Ducke e *C. pubiflora* Benth, obtidas por análises de CG-MS.

Seq	Composto	IRExp	IRLit	% Área Relativa					
				<i>C. langsdorffii</i>	<i>C. duckey</i>	<i>C. reticulata</i>	<i>C. multijuga</i>	<i>C. paupera</i>	<i>C. pubiflora</i>
1	δ-Elemeno	1341	1343	1,32	-	-	-	-	-
2	α-Cubebeno	1354	1356	-	-	-	0,88	9,9	-
3	Cycloisosativeno	1371	1364	-	-	0,33	-	0,4	0,17
4	α-Copaeno	1380	1377	0,15	-	0,38	14,05	34,88	0,38
5	Episesquithujeno	1393	1389	0,09	0,29	0,5	-	-	-
6	Isocariofileno	1394	1403	-	-	-	-	2,48	-
7	β-Elemeno	1396	1397	0,38	2,38	2,54	-	-	17,37
8	α-Gurjuneno	1405	1409	-	-	1,35	0,7	-	6,76
9	α-Santaleno	1419	1417	-	0,32	0,36	-	-	-
10	β-Cariofileno	1426	1421	9,73	5,98	7,71	45,64	5,4	27,28
11	trans-α-Bergamoteno	1439	1436	15,14	21,19	21,99	0,66	1	3,1
12	Aristoleno	1448	1455	-	-	1,04	-	-	-
13	Epi-β-Santaleno	1452	1450	-	0,26	0,17	-	-	-
14	β-Fameseno	1459	1457	3,98	4,65	3,96	-	-	-
15	α-Humuleno	1459	1455	-	-	-	15,47	3,26	6,89
16	Alloaromadendreno	1467	1457	-	-	-	1,05	7,75	-
17	β-Chamigreno	1480	1488	-	-	1,56	-	-	3,36
18	Germacreno B	1482	1481	-	-	-	-	1,26	-
19	α-Amorpheno	1482	1485	-	-	-	4,18	-	-
20	Germacreno D	1487	1481	13,1	-	-	2,97	-	-
21	β-Selineno	1493	1487	-	7,21	12,17	-	-	13,07
22	Ledeno	1501	1500	-	-	-	-	1,31	-
23	α-Bulneseno	1501	1502	-	4,58	-	-	-	-
24	α-Selineno	1501	1498	-	-	11,43	-	-	9,25
25	Bicyclogermacreno	1503	1500	-	-	-	1,19	-	-
26	α-Muuroleno	1506	1500	-	-	-	0,85	0,82	-
27	α-Bisaboleno	1506	1503	3,38	4,38	-	-	-	0,39
28	β-Bisaboleno	1514	1509	32,04	30,9	24,91	-	0,85	6,25
29	β-Sesquifelandreno	1528	1524	2,8	3,81	2,75	-	-	-
30	δ-Cadineno	1529	1531	-	-	-	4,33	13,93	-
31	Cubeneno	1538	1538	-	-	-	-	1,32	-
32	α-Elemol	1547	1557	-	6,07	-	-	-	-
33	Óxido de Cariofileno	1591	1591	1,03	0,27	0,21	0,59	0,17	0,23
34	NI			16,86	7,71	6,64	7,44	15,27	5,5
Total Identificado				83,14	92,29	93,36	92,56	84,73	94,5
Total Geral				100	100	100	100	100	100

IRExp: Índice de Retenção experimental; IRLit: Índice de retenção da literatura.

Com os resultados expressos na tabela 6 foi possível identificar os compostos voláteis majoritários para cada espécie de *Copaifera* em estudo. O composto β -cariofileno está presente em todas as espécies, sendo o principal composto nos óleos de *C. multijuga* (45,64%) e *C. publifora* (27, 28%). O α -copaeno só não é encontrado na *C. duckey* e é o principal composto da *C. paupera* (34,88%).

Ferrari e colaboradores, a partir da fração sesquiterpênica de *C. langsdorffii*, obtiveram como constituintes majoritários cariofileno, copaeno e bisaboleno e como minoritários os sesquiterpenos bourbouneno, cipereno, humuleno e cadineno (FERRARI *et al.*, 1971).

Craveiro e colaboradores (1981) descreveram ainda a composição de um óleo essencial obtido a partir da oleorresina de *Copaifera sp.*, na qual os principais sesquiterpenos identificados foram o β -cariofileno, α -humuleno, β -bisaboleno, α -cubebeno, α -muuroleno, α -copaeno, trans- α -farneseno, δ -cadineno e α -bergamoteno (CRAVEIRO *et al.*, 1981).

Em um estudo de marcadores químicos em óleos de *C. multijuga*, Pinto e colaboradores (2000) encontraram como principais constituintes voláteis os sesquiterpenos: α -copaeno, α -humuleno, α -amorfeno, β -cariofileno e o óxido de cariofileno, sendo o β -cariofileno o principal componente. O óxido de cariofileno é descrito como um artefato provável da oxidação de β -cariofileno, embora se acredite que óxido de cariofileno pode ser originado da própria planta (CASCÓN E GILBERT, 2000).

O β -cariofileno se destaca como majoritário presente na oleorresina extraída do tronco de copaíbas (PINTO *et al.*, 2000). Este volátil também pode ser detectado em outros óleos obtidos de *Piper nigrum* L. (Piperaceae) (POLITEO; JUKI; MILO, 2006) e *Baccharis spp.* (Asteraceae) (MASSIGNANI *et al.*, 2009). Uma variedade de atividades biológicas, incluindo anticâncer (Di SOTTO *et al.*, 2010), anti-inflamatória (YOUNG *et al.*, 2007) e antioxidante (KA *et al.*, 2005) têm sido relatadas para este sesquiterpeno. α -Copaeno, β -cariofileno e α -humuleno também são compostos alvos em distintos estudos, já que estes apresentam potencial anti-inflamatório (FERNANDES *et al.*, 2007), antialérgico (PASSOS *et al.*, 2007) e inseticida (KOTAN *et al.*, 2008).

Com o perfil cromatográfico dos óleos voláteis de *C. multijuga*, *C. paupera* e *C. publifora*, estes foram submetidos ao destilador de Bancada (800 Automatic Micro Spinning Band Distillation) com o intuito de fracionamento dos compostos voláteis majoritários.

4.3 Fracionamento da fração volátil das oleorresinas

Spinning Band Distillation é uma técnica que utiliza uma banda helicoidal rotativa feita de um material inerte tal como metal ou Teflon para criar um número elevado de pratos teóricos e é utilizada para separar misturas de líquidos voláteis, que possuem pontos de ebulição muito próximos. Quando líquidos com pontos de ebulição semelhantes são destilados, os vapores resultantes da destilação são misturas de compostos não puros. A cada ciclo de condensação-vaporização, os vapores são enriquecidos com um determinado componente. A maior área de superfície do *Spinning Band* permite que ocorra mais desses ciclos, melhorando a separação (B/R INSTRUMENT CORPORATION).



Figura 18. Destilador de Bancada 800 *Automatic Micro Spinning Band Distillation*

O destilador de bancada utiliza rampas de temperatura e de pressão como principais parâmetros. Porém, outros parâmetros podem ser modificados, como a frequência de coleta das frações, a potência das rampas de temperatura, variações na temperatura do condensador e o número de frações a serem coletadas, sendo oito no total. Devido à ausência de literatura sobre a utilização do destilador de bancada para fracionamento de óleos essenciais,

inicialmente utilizaram-se os parâmetros de destilação de forma aleatória e, posteriormente, variou-se cada parâmetro individualmente até se observar o melhor ajuste de cada parâmetro.

Os óleos voláteis de *C. multijulga*, *C. paupera* e *C. pubiflora* foram submetidos ao destilador de bancada e tiveram seus parâmetros otimizados a fim de concentrar em uma determinada fração seus constituintes voláteis majoritários. Segundo Bandoni (2003), geralmente o constituinte principal do óleo essencial possui elevada temperatura de ebulição, na faixa de 150 a 300°C e baixa pressão de vapor, indicando assim menor volatilidade em relação aos outros constituintes do óleo, o que pode ser observado no processo, pois as frações de maior concentração dos majoritários foram as frações que destilaram em temperaturas mais altas (figura 2).

Os principais pontos positivos da utilização do destilador de bancada 800 Automatic Micro Spinning Band Distillation para o fracionamento de óleos essenciais é a economia na utilização de solventes e sílica e o tempo de fracionamento, sendo que na utilização do parâmetro final, o tempo médio de máquina foi de aproximadamente 40 minutos e, principalmente, a perda mínima de material analisado.

Após o processo de fracionamento pelo destilador de bancada, as frações foram submetidas à cromatografia em coluna clássica, conforme descrito na seção de materiais e métodos. As frações de número sete (1,43 g) e oito (2,05 g) provenientes do óleo de *C. multijulga*, as frações sete (1,82 g) e oito (1,67 g) oriundas do óleo de *C. paupera* e a fração de número oito (2,34 g) resultante do óleo de *C. pubiflora*.

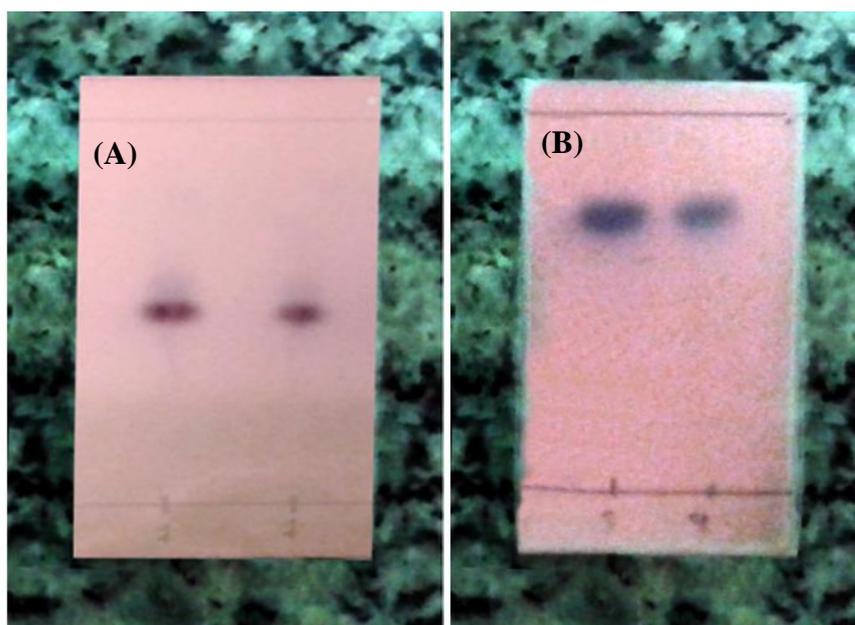


Figura 19. Comparação entre os CCDs das frações 7 (A) e 8 (B) de *C. multijulga*

4.4 Isolamento dos compostos por cromatografia em coluna

Como escrito anteriormente, as frações obtidas dos óleos de *C. multijulga*, *C. paupera* e *C. pubiflora* foram submetidas a colunas cromatográficas, visando o isolamento dos compostos a fim de serem utilizados como padrões analíticos na validação do método e no ensaio antimicrobiano.

Ao final da purificação das frações do óleo volátil de *C. multijulga* por coluna cromatográfica, obtiveram-se dois compostos majoritários puros, que foram analisados no cromatógrafo a gás com detector de ionização por chamas para confirmar o grau de pureza (Figura 20). O composto CM1 resultou em 485 mg com rendimento de 9,7% e o composto CM2 resultou em 94 mg com rendimento de 1,8%.

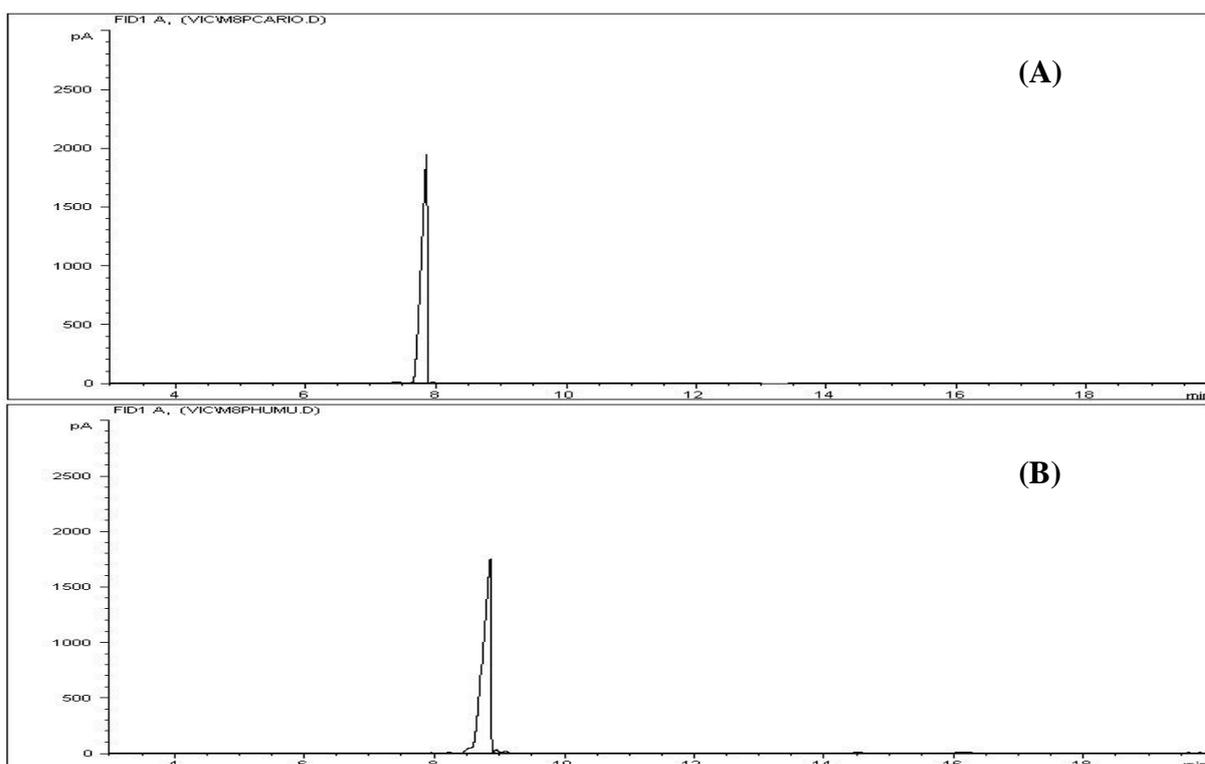


Figura 20. Cromatogramas dos compostos CM1 (A) e CM2 (B) obtidos do óleo de *C. multijulga*

A purificação das frações do óleo volátil de *C. paupera* por coluna cromatográfica forneceu três compostos majoritários puros, que foram analisados no CG-FID para confirmar o teor de pureza (Figura 21). O composto CP1 resultou em 12 mg com rendimento de 2,4%, o composto CP2 resultou em 6 mg com rendimento de 0,12% e o composto CP3 resultou em 32 mg com rendimento de 0,64%. Já a purificação da fração do óleo de *C. pubiflora* resultou em 65 mg de um composto puro (figura 22) que foi denominado CB 1 totalizando rendimento de

1,3%. Todos os cálculos de rendimentos foram realizados levando em consideração a massa inicial de 5 gramas utilizada no destilador de bancada.

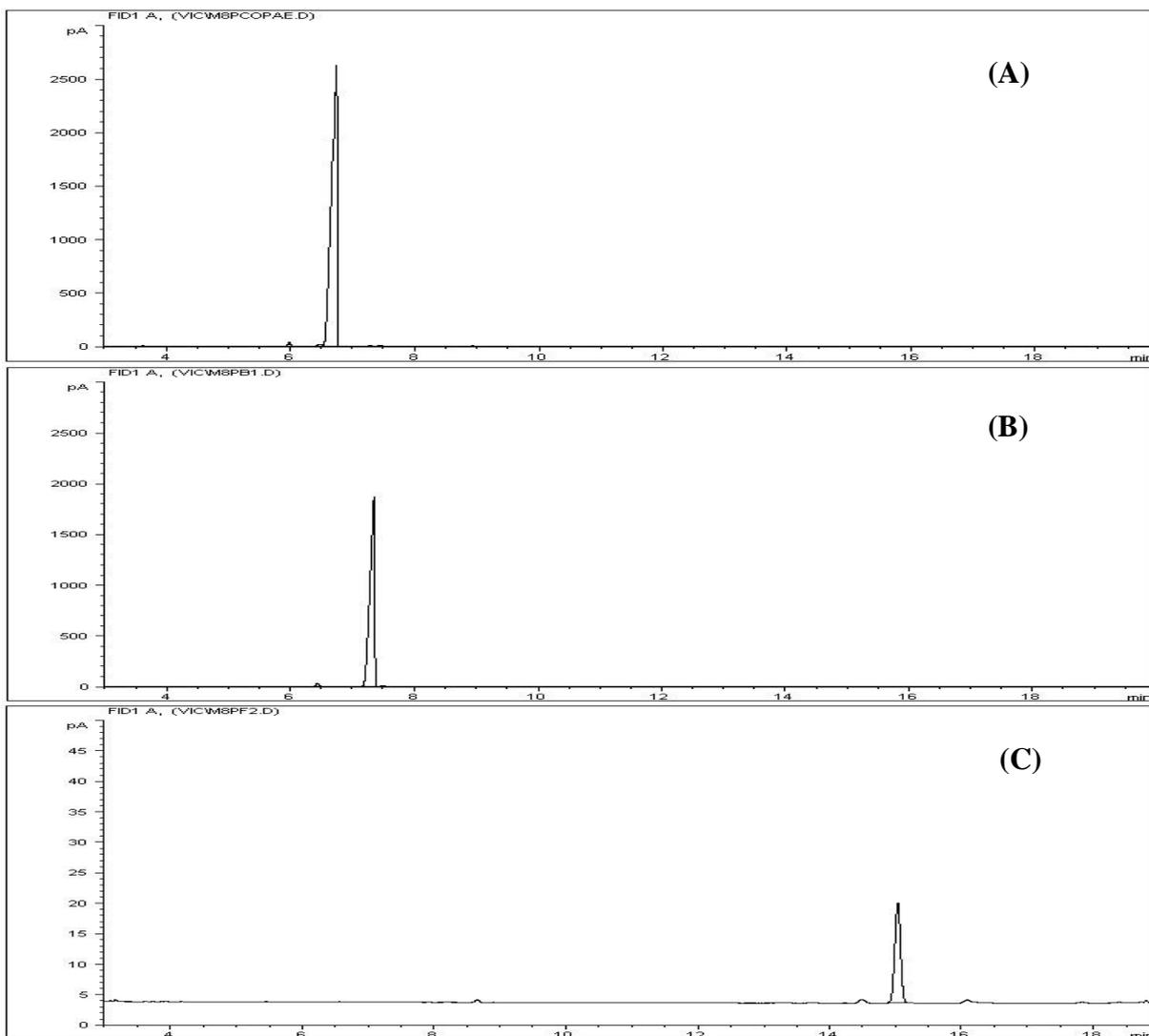


Figura 21. Cromatogramas dos compostos CP1 (A), CP2 (B) e CP3 (C) obtidos do óleo de *C. paupera*

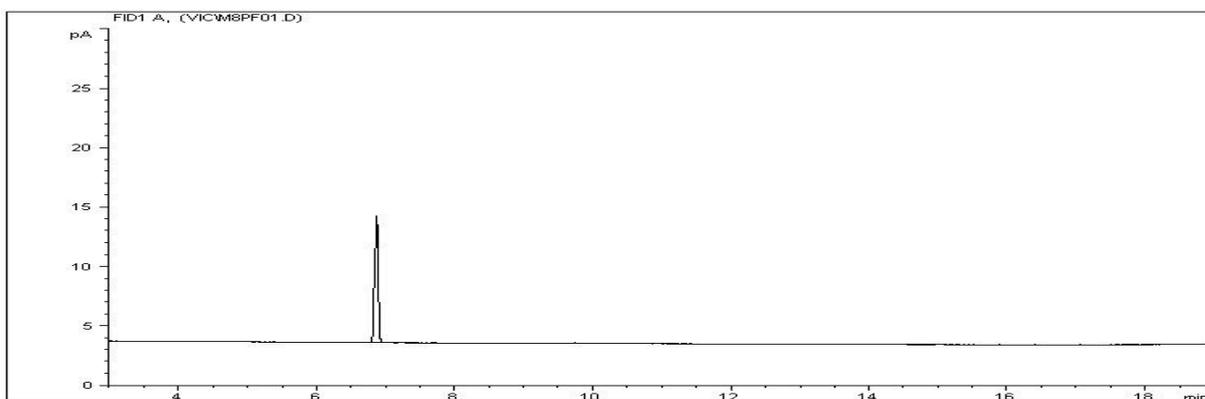


Figura 22. Cromatograma do composto CB1 obtido do óleo de *C. pubiflora*

4.5 Identificação estrutural dos compostos isolados

A maioria dos estudos com óleos voláteis existentes na literatura descreve a identificação de seus constituintes por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e/ou associada ao cálculo do índice de Kovatz. O uso desta técnica requer bancos de dados que contenham os valores dos tempos de retenção e/ou os espectros de massas para serem confrontados com os dados experimentais obtidos. A técnica de RMN de ^{13}C parece ser a técnica mais indicada para a identificação desses compostos, uma vez que os sesquiterpenos constituem uma classe de substâncias naturais com uma gama muito grande de possibilidades estruturais. (ALENCAR *et al.*, 1990).

Para obtenção dos espectros de RMN foi utilizado clorofórmio deuterado da marca Aldrich® como solvente e os espectros foram manipulados no programa MestreNova versão 6.0.

4.5.1 Identificação estrutural do composto CM1

A substância CM1 foi obtida na forma pura, conforme descrito no item 3.1.5 (Figura 6). O composto foi analisado por CG/EM, RMN ^{13}C , RMN ^1H e seus dados espectroscópicos foram comparados com os obtidos da literatura e com o banco de dados Wiley, no caso do espectro de massas. Na análise por CG-DIC foi possível observar um único pico com tempo de retenção de 7,93 minutos.

