



**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  
*Copaifera sp.* 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. publiflora* Benth. Os óleos voláteis de *C. multijuga*, *C. paupera* e *C. publiflora* 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  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Foram isolados os sesquiterpenos  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -elemeno,  $\delta$ -cadineno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -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  $\beta$ -cariofileno, germacreno D e  $\beta$ -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  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR. The sesquiterpenes  $\alpha$ -cubebene,  $\beta$ -elemene,  $\delta$ -cadinene,  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -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  $\beta$ -caryophyllene,  $\beta$ -elemene, and germacrene D which 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

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

<b>Figura 15.</b>	<i>C. langsdorffii</i> utilizada neste estudo e suas folhas.....	31
<b>Figura 16.</b>	Processo de esgotamento do material vegetal por sohxlet.....	32
<b>Figura 17.</b>	Perfil do óleo das espécies de <i>Copaifera</i> por CG – DIC.....	37
<b>Figura 18.</b>	Destilador de Bancada 800 <i>Automatic Micro Spinning Band Distillation</i> .....	41
<b>Figura 19.</b>	Comparação entre os CCDs das frações 7 (A) e 8 (B) de <i>Copaifera multijulga</i> .....	42
<b>Figura 20.</b>	Cromatogramas dos compostos CM1 (A) e CM2 (B) Obtidos do óleo de <i>Copaifera multijulga</i> .....	43
<b>Figura 21.</b>	Cromatogramas dos compostos CP1 (A), CP2 (B) e CP3 (C) Obtidos do óleo de <i>Copaifera paupera</i> .....	44
<b>Figura 22.</b>	Cromatograma do composto CB1 Obtido do óleo de <i>Copaifera pubiflora</i> .....	44
<b>Figura 23.</b>	Estrutura do $\beta$ -cariofileno.....	45
<b>Figura 24.</b>	Espectro de massas do composto CM1.....	46
<b>Figura 25.</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto CM1 em $\text{CDCl}_3$ .....	47
<b>Figura 26.</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto CM1 em $\text{CDCl}_3$ .....	48
<b>Figura 27.</b>	Estrutura do $\alpha$ -humuleno.....	49
<b>Figura 28.</b>	Espectro de massas do composto CM2.....	50
<b>Figura 29.</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto CM2 em $\text{CDCl}_3$ .....	51
<b>Figura 30.</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto CM2 em $\text{CDCl}_3$ .....	52

<b>Figura 31.</b>	Estrutura do $\alpha$ -copaeno.....	53
<b>Figura 32.</b>	Espectro de massas do composto CP1.....	54
<b>Figura 33.</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto CP1 em $\text{CDCl}_3$ .....	55
<b>Figura 34.</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto CP1 em $\text{CDCl}_3$ .....	56
<b>Figura 35.</b>	Estrutura do $\delta$ -cadineno.....	57
<b>Figura 36.</b>	Espectro de massas do composto CP2.....	58
<b>Figura 37.</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto CP2 em $\text{CDCl}_3$ .....	59
<b>Figura 38.</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto CP2 em $\text{CDCl}_3$ .....	60
<b>Figura 39.</b>	Estrutura do Óxido de cariofileno.....	61
<b>Figura 40.</b>	Espectro de massas do composto CP3.....	62
<b>Figura 41.</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto CP3 em $\text{CDCl}_3$ .....	63
<b>Figura 42.</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto CP3 em $\text{CDCl}_3$ .....	64
<b>Figura 43.</b>	Estrutura do $\beta$ -elemeno.....	65
<b>Figura 44.</b>	Espectro de massas do composto CB1.....	66
<b>Figura 45.</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto CB1 em $\text{CDCl}_3$ .....	67
<b>Figura 46.</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto CB1 em $\text{CDCl}_3$ .....	68
<b>Figura 47.</b>	Curvas analíticas para $\alpha$ -copaeno, $\beta$ -elemeno, $\delta$ -cadineno, $\beta$ -cariofileno, $\alpha$ -humuleno e O-cariofileno.....	73
<b>Figura 48.</b>	Compostos voláteis identificados nas folhas de <i>C. langsdorffii</i> .....	81