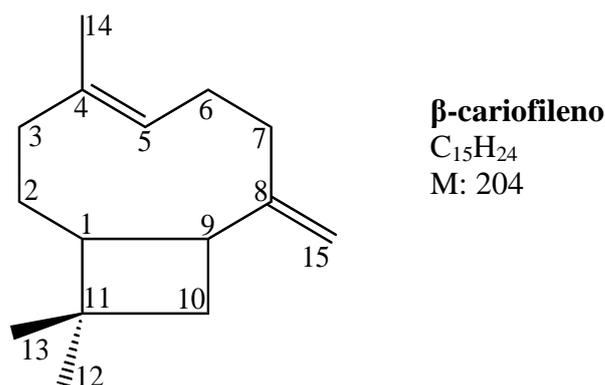


Figura 23. Estrutura do β -cariofileno

As atribuições dos sinais no espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram realizadas com auxílio de dados da literatura (Silva *et al.*, 2010). Através da análise de RMN ^1H de CM1 foi possível evidenciar no espectro a presença de três sinais mais desblindados. O deslocamento químico em δ 5,3 corresponde ao hidrogênio H5, enquanto que

os deslocamentos químicos em δ 4,93 e 4,81 correspondem aos hidrogênios geminais ligados ao carbono C15. Os demais sinais encontram-se todos mais blindados e apresentam deslocamentos químicos abaixo de δ 2,5.

Os deslocamentos químicos dos carbonos no espectro de RMN ^{13}C da substância CM1 foram comparados com os dados da literatura (Silva *et al.*, 2005) e indicam para a substância CM2 a presença de 15 átomos de carbono. Dentre estes, três são grupamentos metílicos, seis são grupamentos metilênicos, três são grupamentos metínicos e três são carbonos não hydrogenados. É possível atribuir a existência de duas ligações duplas na molécula, sendo que os sinais em δ 135,5 e 124,4 correspondem aos carbonos C4 e C5, respectivamente, indicando a presença de um hidrogênio olefínico (H5) e um carbono sp^2 como parte da ligação dupla (C4). Os sinais em δ 154,7 e 111,6 correspondem aos deslocamentos químicos dos carbonos C8 e C15, respectivamente.

O composto CM1 apresentou massa de 204 u.m.a (Figura 25). A comparação do padrão de fragmentação obtido pela análise do composto por CG/EM, com a biblioteca virtual (Wiley 7) levou a confirmação da estrutura do composto β -cariofileno, em um total de 98% de similaridade.

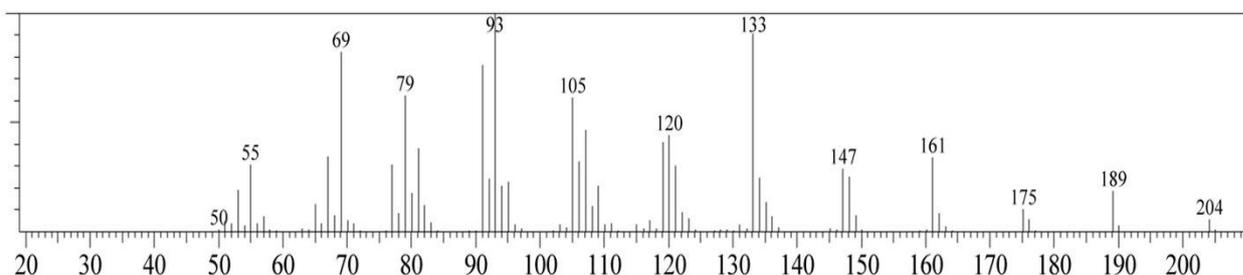


Figura 24. Espectro de massas do composto CM1

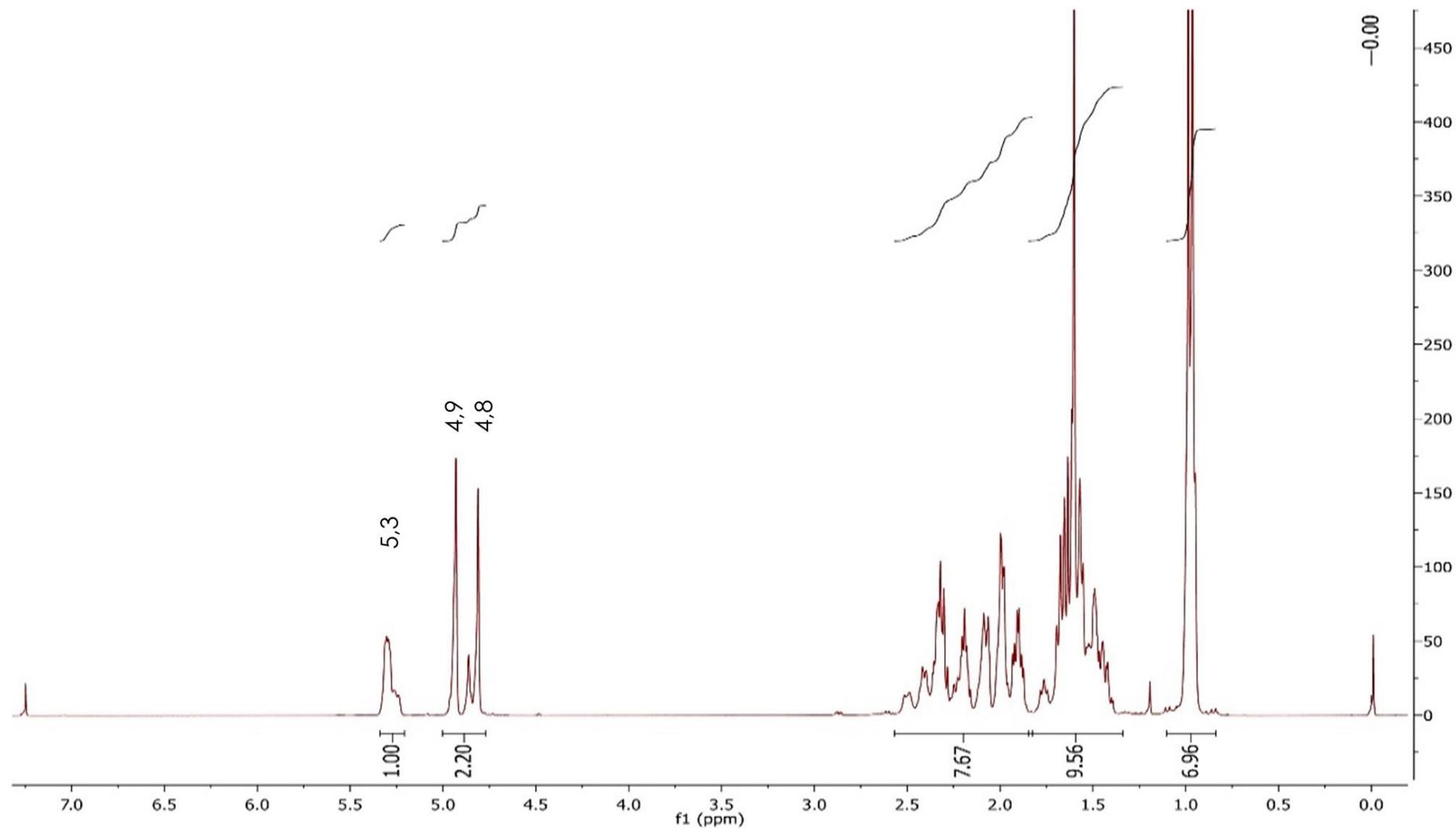


Figura 25. Espectro de RMN ^1H do composto CM1 em CDCl_3

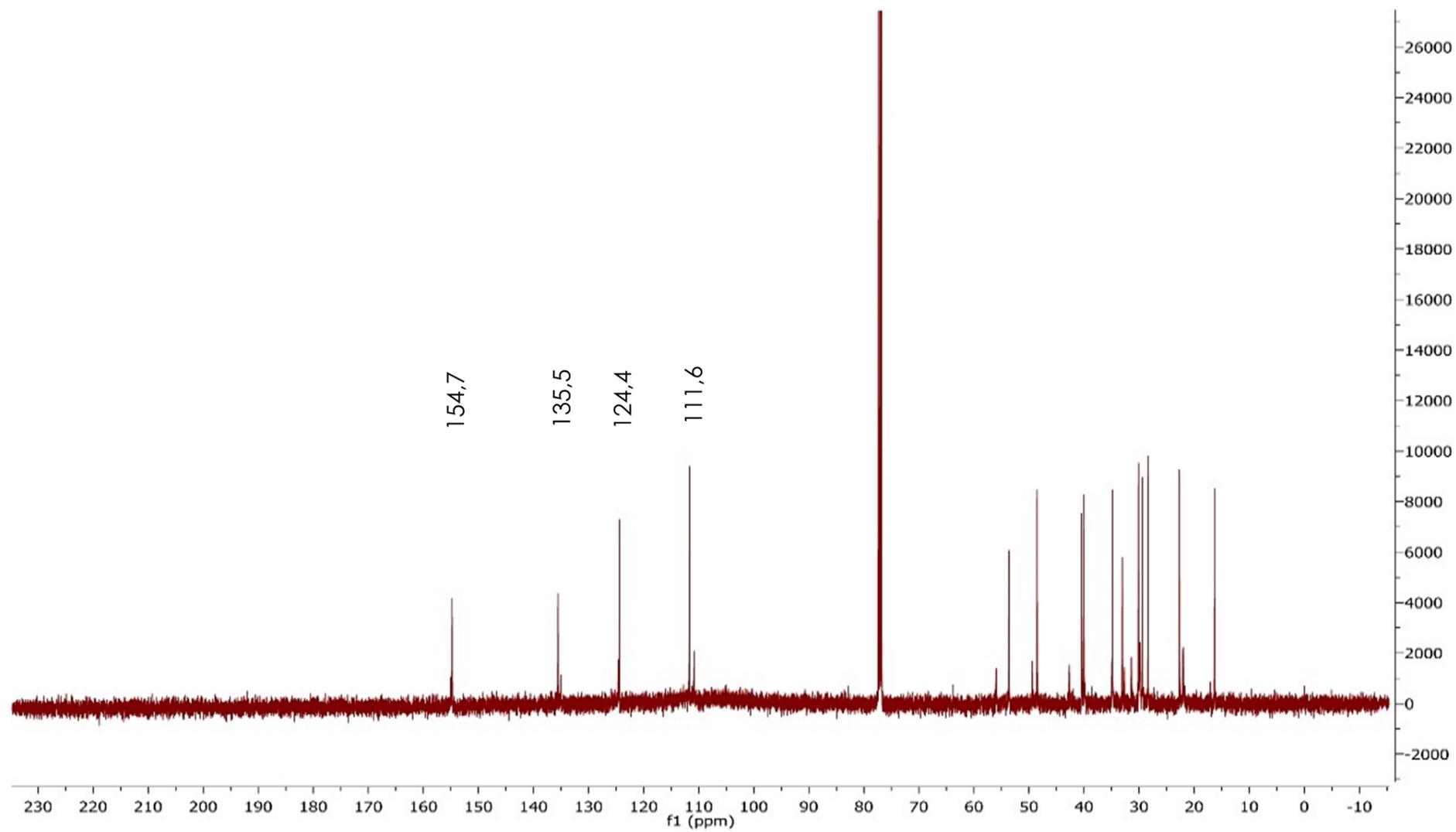


Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C do composto CM1 em CDCl_3

4.5.2 Identificação estrutural do composto CM2

A substância CM2 foi obtida na forma pura, conforme descrito no item 3.1.5 (Figura 7). O composto foi analisado por CG/EM, RMN ^{13}C , RMN ^1H e seus dados espectroscópicos foram comparados com os obtidos da literatura e com o banco de dados NIST, no caso do espectro de massas. Na análise por CG-DIC foi possível observar um único pico com tempo de retenção de 8,86 minutos.

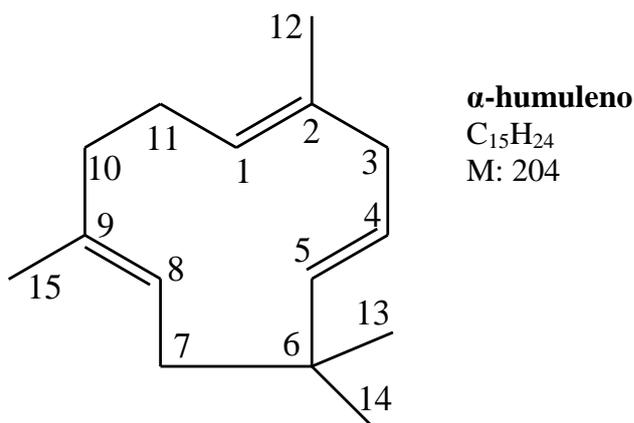


Figura 27. Estrutura do α -humuleno

As atribuições dos sinais no espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram realizadas com auxílio de dados da literatura (HANSON *et al.* 2004). Através da análise de RMN de ^1H de CM2 foi possível evidenciar no espectro a presença de quatro sinais mais desblindados, correspondentes a um multipletto em δ 5,6, um dupletto em δ 5,15, um tripleto em δ 4,95 e outro tripleto em δ 4,87, os quais correspondem aos hidrogênios dos carbonos 4, 5, 1 e 8, respectivamente, enquanto que os demais sinais encontram-se mais blindados e apresentam deslocamentos químicos abaixo de δ 2,55.

Os deslocamentos químicos dos carbonos do espectro de RMN ^{13}C da substância CM2 indicam para a substância a presença de 15 átomos de carbono. Dentre estes, quatro são grupamentos metílicos, quatro são grupamentos metilênicos, quatro são grupamentos metínicos e três são carbonos não hidrogenados.

É possível atribuir a existência de três ligações duplas na molécula, sendo que os picos mais desblindados estão em δ 141,1, 139,2, 133,2, 127,7, 125,9, 125,0 que correspondem aos carbonos C5, C2, C9, C1, C8 e C4, respectivamente, sendo todos carbonos sp^2 .

Para o composto CM2, a comparação do padrão de fragmentação obtido pela análise do composto por CG/EM (Figura 28) com a biblioteca virtual (Wiley 7) levou a confirmação da estrutura do composto α -humuleno, num total de 97% de similaridade.

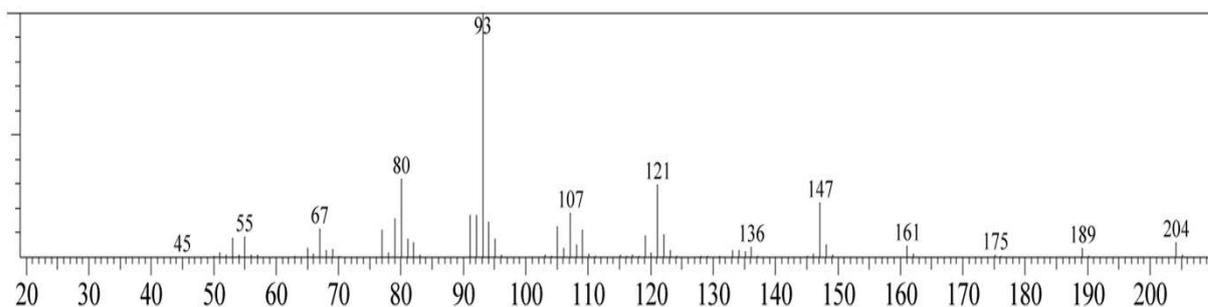


Figura 28. Espectro de massas do composto CM2

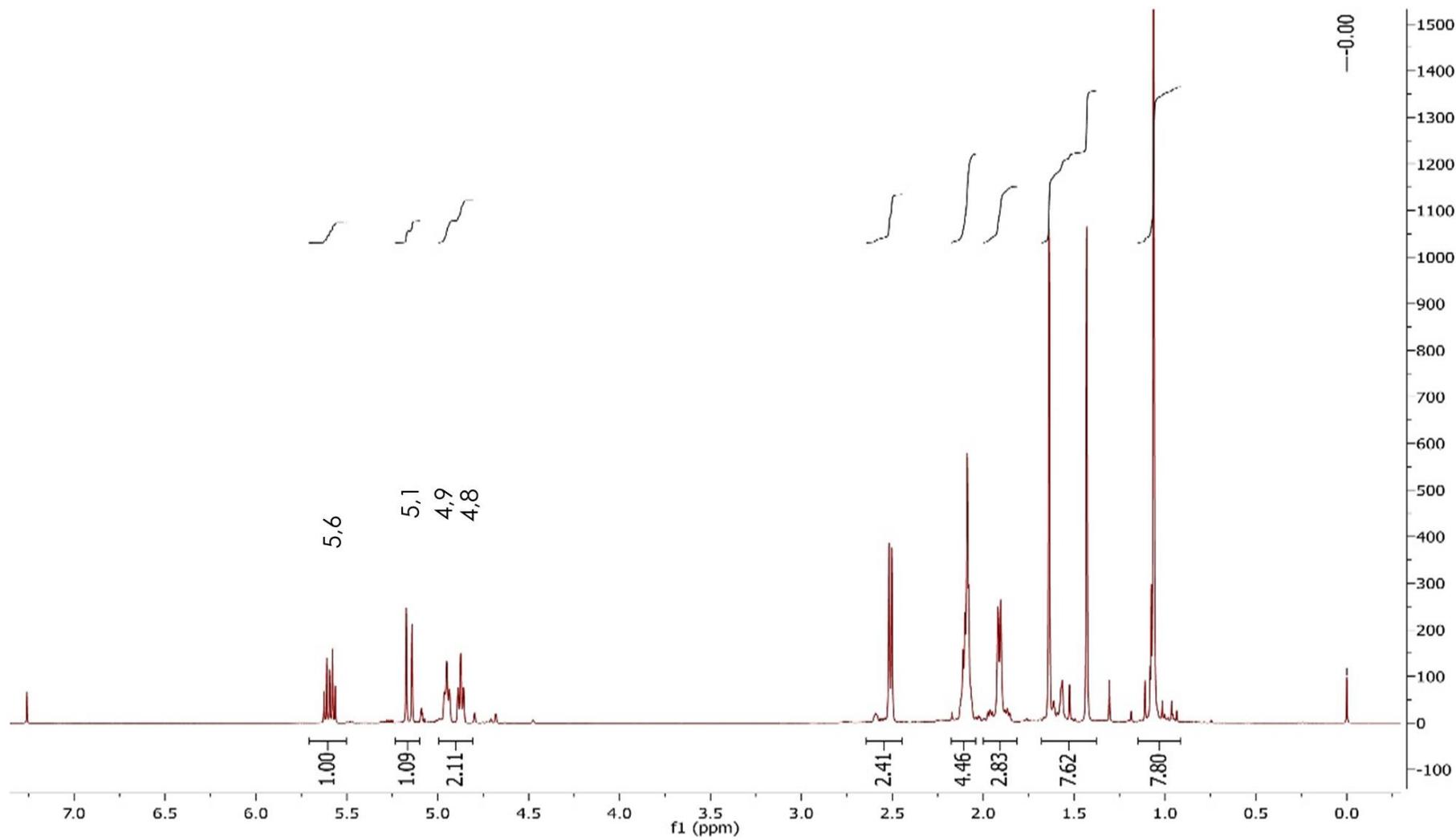


Figura 29. Espectro de RMN ^1H do composto CM2 em CDCl_3

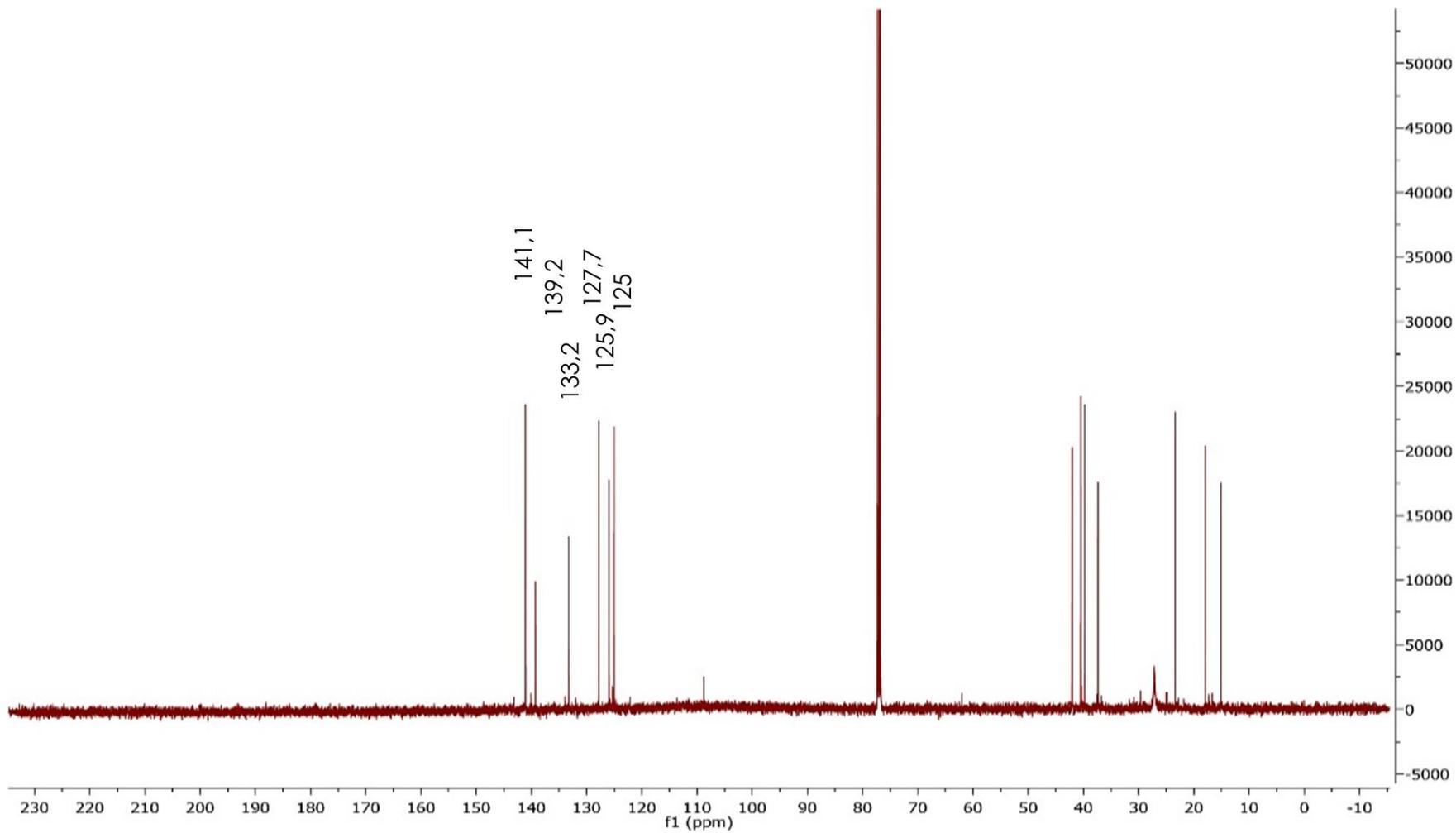


Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C do composto CM2 em CDCl_3

4.5.3 Identificação estrutural do composto CP1

A substância CP1 foi obtida na forma pura, conforme descrito no item 3.1.5 (Figura 9). O composto foi analisado por CG/EM, RMN ^{13}C , RMN ^1H e seus dados espectroscópicos foram comparados com os obtidos da literatura e com o banco de dados NIST, no caso do espectro de massas. Na análise por CG-DIC foi possível observar um único pico com tempo de retenção de 6,55 minutos.

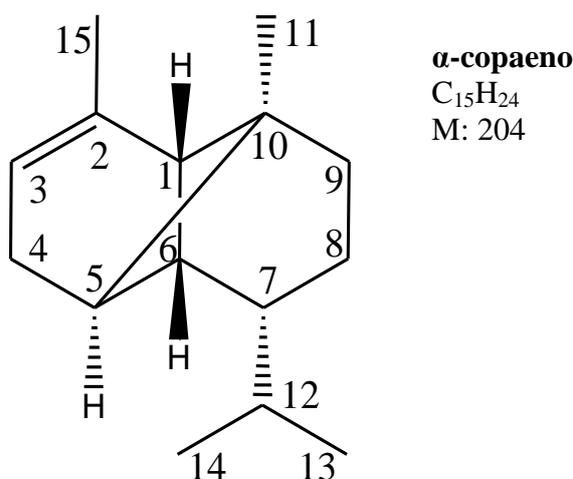


Figura 31. Estrutura do α -copaeno

Por meio da análise de RMN ^1H de CP1 foi possível evidenciar no espectro a presença de um sinal mais desblindado em C 5,21 correspondente ao hidrogênio do carbono 3, enquanto que os demais sinais encontram-se todos mais blindados e apresentam deslocamentos químicos abaixo de δ 2,2.

Os deslocamentos químicos dos carbonos do espectro de RMN ^{13}C da substância CP1 indicam a presença de 15 átomos de carbono. Dentre estes, quatro são grupamentos metílicos, seis são grupamentos metínicos, três são grupamentos metilênicos e dois são carbonos não hidrogenados.

É possível atribuir a existência de uma ligação dupla na molécula, sendo que o sinal em δ 143,9 corresponde ao carbono C2, indicando a presença de um carbono quaternário como parte da ligação dupla e o sinal em δ 116,1 corresponde ao deslocamento químico do carbono C3, sendo os carbonos mais desblindados.

O composto CP1 apresentou massa de 204 u.m.a (Figura 31), evidenciada pelo espectro de massas, com energia do feixe de elétrons em 70 eV. Com o padrão de

fragmentação obtido pela análise do composto CP1 por CG/EM, foi possível realizar uma comparação com bibliotecas virtuais (NIST 08), o que levou a confirmação da estrutura do composto α -copaeno, em um total de 96% de similaridade.

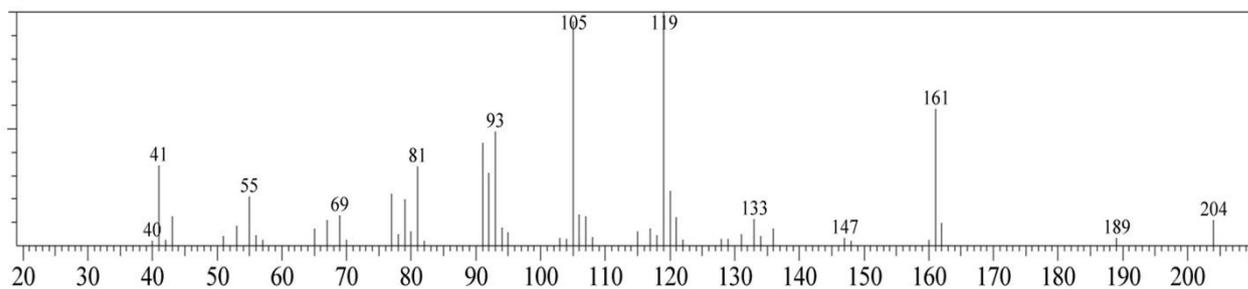


Figura 32. Espectro de massas do composto CP1

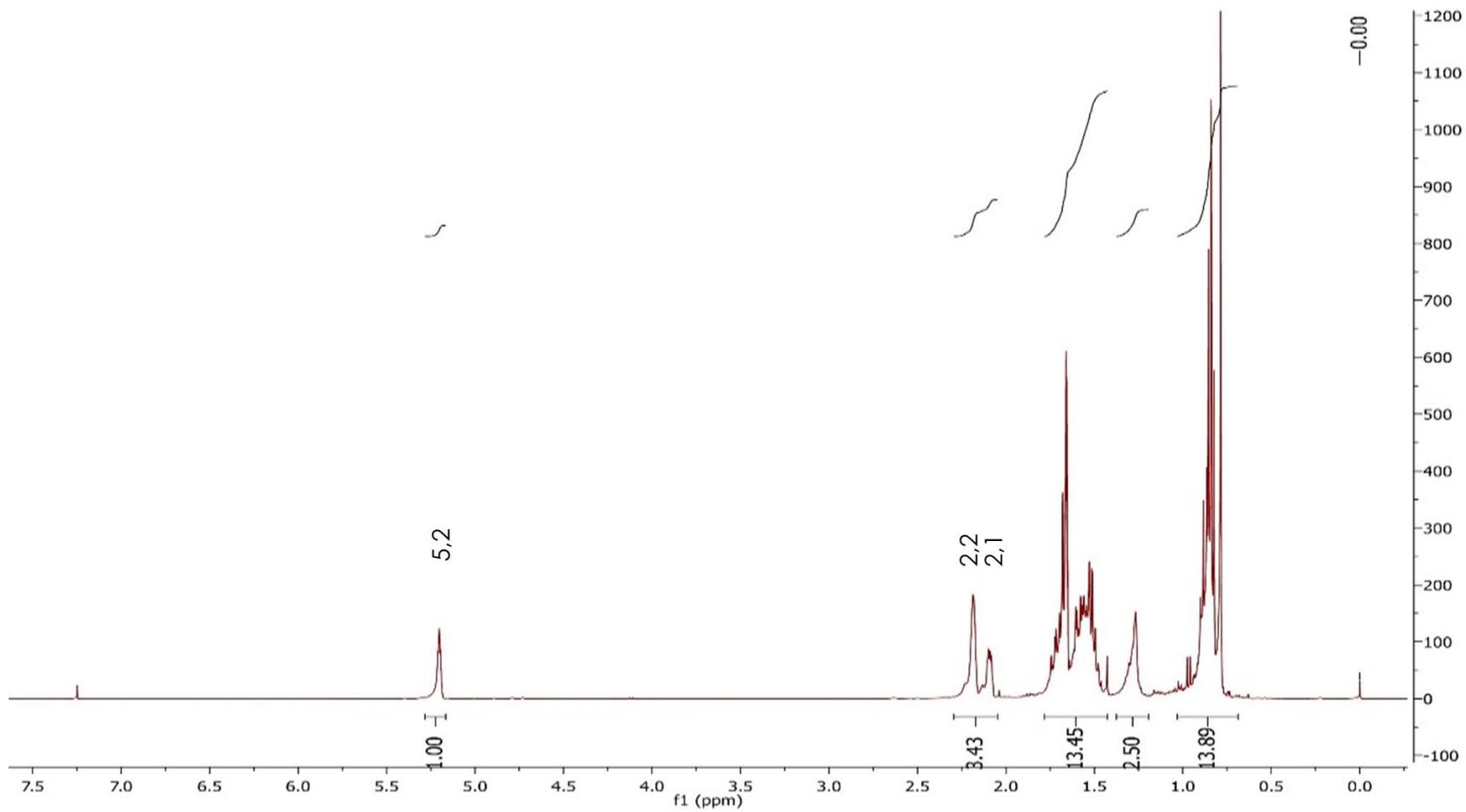


Figura 33. Espectro de RMN ^1H do composto CP1 em CDCl_3

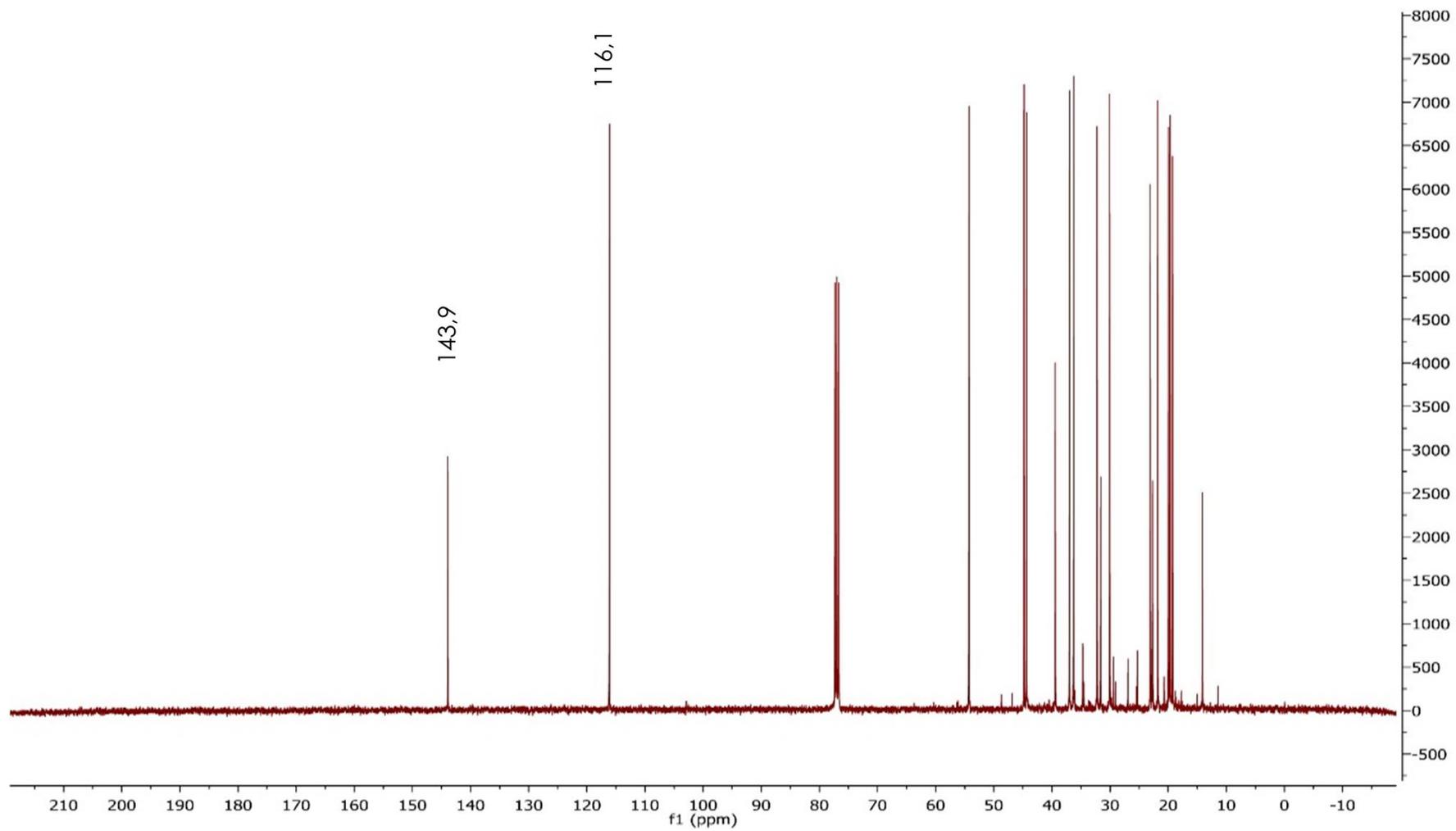


Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C do composto CP1 em CDCl_3

4.5.4 Identificação estrutural do composto CP2

A substância CP2 foi obtida na forma pura, conforme descrito no item 3.1.5 (Figura 10). O composto foi analisado por CG/EM, RMN ^{13}C , RMN ^1H e seus dados espectroscópicos foram comparados com os obtidos da literatura e com o banco de dados NIST, no caso do espectro de massas. Na análise por CG-DIC foi possível observar um único pico com tempo de retenção de 7,42 minutos.

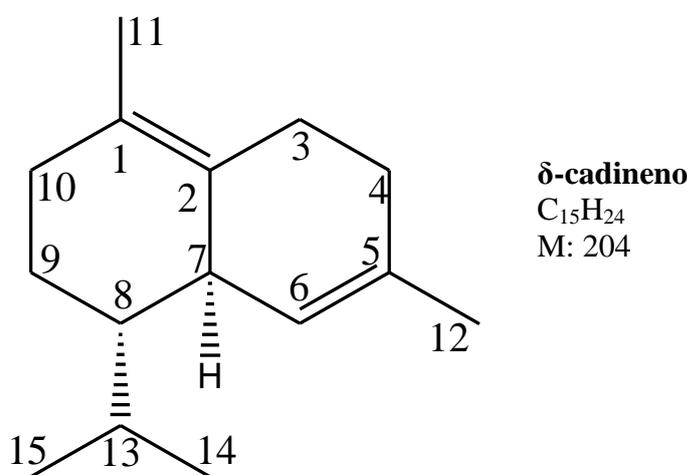


Figura 35. Estrutura do δ -cadineno

Por meio da análise de RMN ^1H de CP2 foi possível evidenciar no espectro a presença de um sinal mais desblindado em C 5,21 correspondente ao hidrogênio do carbono 6, enquanto que os demais sinais encontram-se todos mais blindados e apresentam deslocamentos químicos abaixo de δ 2,75.

Os deslocamentos químicos dos carbonos do espectro de RMN ^{13}C da substância CP2 indicam a presença de 15 átomos de carbono. Dentre estes, quatro são grupamentos metílicos, quatro são grupamentos metínicos, quatro são grupamentos metilênicos e três são carbonos não hidrogenados. É possível atribuir a existência de duas ligações duplas na molécula, sendo os sinais mais desblindados estão em δ 130,7, 129,8, 126,8, 125,1 que correspondem aos carbonos C5, C2, C1 e C6, respectivamente.

O composto CP2 apresentou massa de 220 u.m.a (Figura34), evidenciada pelo espectro de massas. Com o padrão de fragmentação obtido pela análise do composto CP2 por CG/EM foi possível realizar uma comparação com bibliotecas virtuais (Wiley 07), o que levou a confirmação da estrutura do composto δ -cadineno, num total de 94% de similaridade.

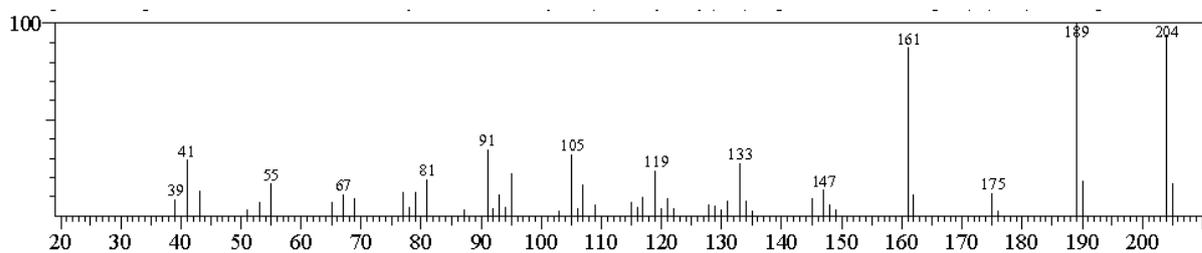


Figura 36. Espectro de massas do composto CP2

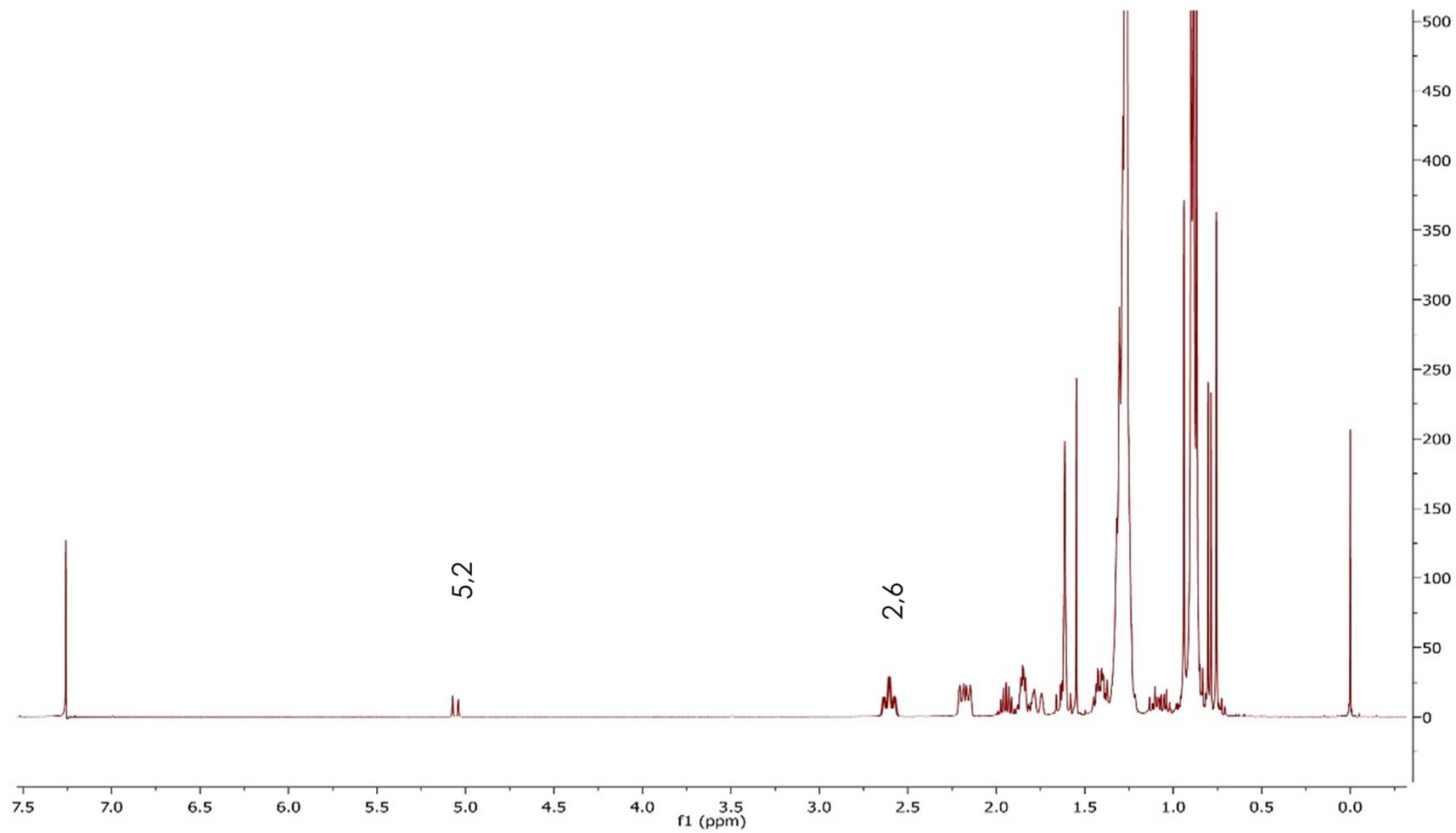


Figura 37. Espectro de RMN ^1H do composto CP2 em CDCl_3

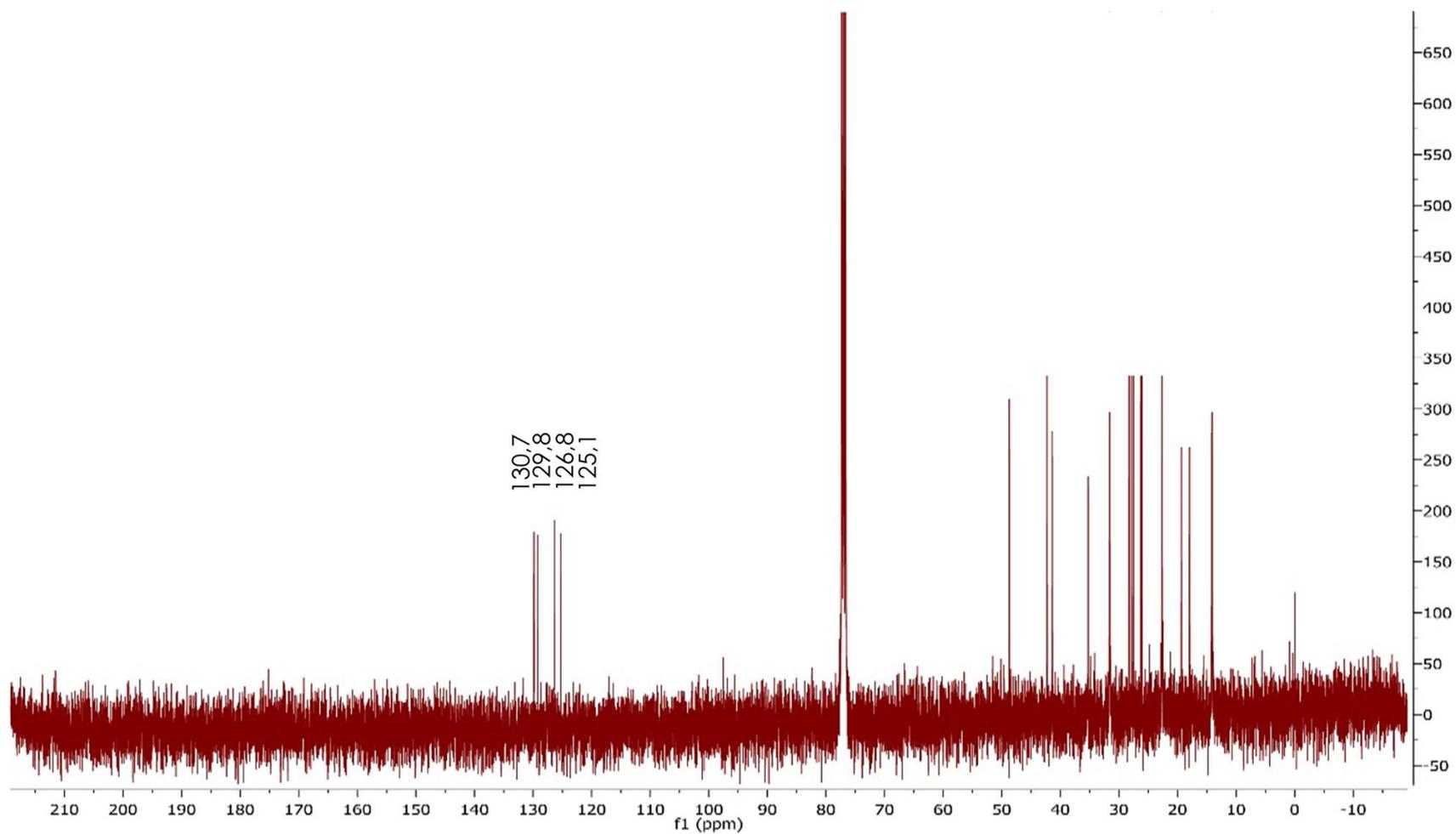


Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C do composto CP2 em CDCl_3

4.5.5 Identificação estrutural do composto CP3

A substância CP3 foi obtida na forma pura, conforme descrito no item 3.1.5 (Figura 10). O composto foi analisado por CG/EM, RMN ^{13}C , RMN ^1H e seus dados espectroscópicos foram comparados com os obtidos da literatura e com o banco de dados Wiley, no caso do espectro de massas. Na análise por CG-DIC foi possível observar um único pico com tempo de retenção de 15,01 minutos.