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

## LISTA DE TABELAS

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



<b>Tabela 15.</b>	Resultados obtidos nos estudos de recuperação.....	84
<b>Tabela 16.</b>	Dados obtidos para o padrão secundário (Tetrametilbenzeno).....	85
<b>Tabela 17.</b>	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
<b>Tabela 18.</b>	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
<b>Tabela 19.</b>	Valores da concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial e dos sesquiterpenos frente a leveduras.....	89
<b>Tabela 20.</b>	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 <sub>3</sub>	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
$\delta$	Deslocamento químico

## SUMÁRIO

RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xviii
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
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
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
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

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
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
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>

## 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 metabolitos 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).

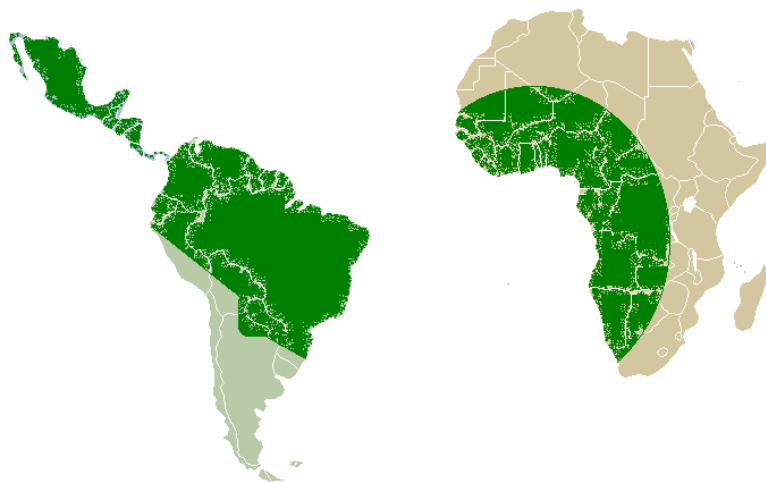
A comercialização de fitoterápicos e a possibilidade de exportação destes produtos são afetadas pela falta de certificação de eficácia, segurança e qualidade, parâmetros estes que devem ser prioritariamente analisados segundo métodos modernos, os quais são

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 copaíbas 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).

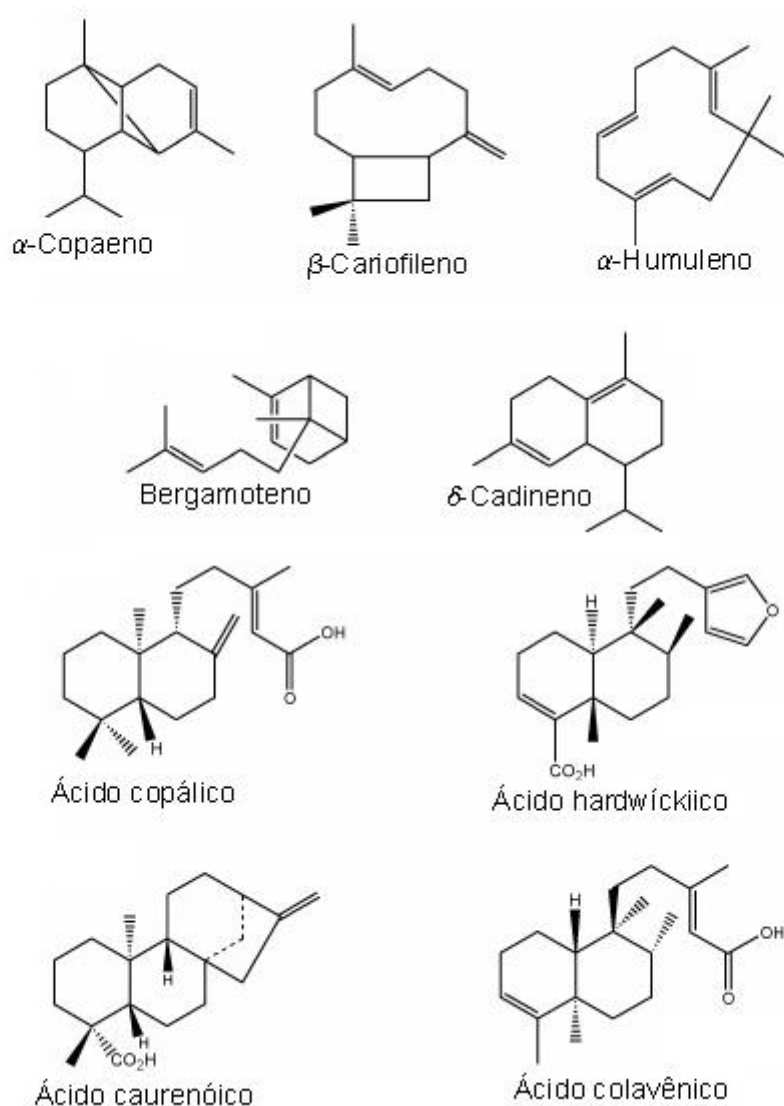
O óleo de copaíba comercializado sem controle sofre constantes adulterações, sendo que as mais comuns são com óleos graxos e o álcool etílico. É possível encontrar, ainda, adição de água ou gordura animal, ou impurezas como cascas, cinzas e terra, as quais afetam a aparência e conteúdo do produto, ou 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).