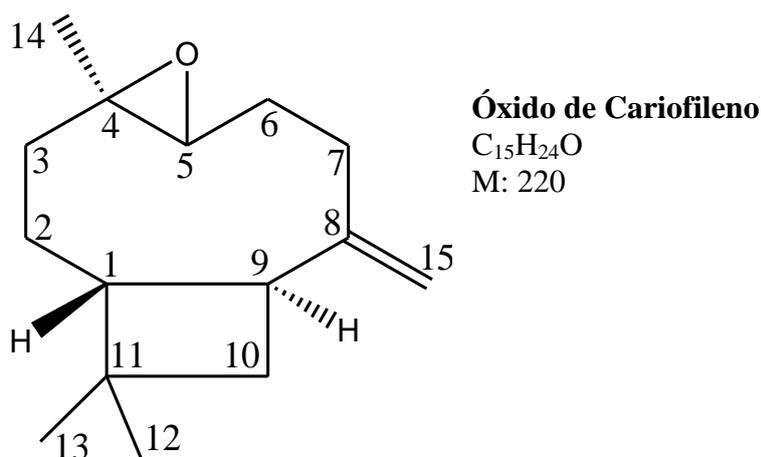


Figura 39. Estrutura do Óxido de Cariofileno

As atribuições dos sinais no espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram realizadas com auxílio dos dados da literatura (Ahmed *et al.*, 2004). Por meio da análise de RMN ^1H de CP3 foi possível evidenciar dois simpletos mais desblindados, correspondentes aos hidrogênios ligados ao carbono exometilênico (C15), com deslocamentos químicos em δ 4,98 e δ 4,86, característicos de hidrogênios olefínicos. O H5, com deslocamento químico de δ 2,87, acopla com os H6a e H6b, apresentando como sinal um duplo duplete (dd), com constantes de acoplamento diferenciadas ($J = 4.6$ e 7.7 Hz). Já os demais sinais encontram-se todos mais blindados e apresentam deslocamentos químicos abaixo de δ 2,75.

Os dados de ressonância magnética nuclear de ^{13}C indicam para CP3 a presença de 15 átomos de carbono. Os deslocamentos químicos do espectro de RMN ^{13}C foram comparados com os dados da literatura para o óxido de cariofileno (Ahmed *et al.*, 2004) e indicam para a substância isolada a presença de três grupamentos metílicos, seis grupamentos metilênicos (sendo 1 deles o grupamento metilênico exocíclico), três grupamentos metínicos e três carbonos não hidrogenados na molécula. Os deslocamentos químicos em δ 151,9 e δ 112,7 evidenciam a presença de uma ligação dupla, a qual corresponde aos carbonos 8 e 15,

respectivamente. Os sinais em δ 63,7 (C5) e δ 59,8 (C4) indicam a presença de um oxigênio ligado sob a forma de éter.

O composto CP3 apresentou massa de 220 u.m.a (Figura 37), evidenciada pelo espectro de massas. Com o padrão de fragmentação obtido pela análise do composto CP3 por CG/EM foi possível realizar uma comparação com bibliotecas virtuais (Wiley 07), o que levou a confirmação da estrutura do composto óxido de cariofileno, num total de 93% de similaridade.

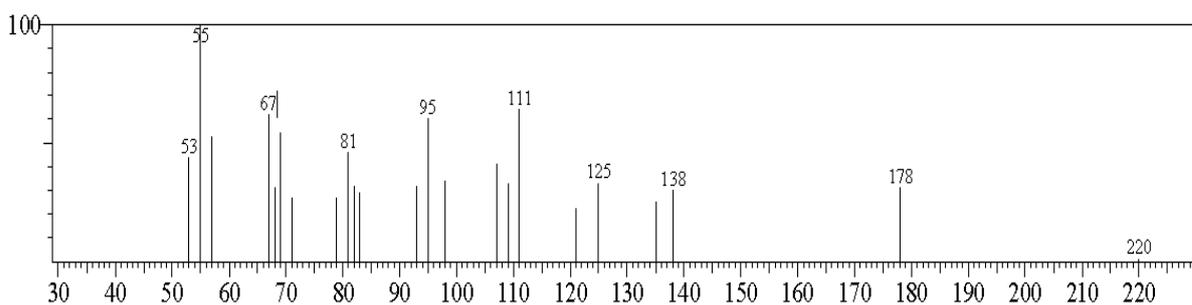


Figura 40. Espectro de massas do composto CP3

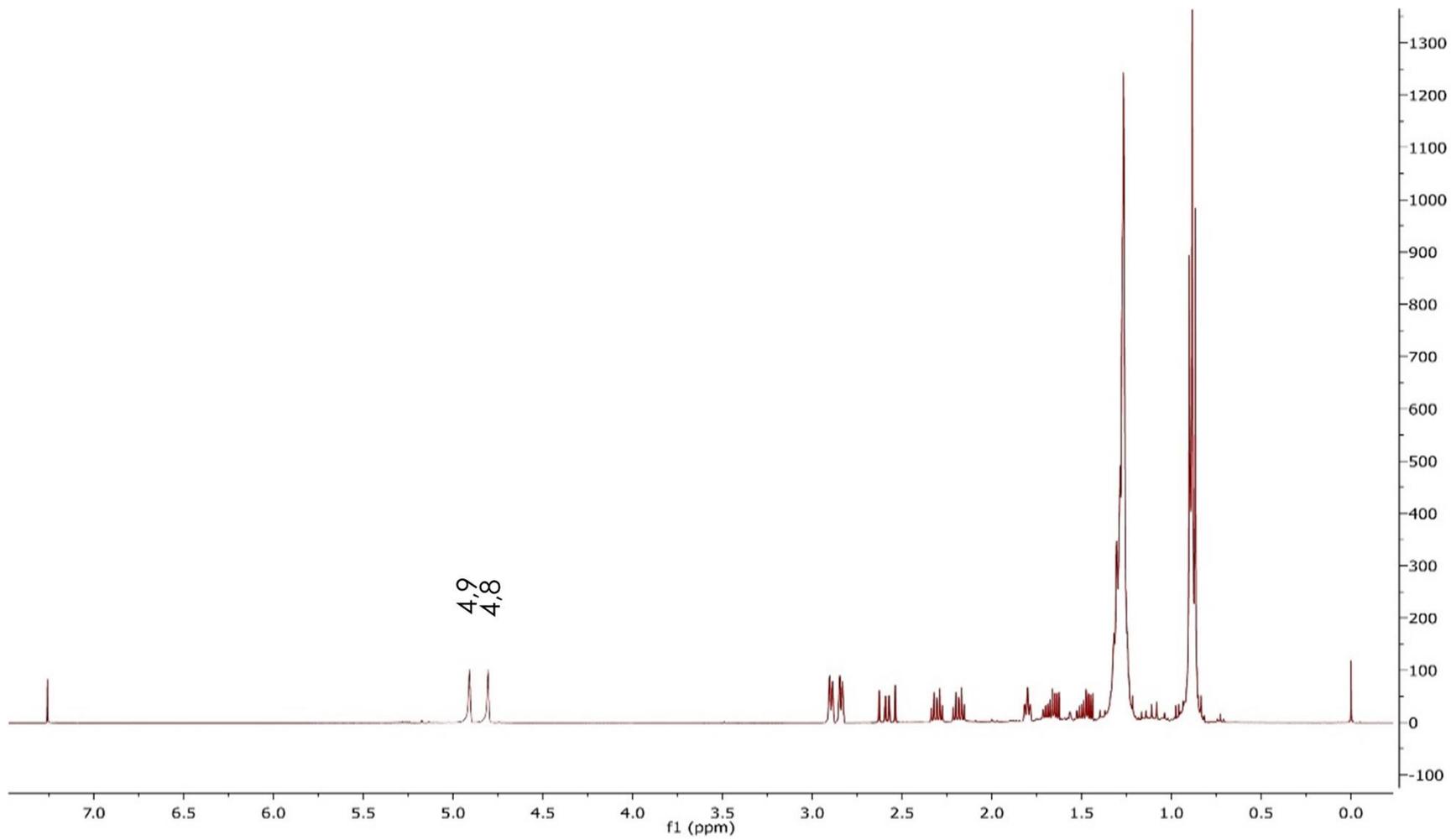


Figura 41. Espectro de RMN ^1H do composto CP3 em CDCl_3

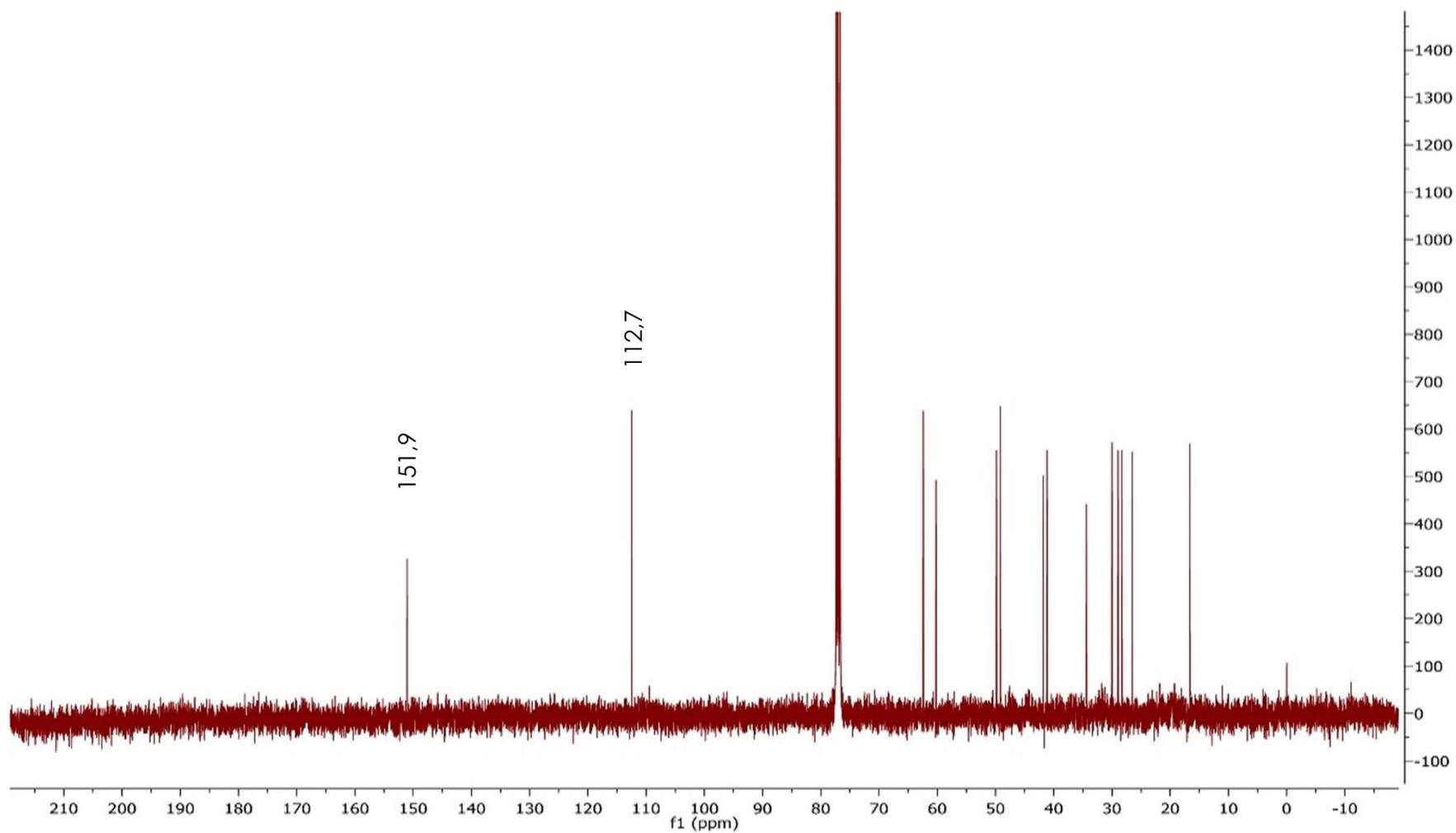


Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C do composto CP3 em CDCl_3

4.5.6 Identificação estrutural do composto CB1

A substância CB1 foi obtida na forma pura, conforme descrito no item 3.1.5 (Figura 8). O composto foi analisado por CG/EM, RMN ^{13}C , RMN ^1H e seus dados espectroscópicos foram comparados com os obtidos da literatura e com o banco de dados NIST, no caso do espectro de massas. Na análise por CG-DIC foi possível observar um único pico com tempo de retenção de 6,92 minutos.

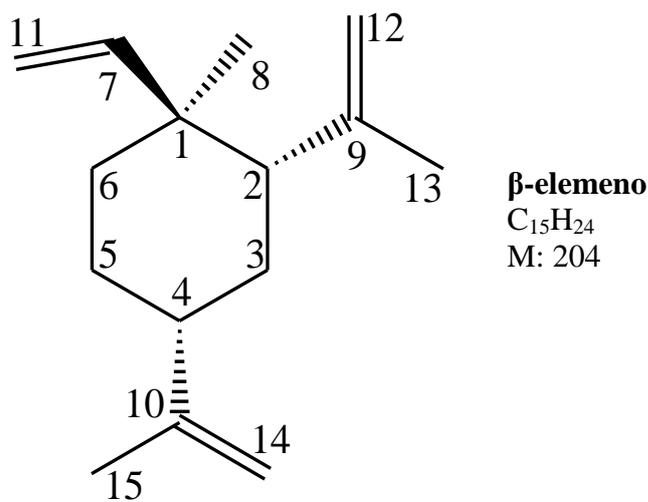


Figura 43. Estrutura do β -elemeno

As atribuições dos sinais no espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram realizadas com auxílio dos dados da literatura (KIM *et al.*, 2000). Por meio da análise de RMN ^1H de CB1 foi possível evidenciar no espectro a presença de um sinal mais desblindado em δ 5,82 correspondente ao hidrogênio do carbono 7 que acopla com os hidrogênios H11a e H11b apresentando como sinal um duplo duplete (dd), com constantes de acoplamento $J = 17.5$ e 10.9 Hz, enquanto que os demais sinais encontram-se todos mais blindados e apresentam deslocamentos químicos abaixo de δ 5,0.

Os deslocamentos químicos dos carbonos do espectro de RMN ^{13}C da substância CP1 indicam a presença de 15 átomos de carbono. Dentre estes, três são grupamentos metílicos, seis são grupamentos metilênicos, três são grupamentos metínicos e três são carbonos não hidrogenados. É possível atribuir a existência de três ligações duplas na molécula, sendo que os sinais mais desblindados estão em δ 150.4, 150.3, 147.7, 112.1, 109.8, 108.2 que correspondem aos carbonos C10, C9, C7, C14, C12 e C11, respectivamente.

O composto CB1 apresentou massa de 204 u.m.a (Figura 40), evidenciada pelo espectro de massas, com energia do feixe de elétrons em 70 eV. Com o padrão de fragmentação obtido pela análise do composto CB1 por CG/EM foi possível realizar uma comparação com bibliotecas virtuais (NIST), o que levou a confirmação da estrutura do composto β -elemeno, num total de 97% de similaridade.

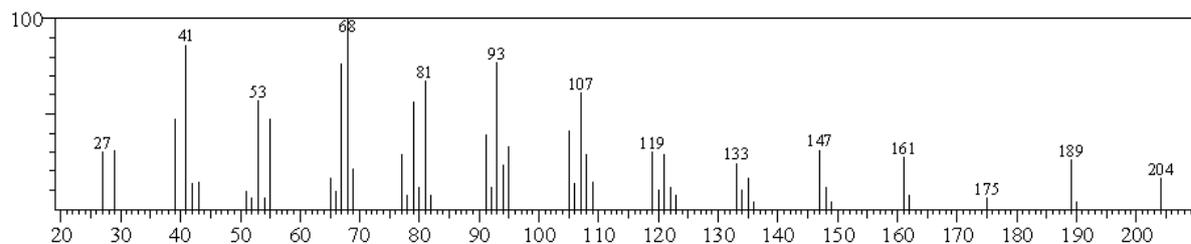


Figura 44. Espectro de massas do composto CB1

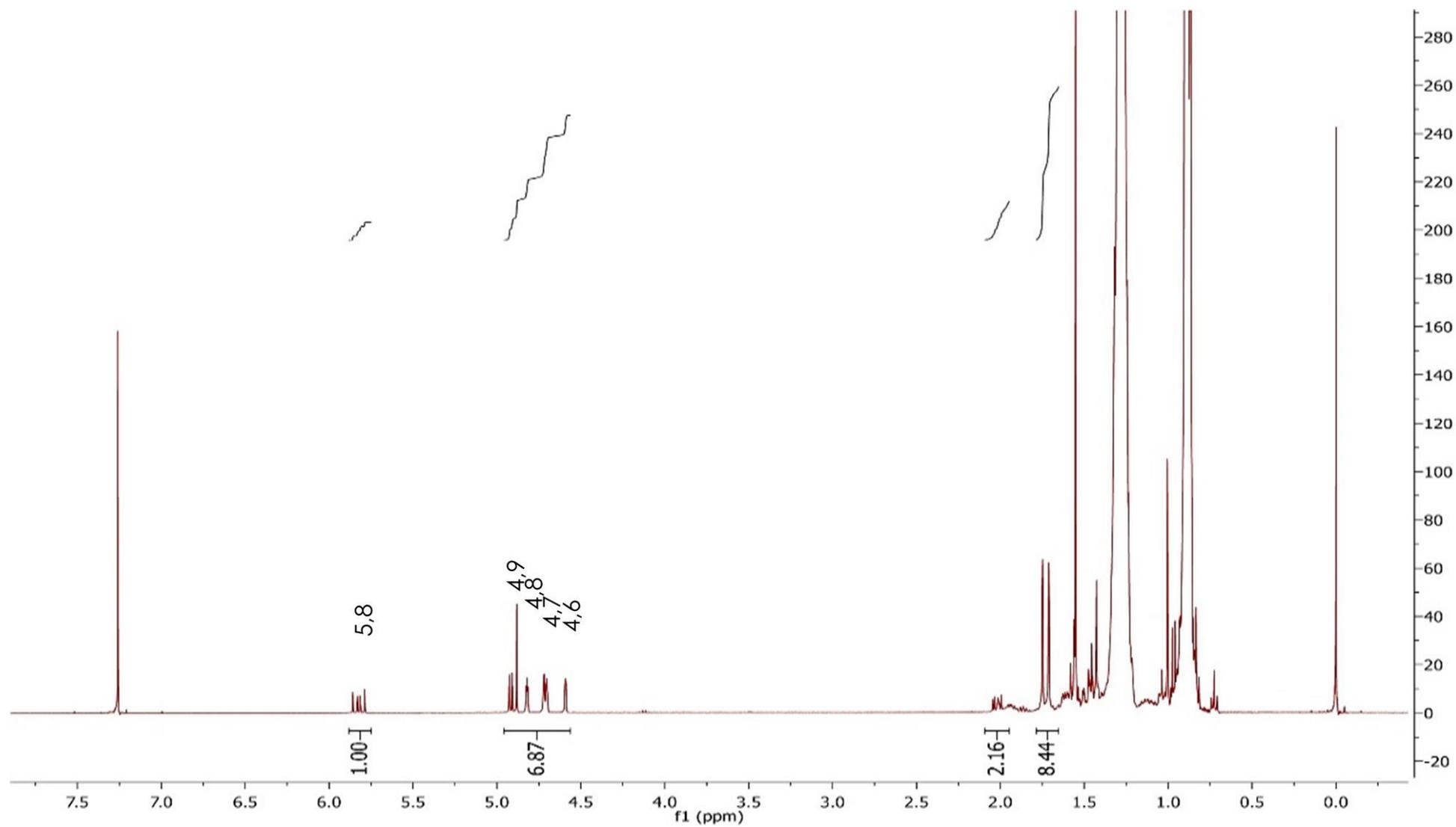


Figura 45. Espectro de RMN ^1H do composto CB1 em CDCl_3

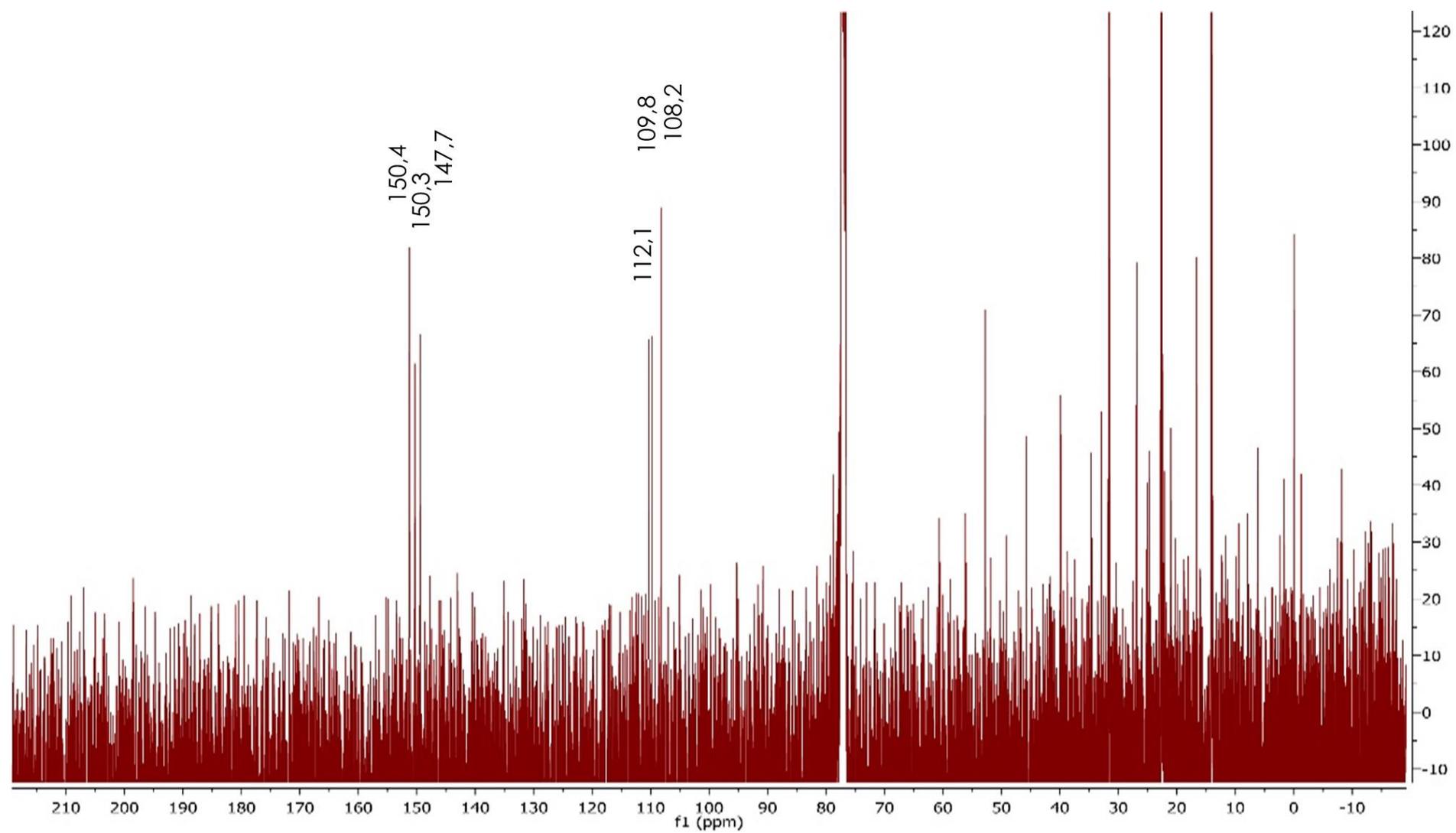


Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C do composto CB1 em CDCl_3

4.6 Desenvolvimento e validação de método analítico

A cromatografia de fase gasosa por detecção de ionização em chama (CG-DIC) empregando-se colunas capilares e padronização interna para a análise de compostos voláteis tem sido empregada com sucesso na análise quantitativa de compostos presentes em óleos essenciais (SIMÕES, 2003). As substâncias isoladas são de baixa polaridade, por isso o solvente hexano foi selecionado como agente diluente. Do ponto de vista quantitativo, foi necessário a utilização de padronização interna, visto que, desta forma, muitos erros experimentais são minimizados. Para a escolha do padrão interno foram realizadas análises de alguns compostos, avaliando-se os tempos de retenção dos mesmos, os quais não deveriam coincidir com nenhum pico das amostras, sendo a benzofenona o padrão interno de escolha.

Um dos objetivos principais deste trabalho foi o desenvolvimento de um método cromatográfico para a quantificação dos marcadores químicos dos óleos voláteis de *Copaifera*. Uma vez estabelecidas as condições cromatográficas e o preparo das amostras, deu-se início a validação do método, onde verificou-se:

4.6.1 Seletividade

Para determinar a seletividade do método analítico, os perfis cromatográficos dos compostos e dos óleos foram analisados separadamente e em triplicata através do método analítico desenvolvido. Parâmetros como largura da base do pico (Wb), número de pratos teóricos (N) e resolução foram calculados e avaliados. Seus valores, bem como seus respectivos CV(%), encontram-se na Tabela 7. Por meio dos resultados obtidos foi possível avaliar a seletividade da fase móvel com relação aos compostos de interesse, bem como determinar a eficiência da coluna cromatográfica.

Tabela 7. Respostas que compõem a seletividade do método (n = 5).

Amostras	Wb ± DP	CV	N ± DP	CV	Resolução ± DP	CV
α-Copaeno	0,0474 ± 0,0001	0,26	305101,46 ± 1962,12	0,64	1,17 ± 0,02	1,85
β-Elemeno	0,0547 ± 0,0004	0,78	256115,18 ± 4825,84	1,88	1,16 ± 0,01	0,79
δ-Cadineno	0,0529 ± 0,0005	0,96	314875,11 ± 7491,30	2,38	1,17 ± 0,01	1,34
β-Cariofileno	0,0553 ± 0,0001	0,17	328621,88 ± 1374,02	0,42	1,12 ± 0,01	1,34
α-Humuleno	0,0630 ± 0,0001	0,20	315785,92 ± 1531,45	0,48	1,68 ± 0,01	0,82
O-Cariofileno	0,0968 ± 0,0016	1,63	384480,17 ± 15094,10	3,93	1,19 ± 0,01	0,62

Wb: largura da base do pico; N: número de pratos teóricos; DP: Desvio padrão

De modo geral, número de pratos teóricos (N) acima de 2000 indica excelente eficiência da coluna. Quanto ao coeficiente de variação, considerando determinações na escala macro, com amostras de baixa para média complexidade, valores até 5% são aceitáveis. Já para amostras de alta complexidade, determinadas na escala micro ou traços, estes valores podem atingir até 20% demonstrando ótimos resultados para a seletividade do método analítico (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

4.6.2 Linearidade

Segundo a RDC 899/2003 da ANVISA, a curva analítica deve ser construída a partir de, no mínimo, cinco pontos e as concentrações definidas devem contemplar a concentração do limite inferior de quantificação até 120% da concentração mais alta da curva. As curvas foram confeccionadas contendo nove pontos, conforme descrito na seção de material e métodos. Utilizando-se os dados obtidos, foram construídas curvas analíticas utilizando-se o software Microsoft Excel[®], o que possibilitou também a obtenção da equação da reta e o valor do coeficiente de correlação linear (R^2).

Os resultados listados na tabela 8 demonstram que a resposta de linearidade, para o método desenvolvido, foi adequada para todos os compostos.

Tabela 8. Dados obtidos para construção da curva analítica de α -copaeno, β -Cariofileno e α -humuleno (n=5)

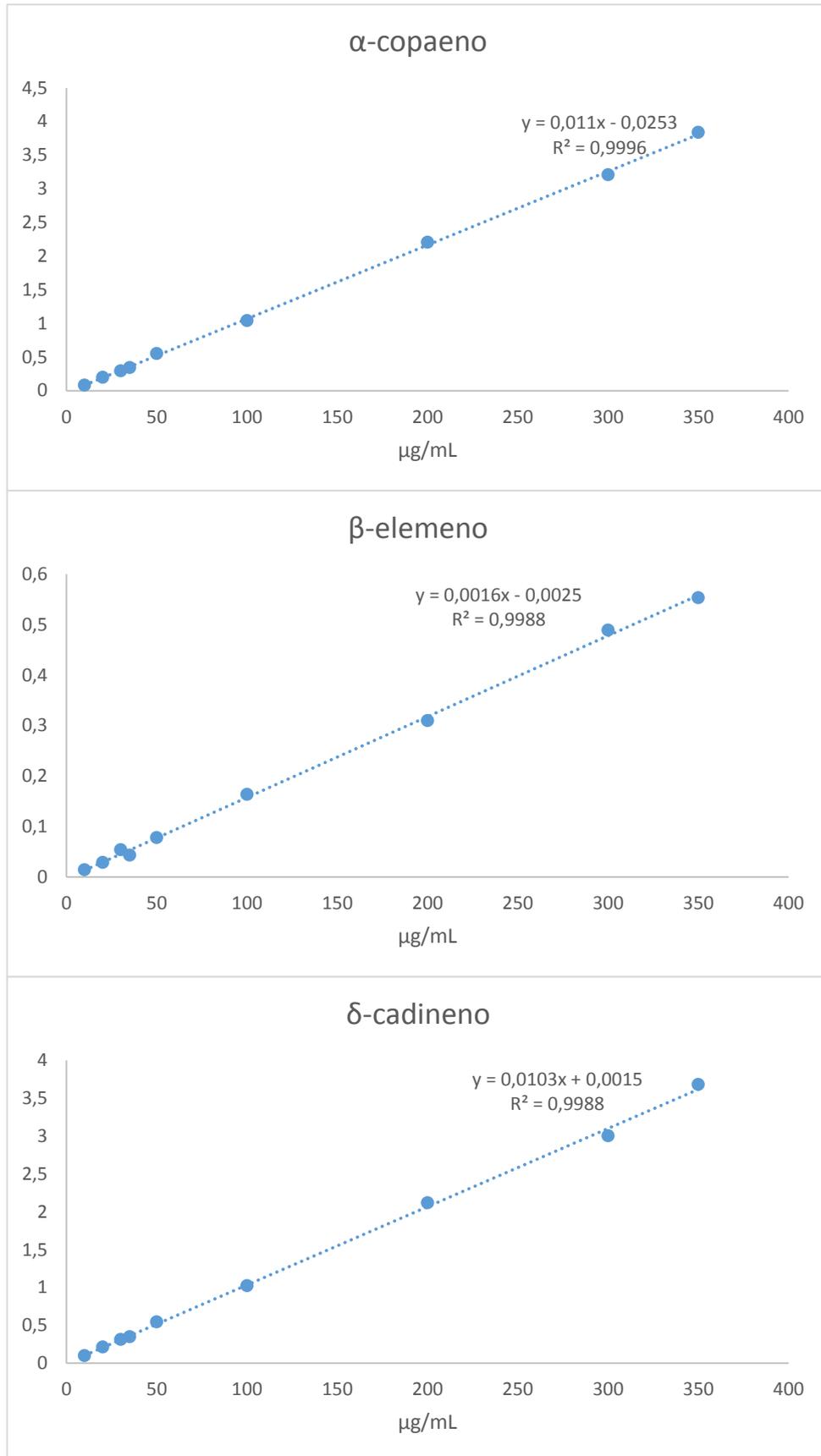
α-copaeno			β-elemeno		
C ($\mu\text{g/mL}$)	Área \pm DP	CV (%)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Área \pm DP	CV (%)
350	326,04 \pm 9,75	2,99	350	46,96 \pm 1,49	3,18
300	273,04 \pm 10,63	3,89	300	41,56 \pm 1,77	4,27
200	186,96 \pm 4,54	2,43	200	26,24 \pm 1,42	5,42
100	88,2 \pm 4,85	5,49	100	13,82 \pm 0,86	6,21
50	48,88 \pm 4,21	8,61	50	6,9 \pm 0,60	8,64
35	29,12 \pm 2,27	7,81	35	4,56 \pm 0,21	4,55
30	24,18 \pm 1,23	5,09	30	3,52 \pm 0,25	7,07
20	16,34 \pm 1,04	6,37	20	2,325 \pm 0,17	7,35
10	6,8 \pm 0,57	8,38	10	1,14 \pm 0,05	4,80
δ-cadineno			β-Cariofileno		
C ($\mu\text{g/mL}$)	Área \pm DP	CV (%)	C ($\mu\text{g/mL}$)	Área \pm DP	CV (%)
350	312,54 \pm 7,58	2,43	350	324,32 \pm 8,61	2,65
300	255,34 \pm 10,19	3,99	300	284,42 \pm 11,52	4,05
200	179,28 \pm 7,32	4,08	200	185,56 \pm 6,54	3,52
100	86,36 \pm 4,11	4,76	100	90,72 \pm 5,29	5,83
50	48,2 \pm 2,16	4,49	50	52 \pm 3,01	5,79
35	29,38 \pm 1,79	6,09	35	33,12 \pm 1,40	4,23

30	25,54 ± 0,70	2,74	30	27,74 ± 1,57	5,67
20	17,22 ± 0,97	5,65	20	18,42 ± 0,86	4,66
10	7,96 ± 0,63	7,93	10	10,46 ± 0,40	3,86
α-humuleno			O-Cariofileno		
C (µg/mL)	Área ± DP	CV (%)	C (µg/mL)	Área ± DP	CV (%)
350	287,2 ± 9,55	3,33	350	57,54 ± 2,06	3,58
300	251,66 ± 14,72	5,85	300	49,06 ± 2,44	4,98
200	164,66 ± 4,55	2,89	200	32,94 ± 1,21	3,68
100	82,5 ± 1,88	2,28	100	16,34 ± 0,39	2,39
50	44,22 ± 1,50	3,39	50	8,44 ± 0,37	4,56
35	29,12 ± 0,94	3,23	35	5,58 ± 0,20	3,67
30	23,22 ± 1,07	4,60	30	4,56 ± 0,24	5,28
20	15,22 ± 0,69	4,51	20	3,16 ± 0,11	3,61
10	7,84 ± 0,25	3,20	10	1,7 ± 0,16	9,30

A ANVISA preconiza que o valor do coeficiente de correlação linear seja superior a 0,99, o que pôde ser observado para os compostos estudados. Portanto, este se encontra dentro do limite estabelecido pela legislação vigente. A partir das equações obtidas foram deduzidas as equações para quantificação dos compostos. Outros dados que também foram obtidos da curva analítica foram a estimativa do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ), sendo estes calculados segundo as fórmulas matemáticas descritas em material e métodos e descritos na tabela 9.

Tabela 9. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) (n = 5)

	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)		LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
α-copaeno	1,89	5,74	β-cariofileno	1,67	5,07
β-elemenno	3,00	8,08	α-humuleno	2,22	6,72
δ-cadineno	2,19	6,64	O-cariofileno	3,95	9,96



Continua na próxima página.

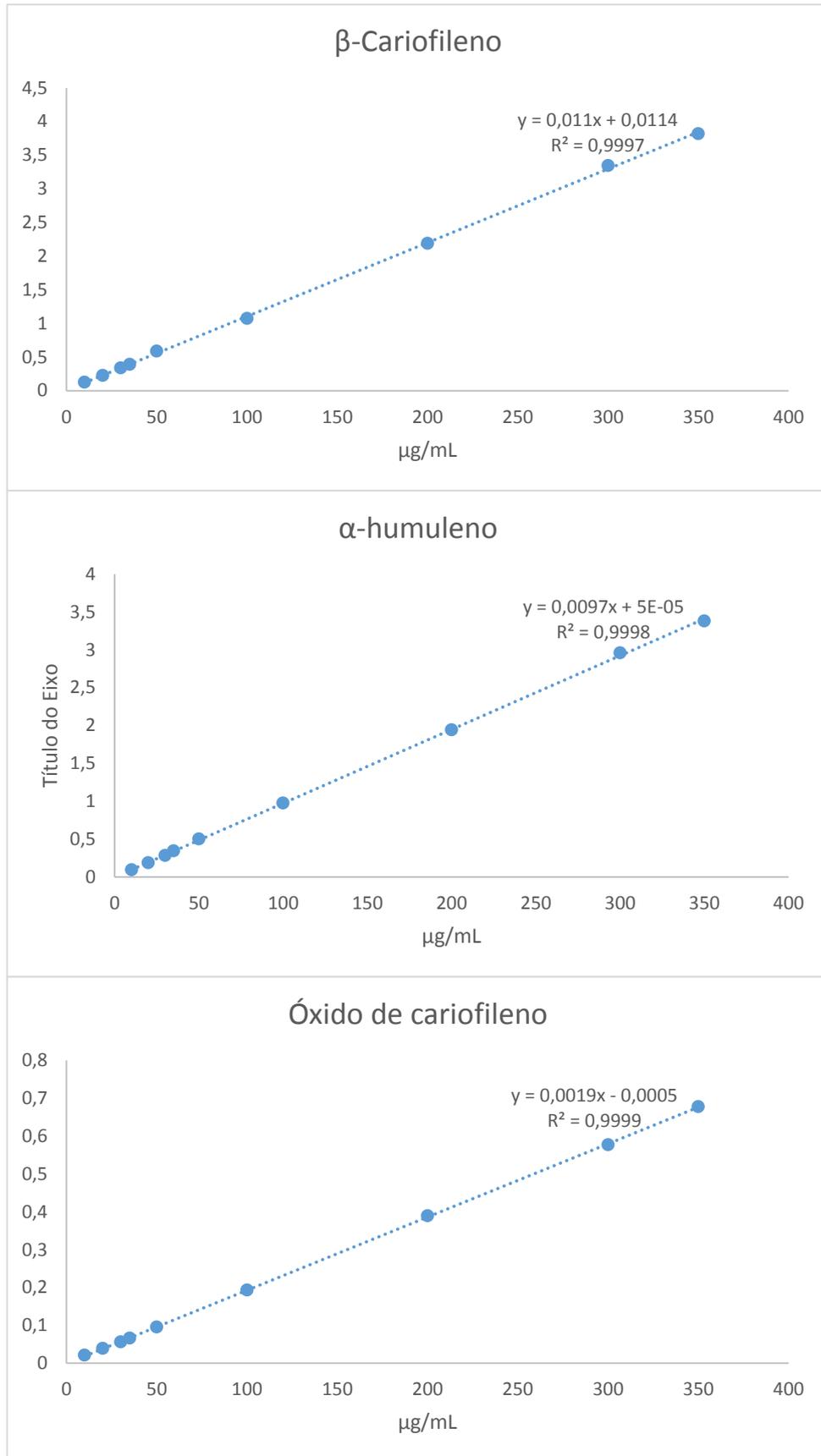


Figura 47. Curvas analíticas para α-copaeno, β-elemeno, δ-cadineno, β-Cariofileno, α-Humuleno e O-Cariofileno.

4.6.3 Precisão

A análise de precisão foi dada pela repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade do método foi determinada por meio da análise de três soluções de concentrações conhecidas em 300 µg/mL, 100 µg/mL e 20 µg/mL em triplicata no mesmo dia. Já a precisão intermediária seguiu os mesmos parâmetros da repetibilidade, porém foi realizada em três dias consecutivos. A área do pico e o tempo de retenção dos compostos nos óleos voláteis foi a resposta avaliada. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10. Precisão do método analítico (n=5)

Repetibilidade			Intermediária		
300 µg/mL			300 µg/mL		
	Área do Pico ± DP	CV(%)		Área do Pico ± DP	CV(%)
α-Copaeno	280,43 ± 2,80	1,00	α-Copaeno	268,11 ± 11,27	4,21
β-Elemeno	40,83 ± 1,65	4,06	β-Elemeno	42,04 ± 1,63	3,88
δ-Cadineno	261,33 ± 3,57	1,37	δ-Cadineno	251,34 ± 11,61	4,62
β-Cariofileno	276,40 ± 4,32	1,56	β-Cariofileno	268,77 ± 11,81	4,08
α-Humuleno	247,60 ± 12,05	4,87	α-Humuleno	254,37 ± 16,15	4,35
O-Cariofileno	48,83 ± 1,22	2,50	O-Cariofileno	49,21 ± 3,21	3,54
Benzofenona	85,40 ± 1,30	1,52	Benzofenona	84,80 ± 1,03	1,23
100 µg/mL			100 µg/mL		
	Área do Pico ± DP	CV(%)		Área do Pico ± DP	CV(%)
α-Copaeno	91,57 ± 1,42	1,56	α-Copaeno	85,96 ± 5,10	4,93
β-Elemeno	13,60 ± 0,43	3,21	β-Elemeno	13,97 ± 1,09	4,85
δ-Cadineno	87,97 ± 2,92	3,33	δ-Cadineno	85,29 ± 4,58	4,37
β-Cariofileno	93,87 ± 1,68	1,79	β-Cariofileno	88,62 ± 6,05	4,83
α-Humuleno	83,73 ± 1,16	1,39	α-Humuleno	81,68 ± 1,78	2,18
O-Cariofileno	16,33 ± 0,55	3,37	O-Cariofileno	16,34 ± 0,05	0,31
Benzofenona	85,87 ± 2,13	2,49	Benzofenona	83,66 ± 3,68	4,41
20 µg/mL			20 µg/mL		
	Área do Pico ± DP	CV(%)		Área do Pico ± DP	CV(%)
α-Copaeno	15,87 ± 0,77	4,90	α-Copaeno	16,66 ± 1,09	4,55
β-Elemeno	2,40 ± 0,10	4,17	β-Elemeno	2,25 ± 0,21	4,43
δ-Cadineno	16,97 ± 0,66	3,92	δ-Cadineno	17,39 ± 1,15	4,67
β-Cariofileno	18,80 ± 0,45	2,44	β-Cariofileno	18,17 ± 1,01	4,57
α-Humuleno	15,23 ± 0,55	3,62	α-Humuleno	15,21 ± 0,80	4,26
O-Cariofileno	3,10 ± 0,10	3,23	O-Cariofileno	3,20 ± 0,10	3,13
Benzofenona	80,47 ± 3,90	4,86	Benzofenona	82,62 ± 2,21	2,69
	Tr (min) ± DP	CV(%)		Tr (min) ± DP	CV(%)
α-Copaeno	6,55 ± 0,07	0,015	α-Copaeno	6,50 ± 0,06	0,010
β-Elemeno	6,92 ± 0,04	0,008	β-Elemeno	6,97 ± 0,04	0,007
δ-Cadineno	7,42 ± 0,04	0,008	δ-Cadineno	7,46 ± 0,05	0,007
β-Cariofileno	7,93 ± 0,04	0,007	β-Cariofileno	7,92 ± 0,08	0,011

α -Humuleno	8,86 \pm 0,08	0,011	α -Humuleno	8,84 \pm 0,07	0,008
O-Cariofileno	15,01 \pm 0,02	0,004	O-Cariofileno	15,01 \pm 0,01	0,001
Benzofenona	16,09 \pm 0,03	0,004	Benzofenona	16,11 \pm 0,02	0,001

Analisando-se os resultados obtidos, tanto para repetibilidade quanto para precisão intermediária, nota-se que os valores de coeficiente de variação estão abaixo de 5%. Os dados obtidos das análises da precisão inter-dias foram bem semelhantes aos obtidos da precisão intra-dia, o que mostra uma mínima variação entre os resultados obtidos nas análises. Conforme a RDC 899/2003 da ANVISA o valor máximo do CV% para a precisão é de 5%, portanto o método atende às normas descritas pela ANVISA. Dessa forma, pode-se dizer que o método em estudo apresenta boa precisão.

4.6.4 Recuperação e Exatidão

O estudo da exatidão foi realizado por meio da análise dos mesmos pontos avaliados na precisão, porém foi observado a capacidade do método de atribuir a concentração real dos compostos. A recuperação foi realizada com a fortificação dos óleos de *Copaifera langsdorffii*, *C. duckey*, *C. multijuga*, *C. paupera*, *C. reticulata* e *C. publiflora* em diferentes concentrações em níveis médio, alto e baixo. O procedimento de recuperação permite avaliar o quanto do composto é possível recuperar durante o processo analítico, e também possibilitando os cálculos para a determinação da exatidão do método. Esses cálculos são dados pelo percentual do erro relativo entre os valores reais e teóricos das concentrações de cada composto em questão. Os valores de exatidão obtidos da curva analítica encontram-se descritos na Tabela 11 e os de fortificação dos óleos voláteis na tabela 12.