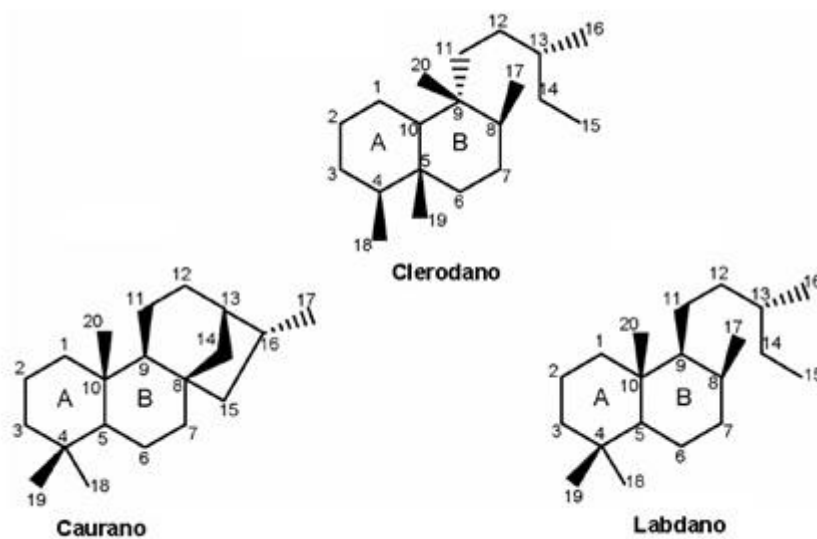
Craveiro e colaboradores (1981) descreveram a composição do óleo volátil obtido a partir da oleorresina de *Copaifera* sp., na qual os principais sesquiterpenos identificados foram o  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -muuroleno,  $\alpha$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





**Figura 2.** Sesquiterpenos e diterpenos comuns a óleorresina da copaíba

Entre os sesquiterpenos, o  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -acetóxi-hardwíckiico (SPANEVELLO & VILA, 1994) e 7 $\alpha$ -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- $\beta$ -hidróxi-15,16-dinorlabda-8(17)-eno-13-ona (MONTI *et al.*, 1996), (-)-15,16-dinorlabda-8(17)-eno-3 $\beta$ ,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).