Tabela 11. Resultados obtidos nos estudos de exatidão na análise dos sesquiterpenos

Maior (300 $\mu\text{g/mL}$)	CR ($\mu\text{g/mL}$)	CT ($\mu\text{g/mL}$)	E (%)	Rec.(%)	CV%
α -Copaeno	300,82	300	0,27	99,73	1,00
β -Elemeno	300,40	300	0,13	99,87	4,06
δ -Cadineno	297,24	300	-0,92	100,93	1,37
β -Cariofileno	295,27	300	-1,58	101,60	1,56
α -Humuleno	298,90	300	-0,37	100,37	4,87
O-Cariofileno	301,22	300	0,41	99,59	2,50
Médio (100 $\mu\text{g/mL}$)	CR ($\mu\text{g/mL}$)	CT ($\mu\text{g/mL}$)	E (%)	Rec.(%)	CV%
α -Copaeno	99,24	100	-0,76	100,76	1,56
β -Elemeno	100,55	100	0,55	99,45	3,21
δ -Cadineno	99,61	100	-0,39	100,39	3,33
β -Cariofileno	100,42	100	0,42	99,59	1,79
α -Humuleno	100,54	100	0,54	99,47	1,39
O-Cariofileno	100,38	100	0,38	99,62	3,37

Menor (20 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)	CV%
α-Copaeno	20,23	20	1,13	98,88	4,90
β-Elemeno	20,20	20	1,02	98,99	4,17
δ-Cadineno	20,62	20	3,08	97,01	3,92
β-Cariofileno	22,28	20	11,38	89,78	2,44
α-Humuleno	19,52	20	-2,39	102,45	3,62
O-Cariofileno	20,54	20	2,70	97,37	3,23

Tabela12. Resultados obtidos nos estudos de recuperação dos sesquiterpenos nos óleos

<i>C. multijuga</i>					<i>C. paupera</i>				
Maior (60 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)	Maior (60 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)
α-Copaeno	59,81	60	0,32	99,68	α-Copaeno	67,24	60	-10,77	112,07
β-Elemeno	56,72	60	5,78	94,53	β-Elemeno	55,47	60	8,17	92,45
δ-Cadineno	59,00	60	1,69	98,33	δ-Cadineno	59,33	60	1,13	98,88
β-Cariofileno	62,73	60	-4,35	104,55	β-Cariofileno	58,38	60	2,77	97,30
α-Humuleno	58,92	60	1,83	98,20	α-Humuleno	57,43	60	4,48	95,72
O-Cariofileno	56,39	60	6,40	93,98	O-Cariofileno	56,78	60	5,67	94,63
Médio (30 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)	Médio (30 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)
α-Copaeno	29,71	30	0,98	99,03	α-Copaeno	33,29	30	-9,88	110,97
β-Elemeno	27,36	30	9,65	91,20	β-Elemeno	28,76	30	4,31	95,87
δ-Cadineno	26,90	30	11,52	89,67	δ-Cadineno	29,45	30	1,87	98,17
β-Cariofileno	31,81	30	-5,69	106,03	β-Cariofileno	28,69	30	4,57	95,63
α-Humuleno	29,20	30	2,74	97,33	α-Humuleno	27,00	30	11,11	90,00
O-Cariofileno	28,00	30	7,14	93,33	O-Cariofileno	27,24	30	10,13	90,80
Menor (15 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)	Menor (15 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)
α-Copaeno	14,60	15	2,74	97,33	α-Copaeno	15,80	15	-5,06	105,33
β-Elemeno	13,11	15	14,42	87,40	β-Elemeno	13,76	15	9,01	91,73
δ-Cadineno	13,53	15	10,86	90,20	δ-Cadineno	14,67	15	2,25	97,80
β-Cariofileno	15,40	15	-2,60	102,67	β-Cariofileno	13,58	15	10,46	90,53
α-Humuleno	15,18	15	-1,19	101,20	α-Humuleno	13,99	15	7,22	93,27
O-Cariofileno	13,00	15	15,38	86,67	O-Cariofileno	12,87	15	16,55	85,80
<i>C. publiflora</i>					<i>C. duckey</i>				
Maior (60 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)	Maior (60 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)
α-Copaeno	57,85	60	3,72	96,42	α-Copaeno	59,45	60	0,93	99,08
β-Elemeno	59,33	60	1,13	98,88	β-Elemeno	58,44	60	2,67	97,40
δ-Cadineno	56,30	60	6,57	93,83	δ-Cadineno	56,98	60	5,30	94,97
β-Cariofileno	64,15	60	-6,47	106,92	β-Cariofileno	59,34	60	1,11	98,90
α-Humuleno	59,17	60	1,40	98,62	α-Humuleno	58,76	60	2,11	97,93
O-Cariofileno	55,90	60	7,33	93,17	O-Cariofileno	57,09	60	5,10	95,15

Médio (30 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)	Médio (30 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)
α-Copaeno	27,70	30	8,30	92,33	α-Copaeno	29,67	30	1,11	98,90
β-Elemeno	29,50	30	1,69	98,33	β-Elemeno	28,39	30	5,67	94,63
δ-Cadineno	26,44	30	13,46	88,13	δ-Cadineno	25,45	30	17,88	84,83
β-Cariofileno	33,43	30	-10,26	111,43	β-Cariofileno	28,99	30	3,48	96,63
α-Humuleno	29,58	30	1,42	98,60	α-Humuleno	27,89	30	7,57	92,97
O-Cariofileno	26,20	30	14,50	87,33	O-Cariofileno	28,01	30	7,10	93,37
Menor (15 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)	Menor (15 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)
α-Copaeno	13,90	15	7,91	92,67	α-Copaeno	14,38	15	4,31	95,87
β-Elemeno	14,70	15	2,04	98,00	β-Elemeno	13,69	15	9,57	91,27
δ-Cadineno	13,52	15	10,95	90,13	δ-Cadineno	12,95	15	15,83	86,33
β-Cariofileno	15,70	15	-4,46	104,67	β-Cariofileno	15,68	15	-4,34	104,53
α-Humuleno	14,36	15	4,46	95,73	α-Humuleno	14,54	15	3,16	96,93
O-Cariofileno	13,90	15	7,91	92,67	O-Cariofileno	13,38	15	12,11	89,20
C.									
<i>C. langsdorffii</i>					<i>reticulata</i>				
Maior (60 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)	Maior (60 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)
α-Copaeno	58,50	60	2,56	97,50	α-Copaeno	56,78	60	5,67	94,63
β-Elemeno	59,11	60	1,51	98,52	β-Elemeno	58,87	60	1,92	98,12
δ-Cadineno	57,98	60	3,48	96,63	δ-Cadineno	57,33	60	4,66	95,55
β-Cariofileno	60,75	60	-1,23	101,25	β-Cariofileno	62,31	60	-3,71	103,85
α-Humuleno	58,66	60	2,28	97,77	α-Humuleno	59,87	60	0,22	99,78
O-Cariofileno	59,79	60	0,35	99,65	O-Cariofileno	57,82	60	3,77	96,37
Médio (30 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)	Médio (30 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)
α-Copaeno	29,54	30	1,56	98,47	α-Copaeno	28,66	30	4,68	95,53
β-Elemeno	27,85	30	7,72	92,83	β-Elemeno	27,83	30	7,80	92,77
δ-Cadineno	28,77	30	4,28	95,90	δ-Cadineno	28,61	30	4,86	95,37
β-Cariofileno	29,96	30	0,13	99,87	β-Cariofileno	30,29	30	-0,96	100,97
α-Humuleno	27,59	30	8,74	91,97	α-Humuleno	29,54	30	1,56	98,47
O-Cariofileno	28,98	30	3,52	96,60	O-Cariofileno	26,99	30	11,15	89,97
Menor (15 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)	Menor (15 µg/mL)	CR (µg/mL)	CT (µg/mL)	E (%)	Rec.(%)
α-Copaeno	13,98	15	7,30	93,20	α-Copaeno	14,68	15	2,18	97,87
β-Elemeno	12,97	15	15,65	86,47	β-Elemeno	14,55	15	3,09	97,00
δ-Cadineno	14,76	15	1,63	98,40	δ-Cadineno	13,47	15	11,36	89,80
β-Cariofileno	15,43	15	-2,79	102,87	β-Cariofileno	15,67	15	-4,28	104,47
α-Humuleno	13,68	15	9,65	91,20	α-Humuleno	14,32	15	4,75	95,47
O-Cariofileno	14,23	15	5,41	94,87	O-Cariofileno	13,97	15	7,37	93,13

Por meio da análise dos resultados obtidos, nota-se que os percentuais de recuperação para as análises de exatidão pela curva analítica variaram entre 89 e 102%, com erro entre -2 e 11%, enquanto que os percentuais de recuperação para os testes de fortificação ficaram entre 85 e 111% com erro de -10 a 17%. Valores de recuperação aceitáveis estão na faixa de 70% a 120%, com

erro de até $\pm 20\%$ (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Apesar dos percentuais estarem dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA, as faixas de recuperação e erro para os testes de fortificação foram amplos. Porém os resultados foram aceitáveis devido à complexidade das matrizes avaliadas.

4.6.5 Robustez

O teste de robustez visa examinar fontes potencialmente passíveis de variações por meio da avaliação de um conjunto de respostas inerentes ao método. Para examinar estas fontes, um número de fatores, os quais estão inseridos ao procedimento de validação, são selecionados e variações relativamente leves são deliberadas. Foram realizados oito experimentos em três concentrações distintas. Por meio desses experimentos, as concentrações dos componentes foram obtidas, bem como seus respectivos coeficientes de variação e, em seguida, foi determinada a influência de cada fator analisado (Tabela 13).

Tabela 13. Valores numéricos obtidos em função dos parâmetros de variabilidade

300 µg/mL						
Fatores	α-Copaeno		β-Elemeno		δCadineno	
	Ex	CV(%)	Ex	CV(%)	Ex	CV(%)
A Temperatura do injetor °C	8,35	3,46	-1,38	-3,93	-0,96	-0,42
B Temperatura do detector °C	-2,66	-1,10	-0,09	-0,27	-0,84	-0,37
C Split (divisor de amostra)	-3,96	-1,64	1,05	3,00	-4,57	-2,89
D Vazão de gás H ₂ (mL/min)	4,63	1,92	1,20	3,42	5,08	2,67
E Temperatura inicial do forno °C	-0,57	-0,24	1,59	4,55	1,75	0,77
F Temperatura final do forno °C	-3,57	-1,48	-4,25	-12,15	3,53	1,55
G Vazão(mL/min)	-8,45	-3,50	-4,59	-13,12	-3,39	-1,49
Fatores	β-Cariofileno		α-Humuleno		O-Cariofileno	
	Ex	CV(%)	Ex	CV(%)	Ex	CV(%)
A Temperatura do injetor °C	-1,67	-0,70	-4,76	-2,22	-1,02	-2,46
B Temperatura do detector °C	-6,78	-2,82	-2,56	-1,19	-5,64	-13,56
C Split (divisor de amostra)	-10,02	-4,16	7,66	3,57	-4,38	-10,53
D Vazão de gás H ₂ (mL/min)	9,02	3,75	14,85	4,92	2,18	5,24
E Temperatura inicial do forno °C	6,37	2,65	-8,73	-4,07	0,01	0,02
F Temperatura final do forno °C	12,64	5,25	1,53	0,71	3,62	8,69
G Vazão(mL/min)	-11,99	-4,98	-6,47	-3,02	0,05	0,11
100 µg/mL						
Fatores	α-Copaeno		β-Elemeno		δCadineno	
	Ex	CV(%)	Ex	CV(%)	Ex	CV(%)
A Temperatura do injetor °C	-2,61	-2,74	-2,53	-17,58	-0,63	-0,69
B Temperatura do detector °C	-6,81	-7,15	3,31	12,95	4,31	11,29
C Split (divisor de amostra)	-4,19	-4,41	-6,91	-17,95	4,96	8,72

D Vazão de gás H2 (mL/min)	0,16	0,17	0,59	4,12	-4,88	-9,74
E Temperatura inicial do forno °C	1,16	1,22	-5,08	-15,30	4,65	7,28
F Temperatura final do forno °C	-2,62	-2,75	1,64	11,41	-3,21	-3,52
GVazão(mL/min)	8,45	8,88	-0,18	-1,24	4,32	2,81
	β-Cariofileno		α-Humuleno		O-Cariofileno	
Fatores	Ex	CV(%)	Ex	CV(%)	Ex	CV(%)
A Temperatura do injetor °C	0,50	0,52	3,71	4,20	1,60	9,35
B Temperatura do detector °C	-0,47	-0,49	1,22	1,38	-0,50	-2,91
C Split (divisor de amostra)	-5,63	-5,82	1,23	1,40	8,27	18,38
D Vazão de gás H2 (mL/min)	-4,17	-4,31	7,38	8,36	5,69	13,31
E Temperatura inicial do forno °C	0,36	0,37	-5,98	-6,77	6,80	19,81
F Temperatura final do forno °C	6,39	4,61	-2,59	-2,94	-5,00	-19,25
GVazão(mL/min)	2,82	3,45	-2,04	-2,31	2,48	14,52
20 μg/mL						
	α-Copaeno		β-Elemeno		δCadineno	
Fatores	Ex	CV(%)	Ex	CV(%)	Ex	CV(%)
A Temperatura do injetor °C	0,92	5,25	2,21	1,99	1,03	5,80
B Temperatura do detector °C	0,60	3,42	-3,12	-3,07	0,17	0,95
C Split (divisor de amostra)	1,48	8,40	-4,39	-2,96	0,01	0,04
D Vazão de gás H2 (mL/min)	-0,28	-1,59	-1,62	-4,33	-0,63	-3,56
E Temperatura inicial do forno °C	-0,37	-2,11	-3,88	-1,81	-0,65	-3,64
F Temperatura final do forno °C	-0,37	-2,11	-0,63	-2,16	0,23	1,30
GVazão(mL/min)	-1,35	-7,67	-4,53	-1,87	-1,33	-7,51
	β-Cariofileno		α-Humuleno		O-Cariofileno	
Fatores	Ex	CV(%)	Ex	CV(%)	Ex	CV(%)
A Temperatura do injetor °C	-0,46	-2,50	3,19	10,27	0,55	17,67
B Temperatura do detector °C	-0,70	-3,84	-1,46	-9,29	1,22	9,32
C Split (divisor de amostra)	-0,50	-2,74	3,51	12,33	0,02	0,75
D Vazão de gás H2 (mL/min)	-0,09	-0,48	3,29	10,89	-0,71	-13,08
E Temperatura inicial do forno °C	-0,95	-5,17	0,93	5,89	0,57	18,46
F Temperatura final do forno °C	1,11	6,06	-1,19	-7,55	-0,45	-14,55
GVazão(mL/min)	-1,22	-6,64	-4,24	-16,97	3,71	19,74

Este *design* descrito por Heyden *et al.*, 2001 delimita o limite máximo de variação de cada fator da robustez para 20%. Ao se observarem os resultados da Tabela 13 constata-se que nenhum dos fatores ultrapassou esse limite, nem em relação a concentração. Apesar deste fato, deve-se atentar à temperatura do forno, pois este apresentou um DPR% muito próximo ao limite definido por Heyden *et al.*, (2001), demonstrando ser este o fator que mais influencia a robustez do método. Porém, de modo geral, o método se mostrou robusto, pois apresentou pequenas variações para a maioria dos fatores avaliados.

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

Todos os parâmetros de desempenho como seletividade, linearidade, LOD, LOQ, precisão, recuperação, exatidão e robustez, avaliados nesta validação apresentaram resultados satisfatórios, permitindo a quantificação fidedigna dos sesquiterpenos avaliados em distintas amostras de copaíba. No Brasil a oleorresina é comercializada na forma de óleo cru, cápsulas, pomadas, sabonetes, dentre outros produtos. Além disso, estes produtos frequentemente são exportados para Inglaterra, França, Alemanha e Estados Unidos da América (VEIGA JR; PINTO, 2002). Portanto, este método poderá contribuir para assegurar a qualidade, não somente da oleorresina in natura, bem como de seus produtos.

4.7 Sazonalidade da composição dos voláteis das folhas de C. langsdorffii

A sazonalidade pode ser definida como conjunto de variações ambientais regulares ou como as respostas biológicas condicionadas por estas variações. O crescimento e o desenvolvimento vegetal estão atrelados aos ciclos sazonais, de forma que as estações atuam como fator natural de integração (BATTEY, 2000). Dentro da produção de óleo essencial por espécies vegetais ocorrem influências de variáveis como fotoperíodo, temperatura, estresse hídrico, fase de desenvolvimento do vegetal, geografia e outros fatores climáticos, além de condições de secagem na pós-colheita, os quais também afetam o conteúdo do óleo produzido (OZKAN *et al.*, 2009).

De acordo com a estação do ano, em decorrência das mudanças climáticas, diferentes estímulos são recebidos pelos vegetais, que podem acarretar alterações fisiológicas, dentre elas: possíveis mudanças no secundário metabolismo vegetal (GATTI *et al.*, 2014), aumento ou decréscimo de rendimentos e/ou de concentração de substâncias em óleos essenciais (SILVA *et al.*, 2013). É possível observar inclusive produtividades diferenciadas de óleo essencial em função da fase do ciclo do vegetal, como fase vegetativa, de pré-floração, floração plena, final de floração e frutificação (SALEHI *et al.*, 2014).

Sabe-se que a variabilidade química das plantas é enorme, já que as rotas biossintéticas responsáveis pela produção de metabólitos secundários no vegetal são sensíveis a diversos fatores, como variações climáticas, fatores ambientais e, especialmente, interação

com insetos e predadores. O conhecimento das variações químicas é de grande importância para a qualidade e o preparo das espécies medicinais de interesse terapêutico e/ou industrial, sendo útil para a extração e isolamento de princípios ativos desejados ou para a determinação da interrupção da colheita em épocas de produção de metabólitos tóxicos (SILVA *et al.*, 2013).

Neste estudo de sazonalidade, não foi possível avaliar todos os fatores que influenciam a produção dos metabólitos da *C. langsdorffii*. Este estudo iniciou-se em fevereiro do ano de 2016. As amostras foram coletadas durante 12 meses consecutivos, finalizando a amostragem em fevereiro de 2017. Quanto às análises qualitativas sazonais, a cada mês alíquotas das folhas foram submetidas ao método de análise. Na figura 43 são apresentados alguns cromatogramas obtidos para sazonalidade. O β -cariofileno e o β -elemeno foram quantificados frente a padrões autênticos utilizando as curvas analíticas obtidas. Já para o germacreno D, apenas a concentração relativa foi determinada levando-se em consideração as áreas sob as respectivas bandas nos cromatogramas em relação ao padrão interno. A identificação dos compostos voláteis obtidos da extração hexânica das folhas de *C. langsdorffii* foi realizado por CG/EM e pelo cálculo do índice de retenção que estão descritas na tabela.

Tabela 14. Constituintes voláteis das folhas de *C. langsdorffii*.

Seq	Composto	IRExp	IRLit	% Área Relativa
1	β -Cariofileno	1426	1421	8,89
2	Germacreno D	1482	1481	77,54
3	β -Elemeno	1396	1397	13,57

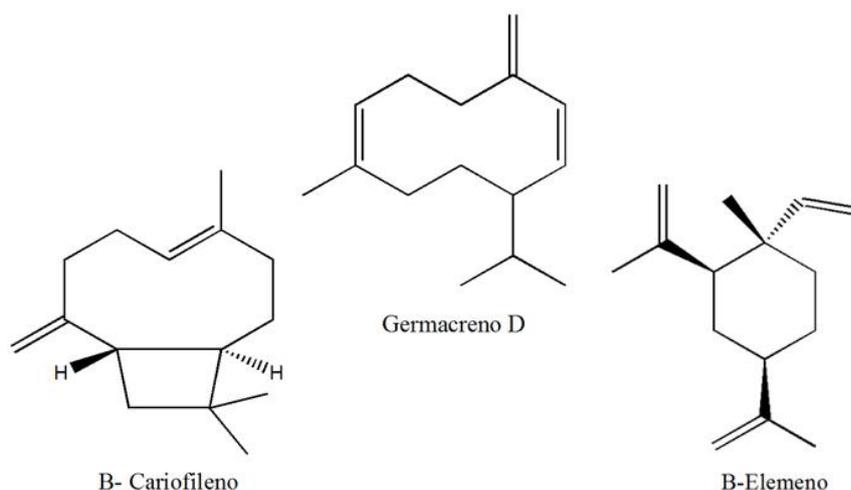


Figura 48. Compostos voláteis identificados nas folhas de *C. langsdorffii*.

Na análise dos cromatogramas obtidos, podemos visualizar três compostos, β -cariofileno, germacreno D e β -elemeno, sendo o germacreno D claramente majoritário. Podemos observar também a eluição do padrão interno benzofenona. A análise de concentração dos compostos de acordo com os meses de coleta está demonstrada na figura 44.

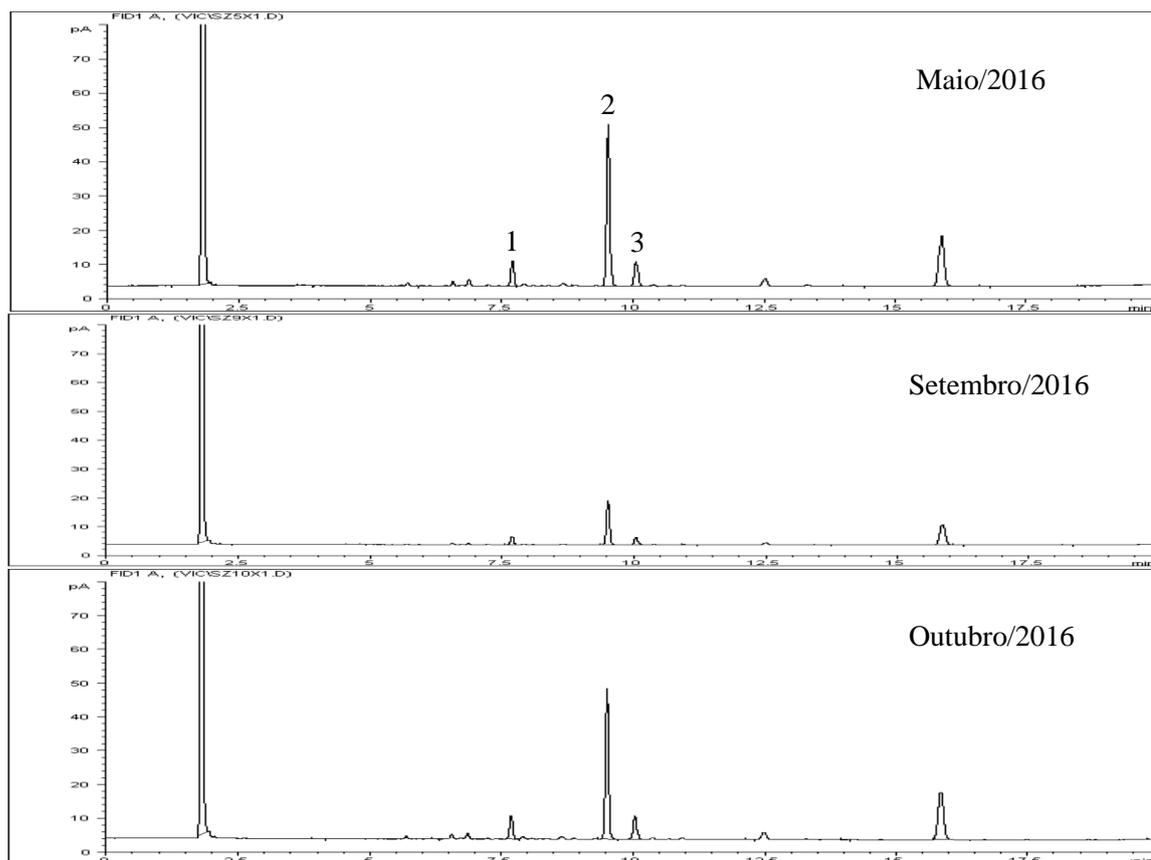


Figura 49. Perfis cromatográficos dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. langsdorffii* obtidos para o estudo sazonal. (1) β -cariofileno, (2) germacreno D e (3) β -elemeno.

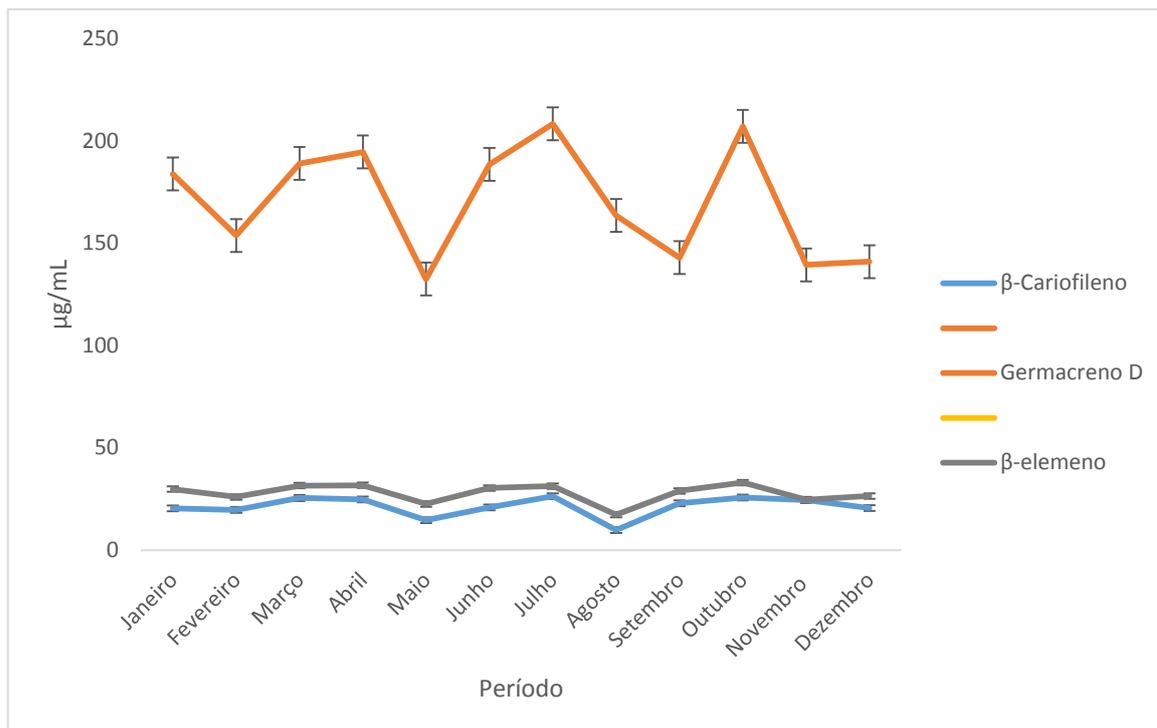


Figura 50. Concentração relativa dos compostos voláteis das folhas de *C. langsdorffii*

Os Compostos β -cariofileno, β -elemeno e germacreno D foram quantificados em relação ao padrão interno. Na verificação da concentração podemos observar pouca variação dos compostos β -cariofileno e β -elemeno nos meses avaliados. O germacreno D teve maior variação atingindo sua menor concentração no mês de maio (132,49 $\mu\text{g/mL}$) e a maior concentração no mês de julho (208,31 $\mu\text{g/mL}$), com variação de 63% na sua concentração relativa.

Almeida e colaboradores (2016) avaliaram o perfil sazonal do óleo essencial das folhas de *C. langsdorffii* do cerrado. O óleo essencial foi analisado por CG/EM e foram identificados como majoritários os sesquiterpenos não oxigenados β -cariofileno (5.47 de área relativa) e germacreno D (14.11 A.R.), porém o β -elemeno (0.79 A.R.) foi identificado como um composto traço na amostra (ALMEIDA *et al.*, 2016).

Sabe-se que as variações na concentração de sesquiterpenos são evidentes, ocorrendo sazonalmente, numa mesma espécie ou entre espécies (KUTCHAN, 2001). Dentro de uma determinada espécie podem ocorrer variações qualitativas e quantitativas em diferentes níveis e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o

ambiente circundante. Portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (GOBBO-NETO & LOPES, 2007)

A fim de avaliar o quanto do composto é possível recuperar durante o processo analítico, foi realizado o processo de recuperação do sesquiterpeno β -cariofileno. A recuperação do método foi realizada com a fortificação da matriz de *C. langsdorffii* previamente esgotada com auxílio de aparelho Soxhlet. Na Figura 45 encontra-se o perfil cromatográfico da matriz após ser totalmente esgotada. Esses cálculos são dados pelo percentual do erro relativo entre os valores reais e teóricos das concentrações de cada composto em questão.

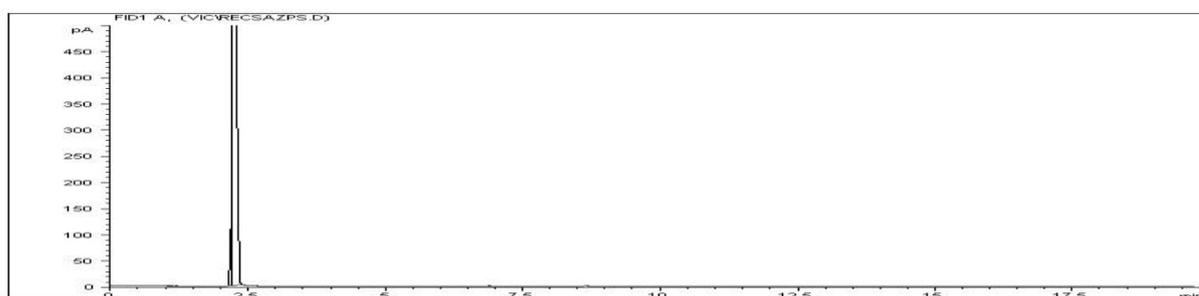


Figura 51. Matriz das folhas *Copaifera langsdorffii* após extração em aparelho de Soxhlet

A média dos teores esperados para esse composto na matriz vegetal foi considerada como o nível de concentração médio, enquanto que os níveis alto e baixo foram considerados como o nível médio mais ou menos 50%, respectivamente. Os valores de recuperação obtidos em porcentagem encontram-se descritos na Tabela 15. Além disso, para quantificação do composto e do padrão interno, foi utilizado um padrão secundário e, para tanto, foi obtida uma curva analítica do padrão secundário e os valores de área obtidos para o padrão secundário (tetrametilbenzeno) encontram-se na Tabela 16.

Tabela 15. Resultados obtidos nos estudos de recuperação

	CT ($\mu\text{g/mL}$)	CR ($\mu\text{g/mL}$)	Rec.(%)	CV (%)	Erro (%)
β-Cariofileno					
Baixa	10,61	11,25	94,32	4,65	-5,68
Média	21,51	22,5	95,60	2,86	-4,40
Alta	42,21	45	93,80	2,28	-6,20
Benzofenona					
Baixa	92,87	100	92,87	2,30	-7,13
Média	94,54	100	94,54	0,61	-5,46
Alta	93,07	100	93,07	0,67	-6,93

CT = concentração teórica; CR =concentração real.

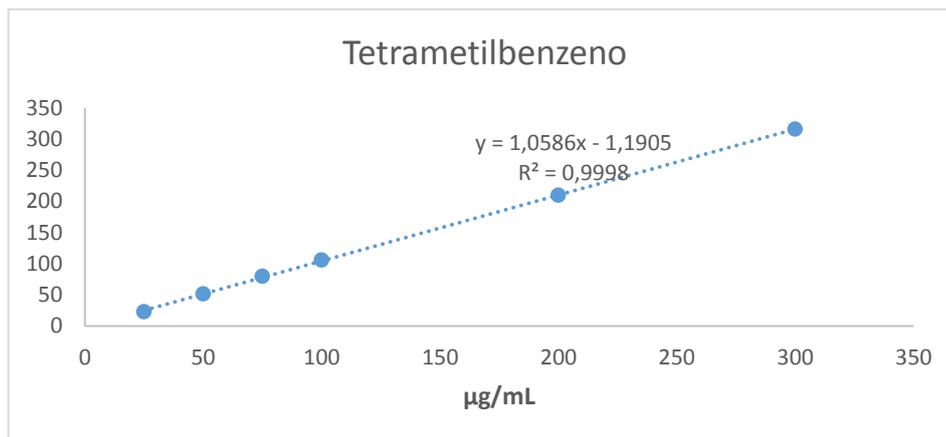


Figura 52. Curva analítica do tetrametilbenzeno

Tabela 16. Dados obtidos para o padrão secundário (Tetrametilbenzeno).

Nível	Teor (µg/mL)	Área
Alta	100,00	104,6
		105,4
		105,9
Média	100,00	104,3
		105,6
		105,3
Baixa	100,00	104,7
		105,8
		105,1

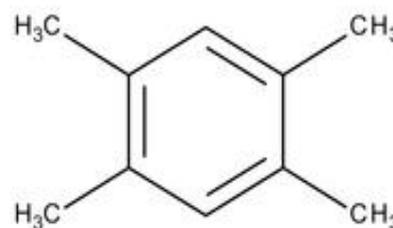


Figura 53. Estrutura do Tetrametilbenzeno

Por meio da análise dos resultados obtidos, nota-se que os percentuais de recuperação variaram entre 92 e 94%, enquanto que os percentuais de erro ficaram entre -7 e -4. Segundo Ribani *et al.*, (2004), valores de recuperação aceitáveis estão na faixa de 70% a 120%, com erro de até $\pm 20\%$. Portanto, o método desenvolvido permite uma recuperação adequada tanto para o sesquiterpeno quanto para o padrão interno.

É importante destacar, que além da sazonalidade, outros fatores também são capazes de alterar o conteúdo final de metabólitos secundários em plantas medicinais, tais como condições de coleta, estabilização e estocagem, constituintes químicos presentes no solo e fatores bióticos, os quais podem ter grande influência na qualidade e, conseqüentemente, no valor terapêutico de preparados fitoterápicos (CALIXTO, 2000). Dessa forma, estudos sazonais realizados para as folhas de *C. langsdorffii*, bem como métodos analíticos desenvolvidos e validados servirão para determinar e garantir a qualidade da matéria-prima vegetal a ser utilizada na produção de eventual fitoterápico.

4.8 Avaliação da atividade antimicrobiana

Entre as ações terapêuticas das plantas medicinais, a pesquisa por atividade antimicrobiana tem se destacado frente às altas taxas de mortalidade existentes e a resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos (ANTHONY *et al.*, 2009). As plantas são de grande interesse científico devido à possibilidade de empregá-las como fitofármacos, proporcionando grandes chances de se obterem protótipos devido a sua diversidade de constituintes (CRAGG *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2007).

Os trabalhos publicados na literatura sobre determinação da atividade antimicrobiana de plantas medicinais são focados na utilização de extratos vegetais (FARJANA *et al.* 2014), óleos essenciais (DIVYA *et al.*, 2014) ou compostos isolados (AKHAVAN *et al.*; 2015) Estima-se que 60% dos antitumorais e antimicrobianos que estão no mercado, ou sob triagem clínica, sejam de origem natural (YAN *et al.*, 2013;NEWMAN, CRAGG, 2012).

Foram avaliados a atividade antimicrobiana frente aos óleos voláteis obtidos da oleorresina de *C. pubiflora*, *C. reticulata*, *C. paupera*, *C. multijuga*, *C. ducky* e *C. langsdorffi*. Os sesquiterpenos isolados α -copaeno, β -cariofileno, α -humuleno, β -elemeno, δ -cadineno e óxido de cariofileno também foram submetidos aos testes antimicrobianos.

4.8.1 Avaliação da atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas

Os resultados da avaliação da atividade do óleo volátil da oleorresina de várias espécies de copaíba e dos sesquiterpenos isolados frente às bactérias gram positivas e gram negativas selecionadas encontram-se nas Tabelas 17 e 18. Os óleos voláteis foram avaliados nas concentrações de 0,97 $\mu\text{g/mL}$ a 2000 $\mu\text{g/mL}$. Já os compostos isolados foram avaliados nas concentrações de 0,19 $\mu\text{g/mL}$ a 400 $\mu\text{g/mL}$. Como controle positivo foi utilizado penicilina e estreptomicina, os quais foram avaliados nas concentrações de 0,115 $\mu\text{g/mL}$ a 59,0 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 17. Valores da concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do óleo volátil e dos sesquiterpenos frente a bactérias *gram* positivas e *gram* negativas.

	<i>C. pubiflora</i>	<i>C. reticulata</i>	<i>C. paupera</i>	<i>C. multijuga</i>	<i>C. duckey</i>	<i>C. langsdorffi</i>	C+
<i>S. aureus</i>	500	2000	500	1000	250	125	0,0143
<i>E. coli</i>	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	0,7375
<i>P. aeruginosa</i>	≥ 2000	≥ 2000	2000	≥ 2000	500	500	0,7375
<i>S. choleraesuis</i>	≥ 2000	1000	125	250	250	250	0,7375
<i>S. saprophyticus</i>	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	14,75

	α -copaeno	β -cariofileno	α -humuleno	β -elemeno	O-cariofileno	δ -cadineno	C+
<i>S. aureus</i>	400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	400	≥ 400	0,014375
<i>E. coli</i>	400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	400	≥ 400	0,921875
<i>P. aeruginosa</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	400	≥ 400	0,23
<i>S. choleraesuis</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	0,921875
<i>S. saprophyticus</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	14,75

C+:Controle positivo

Os dados das atividades antimicrobianas foram analisados com base em critérios previamente publicados na literatura. De acordo com estes critérios, são considerados promissores os óleos voláteis que apresentarem valores de CIM abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$. Amostras que apresentam atividade entre 100 e 400 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas como moderadamente ativas, enquanto que valores de CIM entre 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ caracterizam amostras com baixa atividade. Amostras com valores de CIM maiores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas inativas (BOTELHO *et al.*, 2009; ALVIANO *et al.*, 2005).

Ao analisarmos os dados apresentados na tabela 11 podemos concluir que nenhum dos óleos voláteis testados neste estudo pode ser considerado promissor frente às linhagens de bactérias testadas. Os óleos de *C. paupera*, *C. duckey*, *C. langsdorffi* apresentaram baixa e moderada atividade contra *S. aureus*, resultados que se confirmam ao olharmos os valores de CBM na tabela 18 demonstrando um efeito bactericida nas concentrações de 500, 500 e 125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os mesmos óleos apresentaram efeito semelhante frente às linhagens de *S. choleraesuis*, porém os dados da CBM evidenciaram efeito bacteriostático.

Apesar do grande número de trabalhos na literatura sobre as atividades biológicas de óleos essenciais, as interações sinérgicas ou antagonísticas entre seus constituintes químicos ainda é pouco conhecida. Por esta razão, vários autores têm procurado avaliar também a atividade biológica dos constituintes químicos presentes em maior concentração nos óleos essenciais, individualmente ou em mistura (ISCANet *et al.*, 2002; BOTELHO *et al.*, 2007; DORMAN, 2000).

Conforme pode ser visto na Tabela 17, os valores das CIM dos compostos α -copaeno, β -Cariofileno, α -humuleno, β -elemeno, O- cariofileno e δ -cadineno frente às bactérias selecionadas são iguais ou maiores do que 400 $\mu\text{g/mL}$. Levando-se em conta que para uma substância pura ser considerada promissora com relação à atividade antibacteriana, o valor de sua CIM deve ser menor que 10 $\mu\text{g/mL}$ (BOTELHO *et al.*, 2009; ALVIANO *et al.*, 2005). Com isso é possível concluir que nenhum dos constituintes majoritários no óleo volátil de *C. multijuga* foi ativo frente às bactérias nas concentrações testadas.

Pacheco *et al.* (2006) não observou atividade antibacteriana do óleo de *C. multijuga* frente a *S. aureus*. O autor também menciona que o óleo de *C. sp.* também não demonstrou atividade frente aos microrganismos *B. subtilis* e *S. aureus*. Bernardes e colaboradores avaliaram as atividades antibacteriana do β -cariofileno, o qual apresentou atividade moderada frente a *S. salivarius* (400 $\mu\text{g/mL}$), *S. sanguinis* (400 $\mu\text{g/mL}$), *S. mitis* (300 $\mu\text{g/mL}$), *S. mutans* (300 $\mu\text{g/mL}$) e *S. sobrinus* (400 $\mu\text{g/mL}$), sendo inativo frente a *E. faecalis* (>2000 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 18. Valores da concentração bactericida mínima (CBM) em $\mu\text{g/mL}$ do óleo volátil e dos sesquiterpenos frente a bactérias *gram* positivas e *gram* negativas.

	<i>C.</i> <i>pubiflora</i>	<i>C.</i> <i>reticulata</i>	<i>C.</i> <i>paupera</i>	<i>C.</i> <i>multijuga</i>	<i>C.</i> <i>duckey</i>	<i>C.</i> <i>langsdorffi</i>	C+
<i>S. aureus</i>	1000	2000	500	1000	500	125	0,0143
<i>E. coli</i>	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	2,95
<i>P. aeruginosa</i>	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	500	500	0,7375
<i>S. choleraesuis</i>	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	1,495
<i>S. saprophyticus</i>	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	29,5
	α -copaeno	β - Cariofileno	α - humuleno	β -elemeno	O- cariofileno	δ -cadineno	C+
<i>S. aureus</i>	400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	400	≥ 400	0,014375
<i>E. coli</i>	400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	400	≥ 400	0,921875
<i>P. aeruginosa</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	400	≥ 400	0,921875
<i>S. choleraesuis</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	3,6875
<i>S. saprophyticus</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	29,5

C+:Controle positivo

Na figura 48 é possível observar a maneira como são realizados os estudos de CIM e CBM, neste caso a figura ilustra a atividade antibacteriana dos óleos voláteis de copaíba frente à linhagem de *S. aureus*.

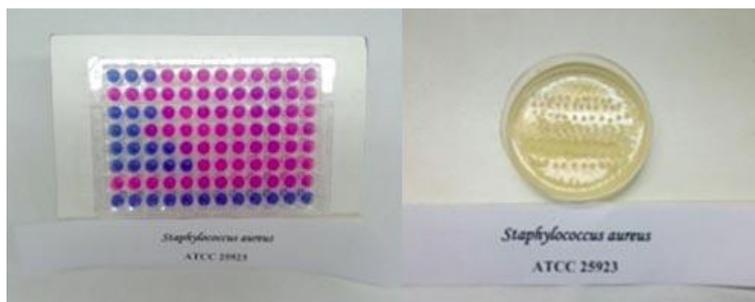


Figura 54. CIM e CBM dos óleos de copaíba frente a *S. aureus*

4.8.2. Avaliação da atividade antimicrobiana contra leveduras

Os resultados da avaliação da atividade do óleo volátil e da oleorresina das espécies de copaíba e dos sesquiterpenos isolados frente às leveduras encontram-se nas Tabelas 19 e 20. Os óleos voláteis foram avaliados nas concentrações de 0,97 $\mu\text{g/mL}$ a 2000 $\mu\text{g/mL}$. Já os compostos isolados foram avaliados nas concentrações de 0,19 $\mu\text{g/mL}$ a 400 $\mu\text{g/mL}$. Como controle positivo foi utilizado fluconazol. O qual foi avaliado nas concentrações de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ a 512 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 19. Valores da concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do óleo volátil e dos sesquiterpenos frente a leveduras.

	<i>C. pubiflora</i>	<i>C. reticulata</i>	<i>C. paupera</i>	<i>C. multijuga</i>	<i>C. duckey</i>	<i>C. langsdorffi</i>	C+
<i>C. albicans</i>	≥ 2000	≥ 2000	2000	≥ 2000	250	250	512
<i>C. tropicalis</i>	2000	≥ 2000	1000	≥ 2000	31,25	15,625	4,00
<i>C. krusei</i>	2000	≥ 2000	2000	≥ 2000	62,5	62,5	8
<i>C. glabrata</i>	2000	≥ 2000	2000	≥ 2000	15,625	≥ 2000	512
<i>C. parapsilosis</i>	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 512
	α -copaeno	β -Cariofileno	α -humuleno	β -elemeno	O-cariofileno	δ -cadineno	C+
<i>C. albicans</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 512
<i>C. tropicalis</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 512
<i>C. krusei</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 512
<i>C. glabrata</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 512
<i>C. parapsilosis</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 512

C+: Controle positivo

Ao analisarmos os dados apresentados na tabela 19 podemos observar que os óleos de *C. duckey*, *C. langsdorffi* apresentaram os melhores resultados frente às linhagens de leveduras testadas. Os óleos de *C. duckey* e *C. langsdorffi* apresentaram alta atividade contra *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* nos valores de CIM, porém nos resultados de CBM apresentam atividade bacteriostática moderada. Nenhum dos constituintes majoritários no óleo volátil de *C. multijuga* foi ativo frente às leveduras nas concentrações testadas. A ação

fungistática, foi encontrada para os micro-organismos dos gêneros *Aspergillus* e *Candida*, quando utilizado o óleo volátil de *Copaifera multijuga* (DEUS; ALVES; ARRUDA,2011).

Tabela 20. Valores da concentração bactericida mínima (CBM) em µg/mL do óleo volátil e dos sesquiterpenos frente a leveduras

	<i>C.</i> <i>pubiflora</i>	<i>C.</i> <i>reticulata</i>	<i>C.</i> <i>paupera</i>	<i>C.</i> <i>multijuga</i>	<i>C.</i> <i>duckey</i>	<i>C.</i> <i>langsdorffi</i>	C+
<i>C. albicans</i>	≥ 2000	≥ 2000	2000	≥ 2000	500	250	512
<i>C. tropicalis</i>	≥ 2000	≥ 2000	2000	≥ 2000	125	125	≥ 512
<i>C. krusei</i>	2000	≥ 2000	2000	≥ 2000	250	125	256
<i>C. glabrata</i>	≥ 2000	≥ 2000	2000	≥ 2000	125	≥ 2000	≥ 512
<i>C. parapsilosis</i>	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 512
	α -copaeno	β - Cariofileno	α - humuleno	β - elemeno	O- cariofileno	δ - cadineno	C+
<i>C. albicans</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	400	≥ 400	≥ 512
<i>C. tropicalis</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	400	≥ 400	≥ 512
<i>C. krusei</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	400	≥ 400	≥ 512
<i>C. glabrata</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 512
<i>C. parapsilosis</i>	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 512

C+:Controle positivo

5. CONCLUSÕES

A fração volátil representa cerca de metade da constituição das oleoresinas de *Copaifera*, o que constata a importância de trabalhos envolvendo esta fração.