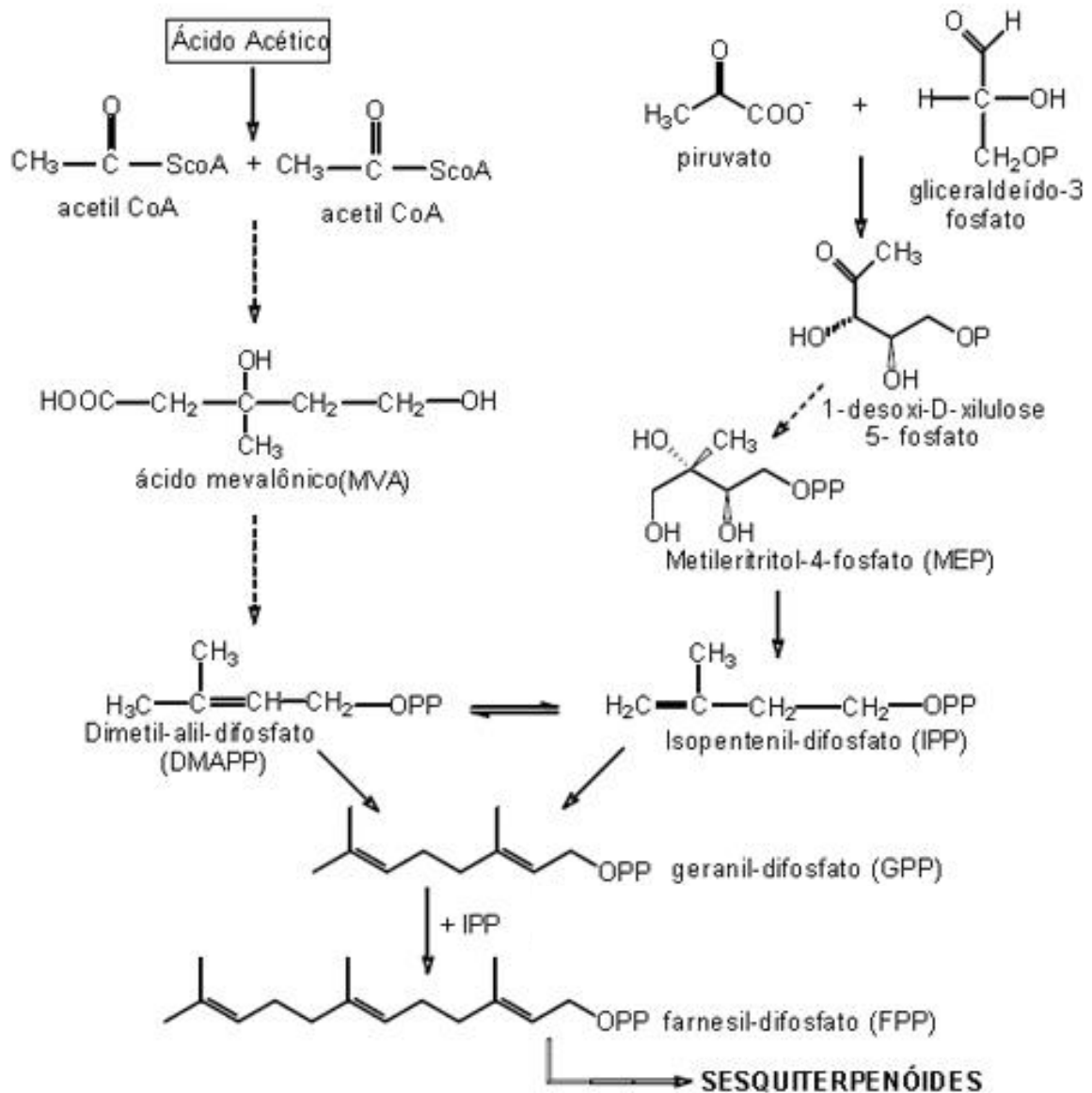
Óleos essenciais são compostos líquidos voláteis, aromáticos, também chamados de etéreos por serem solúveis em solventes orgânicos apolares como o éter. Em contato com a água apresentam pouca solubilidade, porém o suficiente para aromatizar a solução, os chamados hidrolatos (SIMÕES *et al.*, 2010). Os 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  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ;
- 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.

## 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:  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -elemeno,  $\delta$ -cadineno e óxido de cariofileno.

O método desenvolvido por GC-DIC é confiável para a quantificação dos sesquiterpenos  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -elemeno,  $\delta$ -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  $\beta$ -cariofileno, germacreno D e  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\alpha$ -humulene and  $\beta$ -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.; MAGNIN, 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 antinociceptive 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 tenuissimae* 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- $\alpha$ -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<sup>a</sup> 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  $\beta$ -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.