O destilador de Bancada 800 Automatic Micro Spinning Band Distillation pode ser uma ferramenta útil para o fracionamento de óleos voláteis devido a rapidez do processo e economia de solventes e adsorventes.

Os esquemas adotados para a purificação dos compostos voláteis presentes nas oleorresinas demonstraram-se eficientes, visto que foi possível isolar seis sesquiterpenos, sendo eles: α -copaeno, β -cariofileno, α -humuleno, β -elemeno, δ -cadineno e óxido de cariofileno.

O método desenvolvido por GC-DIC é confiável para a quantificação dos sesquiterpenos α -copaeno, β -cariofileno, α -humuleno, β -elemeno, δ -cadineno e óxido de cariofileno em óleos de *Copaifera langsdorffii* Desff; *C. duckey* Dewer; *C. multijuga* Hayne; *C. paupera* (Herzog) Dewer; *C. reticulata* Ducke e *C. publifora* Benth.

Foi possível identificar três constituintes sesquiterpênicos nas folhas de *C. langsdorffii*, sendo eles β -cariofileno, germacreno D e β -elemeno, sendo que o germacreno D apresenta o maior teor. Na análise sazonal desses compostos o germacreno D foi o composto que mais variou durante o período avaliado com uma variação de até 63%.

Os óleos voláteis de *C. paupera*, *C. duckey*, *C. langsdorffii* apresentaram baixa e moderada atividade contra *S. aureus*, demonstrando efeito bactericida nas concentrações de 500, 500, 125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os mesmos óleos voláteis apresentaram efeito semelhante frente às linhagens de *S. choleraesuis*. Porém, os dados da CBM evidenciam um efeito bacteriostático. Nenhum dos constituintes majoritários dos óleos voláteis foi ativo frente às bactérias nas concentrações testadas.

Os óleos voláteis de *C. duckey* e *C. langsdorffii* apresentaram os melhores resultados frente às linhagens de leveduras testadas. Os óleos voláteis de *C. duckey* e *C. langsdorffii* apresentaram alta atividade contra *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* nos valores de CIM, porém nos resultados de CBM apresentam atividade bacteriostática moderada. Nenhum dos constituintes majoritários dos óleos voláteis foi ativo frente às leveduras nas concentrações testadas.

6. REFERÊNCIAS

- ABE, R.; OHTANI, K. An ethnobotanical study of medicinal plants and traditional therapies on Batan island, the Philippines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 554-565, 2013.
- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography Quadupole Mass Spectroscopy. Illions, USA: **Allures Publishing Cooperation**, p.451, 2001.
- AHMED, A. F. *et al.* New -Caryophyllene-Derived terpenoids from the soft coral *Sinularia nanolobata*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 592-597, 2004.
- AKHAVAN, M.; JAHANGIRI, S.; SHAFAGHAT, A. Studies on the antioxidant and antimicrobial activity and flavonoid derivatives from the fruit of *Trigonostadium brachytaenium* (Boiss.) **Industrial Crops and Products**. v. 63, p. 114-118, 2015.
- ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.; MACHADO, M.I.L. Kovats índices simulation essential oils analysis. **Química Nova**, v.13, p. 282-284, 1990.
- ALENCAR, J.C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne - Leguminosae, na Amazônia Central. Produção de óleo-resina. **Acta Amazônica**, v.12, n.1, p.75-89, 1982.
- ALMEIDA, L.F.R.; PORTELLA, R.O.; BUFALO, J.; MARQUES, M.O.M.; FACANALI, M.; FREI, F. Non-Oxygenated Sesquiterpenes in the Essential Oil of *Copaifera langsdorffii* Desf. Increase during the Day in the Dry Season. **PLoS ONE**, 11(2): e0149332, 2016.
- ALVIANO, W. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, D. S.; BIZZO, H. R.; SOUTO-PADRON, T.; RODRIGUES, M. L.; BOLOGNESE, A. M.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, M. M. G. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral microbiology and immunology**. v.101, p.101-105, 2005.
- AMIRI, R; NIKBAKHT, A; RAHIMMALEK, M; HOSSEINI, H. Variation in the Essential Oil Composition, Antioxidant Capacity, and Physiological Characteristics of *Pelargonium graveolens* L. Inoculated with Two Species of Mycorrhizal Fungi Under Water Deficit Conditions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.36, p. 1-14, 2017.
- ANDRADE, JR.M.A; FERRAZ, I.D.K.; VEIGA, JR.V.F. **51º Congresso Nacional de Botânica da Sociedade Botânica do Brasil**, Brasília, Brasil, 2000.
- ANTHONY, T.; RAJESH, T.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. **Bioresource Technology**. v. 100, n. 2, p. 872-877, 2009.

B/R INSTRUMENT CORPORATION. Comparison of Spinning Band Distillation with Packed Column Distillation. B/R Instrument Corporation acessado 15 Abril, 2016.

BANDONI, ARNALDO L. Los Recursos Vegetales Aromáticos em Latinoamérica: su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. 2. ed. **Buenos Aires: CYTED**, 2003.

BARNES, J. Quality, efficacy and safety of complementary medicines: fashions, facts and the future. Part I. Regulation and Quality. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 55, p. 226 - 233, 2003

BATTEY, N.H. Aspects of seasonality. **Journal of Experimental Botany**, v.51, n.352, p.1769-1780, 2000.

BIASI, A.; DESCHAMPS, C. Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial. Curitiba: **Layer Studio**, 2009.

BOER, H.J.; LAMXAY, V.; BJÖRK, L. Comparing medicinal plant knowledge using similarity indices: A case of the Brou, Saek and Kry in Lao PDR. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 481-500, 2012.

BOTELHO, M. A.; DOS SANTOS, R. A.; MARTINS, J. G.; CARVALHO, C. O.; PAZ, M. C.; AZENHA, C.; RUELA, R. S.; QUEIROZ, D. B.; RUELA, W. S.; MARINHO, G.; RUELA, F. I. Comparative effect of an essential oil mouthrinse on plague, gingivitis and salivary *Streptococcus mutans* levels: a double blind randomized study. **Phytotherapy Research**, v.23, p.1214-1219, 2009.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p.349-356, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**ANVISA**), Resolução RE n. 899 – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. 29 de maio de 2003.

BRITO, N. M.; DE AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L.; Pesticidas, **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p.129, 2003.

BRUM, H.D., MESQUITA, M.R.; FERRAZ, I.D.K. Descrição comparativa dos propágulos e plântulas de *Copaifera multijuga* Hayne e *C. officinalis* Jacq. (Fabaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, s.1, p.51-353, 2007.

BRUM, H.D.; CAMARGO, J.L.C.; FERRAZ, I.D.K. Copaíba-roxa, *Copaifera multijuga* Hayne - Fabaceae. In: I.D.K. FERRAZ & J.L.C. Camargo (Eds). **Manual de Sementes da Amazônia**, fascículo 9, 12 p., INPA, Manaus-AM, Brasil, 2009.

CAI, Y. *et al.* A cDNA clone for -caryophyllene synthase from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 523-529, 2002.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic Agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179 – 189, 2000.

CAMARGO, J. L. C., FERRAZ, I. D. K., MESQUITA, M. R., SANTOS, B. A. & BRUM, H. D. **Guia de Propágulos e Plântulas da Amazônia**, v. I. 168p, 2008.

CASCON, V. Copaíba: *Copaifera* spp. In: CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas, **Ribeirão Preto- SP**, 480p., 2004.

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

CHAVAN, M.J.; WAKTE, P.S.; SHINDE, D.B. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**, v.17, n.10, p.149–151, 2010.

CLEMENT, C.R.; CLAY, J.W.; SAMPAIO, P.T.B. Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização. 1ª ed. Manaus: **Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico**, 409 p., 1999.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA. 2007.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. campinas: **Editora da Unicamp**, 2005.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**. v. 77, n. 3, p. 703-723, 2014.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. Óleos essenciais de plantas do Nordeste, Fortaleza. **Edições UFC**, p. 210, 1981.

DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J.; BALDWIN, I.T.; KESSLER, A. Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 169-176, 2003.

DEUS, R. J. A.; ALVES, C. N.; ARRUDA, M. S. P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga Hayne*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p.1-7, 2011.

DI SOTTO, A.; MAZZANTI, G.; CARBONE, F.; HRELIA, P.; MAFFEI, F. Inhibition by β -caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, v.699, n.1-2, p.23–28, 2010.

DI STASI, L. C. (org). Plantas Mediciniais: Arte e Ciência – Um guia de estudo multidisciplinar. São Paulo: **Editora Unesp**, p. 232, 1996.

DIVYA, K.; RAMALAKSHMI, K.; MURTHY, P.S.; RAO, L.J.M. Volatile oils from *Ferula asafoetida* varieties and their antimicrobial activity. **LWT - Food Science and Technology**. v. 59, n. 2, p. 774-779, 2014.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**. v.88, p.308-316, 2000.

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

DWYER, J. D. Further studies on the New World species of *Copaifera*. **Bulletim of the Torrey Botanical Club**, New York: v.81, n.8, p.179-187, 1954.

FARJANA, A.; ZERIN, N.; KABIR, M.D.S. Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. v. 4, n.2, p. S920-S923, 2014.

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

FERRARI, M.; PAGNONI, U.M.; PELIZZONI, F.; LUKES, V.; FERRARI, G. Terpenoids from *Copaifera langsdorffii*. **Phytochemistry**, v.10, p.905-907, 1971.

GATTI, A.B. Takaoa, L.K.; Pereira V.C.; Ferreira, A.G.; Lima, M.I.S.; Gualtieri, S.C.J. Seasonality effect on the allelopathy of cerrado species. **Brazilian Journal of Biology**, v.74, n.3, p. 64-69, 2014.

GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; MAGNIC, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; FACINO, R.M. 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, p. 170-178, 2013.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; PINTO, A.C.; FERNANDES P.D. Characterization of the antinoceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p. 177-183, 2010.

GONG, F.; LIANG, Y.; XIE, P.; CHAU, F.T. Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control. **Journal of Chromatography A**, v.1002, p. 25 – 40, 2003.

GOVINDARAGHAVAN, S.; SUCHER, N.J. Quality assessment of medicinal herbs and their extracts: Criteria and prerequisites for consistent safety and efficacy of herbal medicines. **Epilepsy & Behavior**, v. 45, p. 1-9, 2015.

GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R. Volatiles constituents of *Copaifera langsdorffii* from the Brazilian Northeast. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, n.2, p.130-132, 2005.

GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; CAVALCANTI, B.C.; FERREIRA, J.R.O.; ALMEIDA, F.S.; RAO, V.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; ODORICO-DE-MORAES, M.; PESSOA, C. Chemistry and pharmacology of *Copaifera langsdorffii* Desf.: An overview. In: GOVIL, J.N.; SINGH, V.K., ARUNACHALAM, C.. (Org.). **Recent Progress in Medicinal Plants**. Houston: Studium Press, LLC, 2009, v. 27, cap. 13, p. 241-266, 2010.

GU, R.; WANG, Y.; LONG, B. KENNELLY, E.; WU, S.; LIU, B.; LI, P.; LONG, C. Prospecting for bioactive constituents from traditional medicinal plants through ethnobotanical approaches. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, p. 903-915, 2014.

GUMUSTAS, M.; OZKAN, S.A. The Role of and the Place of Method Validation in Drug Analysis Using Electroanalytical Techniques. **The Open Analytical Chemistry Journal**, v. 5, p. 1-21, 2011.

HANSON, J. R.; HITCHCOCK, P. B.; MACIAS-SANCHEZ, A. J.; MOBBS, D. J. The cyclisation of humulene 6,7- and 9,10-epoxides catalysed by tetracyanoethylene. **Journal of Chemical Research**, v. 2441, p. 465-467, 2004.

HARREWIJN, P.; VAN OOSTEN A.M.; PIRON, P.G. Natural terpenoids as messengers: a multidisciplinary study of their production, biological functions and practical applications. **Annals of Botany**, v.90, p.299 – 300, 2002.

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

INMETRO – DOQ-CGCRE – 008, 01 de março de 2003. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - **IBGE** Vegetable extraction, silviculture. Rio de Janeiro, 2010.

ISCAN, G.; KIRIMER, N.; KURKCUOGLU, M.; BASER, K. H. C.; DEMIRCI, F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3943-3946, 2002.

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

KAO CORPORATION; AKIBA S.; HAMA M.; OKIHAKA K.; ARA K.; KAYANE S. **Deodorant**. Patente JP2002255774, 11 setembro 2002.

KIM, D.; LEE, J.; CHANG, J.; KIM, S. Stereoselective synthesis of (±)-b-elemene by a doubly diastereodifferentiating internal alkylation: a remarkable difference in the rate of enolization between syn and anti esters. **Tetrahedron**, v.57, p.1247-1252, 2001.

KIRCHNER, M.; MATISOVA, E.; HROUZKOVA, S.; ZEEUW, J. Possibilities and limitations of quadrupole mass spectrometric detector in fast gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, p. 126-132, 2005.

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

KUTCHAN, T.M. Ecological arsenal and developmental dispatcher: the paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, v.125, n.1, p.58-60, 2001.

LEANDRO, L.M.; VARGAS, F.S.; BARBOSA, P.S.C.; NEVES, J.K.O.; SILVA, J.A.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Review: Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. **Molecules**, v. 17, p. 3866-3889, 2012.

LI, M.; WANG, S.; HE, L. Development of an analytical method coupling cell membrane chromatography with gas chromatography–mass spectrometry via microextraction by packed sorbent and its application in the screening of volatile active compounds in natural products. **Journal of Chromatography B**, v. 974, p. 9–16, 2015.

LIN, W.C.; WEN, C.C.; CHEN, Y.H.; HSIAO, P.W.; LIAO, J.W. *et al.* Integrative Approach to Analyze Biodiversity and Anti-Inflammatory Bioactivity of Wedelia Medicinal Plants. **PLoS ONE**. v. 10, p. 1-24, 2015.

LONG, C.L. Modern ethnobotany: an introduction. **Plant Diversity Resource**, v. 35, p. 438-442, 2013.

LUONG, J.; GRAS, R.; CORTES, H.J.; SHELLIE, R. Multidimensional gas chromatography for the characterization of permanent gases and light hydrocarbons in catalytic cracking process. **Journal of Chromatography A**, v. 1271, p. 185-191, 2013.

MAHAJAN, J.R.; FERREIRA, G.A.L. New diterpenoids from copaiba oil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.43, p.611–613, 1971.

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

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

MASTOVSKA, K., LEHOTAY, S.J. Practical approaches to fast gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 153-180, 2003.

MATISOVÀ, E.; DÖMÖTÖROVÁ, M. Fast gas chromatography and its use in trace analysis. **Journal of Chromatography A**, v.1000, p.199-221, 2003.

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

MONTI, H.; TILIACOS, N.; FAURE, R. Two diterpenoids from copaiba oil. **Phytochemistry**, v.42, n.6, p.1653–1656, 1996.

MOREIRA, M.R.; SOUZA, A.B.; MOREIRA, M.A.; BIANCHI, T.C.; CARNEIRO, L.J.; ESTRELA, F.T.; SANTOS, R.A.; JANUÁRIO, A.H; MARTINS, C.H.G.; AMBROSIO, S.R.; VENEZIANI, R.C.S. RP-HPLC analysis of manool-rich *Salvia officinalis* extract and its antimicrobial activity against bacteria associated with dental caries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n.13, p.870-876, 2013.

MUHLEN, C. V.; Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. **Scientia Chromatographica**, v.1, n.3, 2009.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**. v. 75, p. 311-335, 2012.

OBRADOVIC, M.; KRAJESEK, S. S.; DERMASTIA, M.; KREFT, S. A new method for the authentication of plant samples by analysing fingerprint chromatograms. **Phytochemical analysis**, v. 8, p. 123 – 132, 2007.

OZKAN, G.; BAYDARB, H.; ERBASB, S. The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, p.205–209, 2010.

PACHECO, T.A.R.C.; BARATA, L.E.S.; DUARTE, M.C.T. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera spp.*) balsams. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.123–124, 2006.

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, p. 1190-1198, 2008.

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

PATRUSHEVA, Y.V. Advantages of Two Dimensional Gas Chromatography. **Kinetics and Catalysis**, v. 56, p. 386-393, 2015.

PEDROSO, M.P. Detecção em cromatografia gasosa rápida e cromatografia gasosa bidimensional abrangente. **Scientia Chromatographica**, v. 3, p.145-154, 2011.

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

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, s.1, p.45- 61, 2002.

PLOWDEN, C. Notes on economic plants: The ethnobotany of copaiba (*Copaifera*) oleoresin in the Amazon. **Economic Botany**, v.58, n.4, p.729-739, 2004.

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

PROSSER, I.; PHILLIPS, A.L.; GITTINGS, S.; LEWIS, M.J.; HOOPER, A.M.; PICKETT, J.A.; BEALE, M.H. (+) (10R) Germacrene A synthase from goldenrod, *Solidago canadensis*; cDNA isolation, bacterial expression and functional analysis. **Phytochemistry**, v. 60, p. 691-702, 2002.

QUIROZ, D.; TOWNS, A.; LEGBA, S.I.; SWIER, J.; BRIÈRE, S.; SOSEF, M.; ANDEL, T.V. Quantifying the domestic market in herbal medicine in Benin, West Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 1100-1108, 2014.

RAVINDRA, N. S.; KULKARNI, R. N. Essential oil yield and quality in rose-scented geranium: variation among clones and plant parts. **Scientia Horticulturae**, v. 185, p. 31-35, 2015.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O.C.; WADT, P.G.S.; WADT, L.H.O.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; REGIANI, A.R. Variabilidade química e física do óleo-resina de *Copaifera* spp. no Sudoeste da Amazônia Brasileira. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.8, n.2-3, p.851-861, 2004.

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

ROMERO, A.L.; BAPTISTELLA, L.H.B.; IMAMURA, P.M. Absolute configuration of some dinorlabdanes from the copaiba oil. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v.20, n.6, p.1036–1040, 2009.

SABULAL, B.; DAN, M.; JOHN J, A.; KURUP, R.; PRADEEP, N.S.; VALSAMMA, R.K.; GEORGE, V. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v.67, n.22, p. 2469-2473, 2006.

SALEHI, S.; GOLPARVAR, A.R.; HADIPANAH, A. Effect of harvest time on yield and quality of *Thymus vulgaris* L. essential oil in Isfahan Province, Iran. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v.79, n.2, p.115-118, 2014.

SANTOS, A. Fenologia. **Rodriguésia**, v.31, n.50, p. 223-228, 1979.

SEQUINEL, R.; HATANAKA, R.R.; GUALTIERI, C.E.; FLUMIGNAN, D.L.; OLIVEIRA, J.E.; PASSARETTI FILHO, J. Cromatografia gasosa ultrarrápida: uma visão geral sobre parâmetros, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v.33, n.10, p. 2226-2232, 2010.

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

SILVA, C. M.; BOLZAN, A. A.; MALLMANN, C. A.; POZZATTI, P.; ALVES, S. H.; HEINZMANN, B. M. Sesquiterpenoids of *Senecio bonariensis* Hook. & Arn. Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.1, p. 87-92, 2010.

SILVA, E.B.P. SOARES, M.G.; MARIANE, B.; VALLIM, M.A.; PASCON, R.C.; SARTORELLI, P.; LAGO, J.H. The seasonal variation of the chemical composition of

essential oils from *Porcelia macrocarpa* R.E. Fries (*Annonaceae*) and their antimicrobial activity. **Molecules**, v.18, p.13574-13587, 2013.

SILVA, J.G.; SOUZA, I.A.; HIGIN, J.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 4, p. 1-16. 2007.

SIMÕES, Claudia Maria O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / **Editora da UFSC**, 2010.

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, p. 653-659, 2011.

SPANEVELLO, R.O.; VILA, A.J. 7- α -acetoxyhardwickiic acid: A furanoid clerodane. **Phytochemistry**, v.35, n.2, p.537-538, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; trad. SANTAREM et al. Fisiologia Vegetal. 3^a ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2004.

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

TINCUSI, B.M.; JIMÉNEZ, I.A.; BAZZOCCHI, I.L.; MOUJIR, L.M.; MAMANI, Z.A.; BARROSO, J.P.; RAVELO, A.G.; HERNÁNDEZ, B.V. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Planta Médica**, v.68, n.9, p.808-812, 2002.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal Of Food Science**, v.79, n.7, p.1231-1249, 2014.

TOSCANO RICO, J. M. **Plantas Mediciniais**. Academia das Ciências de Lisboa, Instituto de Estudos Acadêmicos para Seniores, Lisboa, 2011.

TUNG, Y.T.; CHUA, M.T.; WANG, S.Y.; CHANG, S.T. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous Cinnamon (*Cinnamomun osmophloeum*) twigs. **Bioresource Technology**, v.99, n.9, p.3908-3913, 2008.

UMLAUF, D. ZAPP, J.; BECKER, H.; ADAM, K.P. Biosynthesis of the irregular monoterpene artemisia ketone, the sesquiterpene germacrene D and other isoprenoids in *Tanacetum vulgare* L. (*Asteraceae*). **Phytochemistry**, v. 65, p. 2463-2470, 2004.

VALDEVITE, L. M. Estudo do efeito in vitro do extrato das folhas e do óleo-resina de Copaíba sobre fatores de virulência de *Streptococcus mutans* relacionados à cárie dental.

Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, **Universidade de São Paulo**. Ribeirão Preto – SP, 128 p., 2007.

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

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; STADEN, J. F. V. DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in Analytical Chemistry (IUPAC recommendation). **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p. 1381 – 1386, 2001.

YAN, Z.; LI, T.; LV, P.; LI, X.; ZHOU, C.; YANG, X. Sensitive and reliable multianalyte quantitation of herbal medicine in rat plasma using dynamic triggered multiple reaction monitoring. **Journal of Chromatography B**. v. 928, p. 22-31, 2013.

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

ZOGHBI, M.G.B.; LAMEIRA, O.A.; OLIVEIRA, E.C.P. Seasonal variation of oleoresin and volatiles from *Copaifera martii* Hayne growing wild in the State of Pará, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.19, n.6, p.504-506, 2007.

