

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARIA JUÍVA MARQUES DE FARIA

Oleoresina de *Copaifera* spp.: caracterização, verificação da atividade antimicrobiana *in vitro* e avaliação preliminar de uma formulação em vacas leiteiras com mastite.

Goiânia
2014

MARIA JUÍVA MARQUES DE FARIA

Oleorresina de *Copaifera* spp.: caracterização, verificação da atividade antimicrobiana *in vitro* e avaliação preliminar de uma formulação em vacas leiteiras com mastite.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito necessário à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador (a): Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição

Co-orientador (a): Profa. Dra. Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga

Goiânia
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

F224o Faria, Maria Juíva Marques de.
Oleoresina de *Copaifera* spp. [manuscrito] :
caracterização, verificação da atividade antimicrobiana *in vitro* e avaliação preliminar de uma formulação em vacas
leiteiras com mastite / Maria Juíva Marques de Faria. - 2014.
150 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição;
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carla Afonso da Silva Bitencourt
Braga.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Faculdade de Farmácia, 2014.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

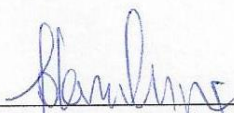
1. Mastite bovina – Tratamento 2. Bovino de leite -
Tratamento 3. Óleo essencial – Uso 4. Óleo de copaíba – Uso
I. Título.

CDU: 665.52:618.19-002:636.2

Folha de Aprovação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 07 de maio de 2014, pela mestranda Maria Juíva Marques de Faria.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição (FF/UFG)
Presidente



Profa. Dra. Rosa Helena Veras Mourão (UFOPA)



Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges (PUC/GO)

Principalmente aos meus pais, Oscar Júnior e Denise, exemplos de força e determinação e, por sempre me incentivarem em alcançar os meus objetivos. Aos meus familiares e amigos, em especial, a minha tia Tânia, exemplo de ética e humildade. Aos mestres de hoje e de outrora, pelos ensinamentos e dedicação...

Dedico com carinho este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Sozinha este trabalho não teria se realizado...

Deus, Todo Poderoso, muito obrigada por tudo, pela força, saúde, proteção, pela permissão de ter conhecido pessoas maravilhosas e por estar concluindo mais uma etapa na minha vida.

Quero agradecer aos meus pais, Oscar Júnior e Denise, pelos exemplos, por sempre estarem do meu lado, dando os melhores conselhos. Amo vocês, sou eternamente grata por tudo! Pai, apesar de eu estar “grandinha”, obrigada por ter paciência de sentar e estudar comigo em momentos desesperadores.

Ao meu irmão Oscar Neto, que apesar da distância, está sempre torcendo por mim.

Ao Rodrigo, pelo companheirismo, paciência, pelos momentos de alegria nos dias difíceis e pela ajuda na formatação deste trabalho.

À toda minha família e amigos próximos, pela compreensão da minha ausência nas confraternizações, em dias de trabalho.

À minha tia Tânia, minha madrinha profissional, por contribuir na execução deste trabalho, patrocinando as bases galênicas e cedendo o espaço da sua empresa para manipulação das formulações e também, por sempre estar me orientando e ajudando em todos os momentos da minha vida.

Às minhas companheiras de república, Ana Paula, Débora e Carmen (a mexicana), por compartilharmos experiências.

Ao Prof. Dr. Edemilson Cardoso, obrigada por ter aberto as portas do Laboratório de PD&I de Bioprodutos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (FF/UFG), dado a oportunidade de realizar o mestrado e pelos incentivos constantes aos estudos.

Ao Prof. Dr. José Realino, pessoa humilde e de grande conhecimento. Muito obrigada pela amizade e pelos ensinamentos. Quando mais precisei, se dispôs a me ajudar.

Às professoras Dra. Leonice Manrique Faustino Tresvenzol, Dra. Maria Cláudia Dantas P. B. André e Dra. Maria Teresa Freitas Bara pelas importantes contribuições no exame de qualificação.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) e do Laboratório de PD&I de Bioprodutos da FF/UFG, Rúbia, Sttefany, Karina, Omar, Priscila Kelly, Natasha, Wanessa Rocha, Carmem, Suzana, Raphael “Mexicano”, Cristhianne, Luiza, Stone, Elvescley e tantos outros, que me ajudaram e alegraram em vários momentos dentro e fora do laboratório. Jamais esquecerei das viagens aos congressos!

Jordana Nunes, amiga de jornada, obrigada pela amizade. Conte sempre comigo!

Leonardo Luiz, muito obrigada pelas ajudas, desde o projeto da veterinária e até nos dias de hoje.

Leandra Almeida, muito obrigada pela paciência e pelos ensinamentos no cromatógrafo líquido de alta eficiência, sem você não teria conseguido.

Como é bom ser orientanda da Profa. Dra. Carla Afonso! Profa., não tenho palavras para agradecer pela paciência, pela dedicação, pela amizade e por ensinar a pesquisar. Jamais esquecerei das ordenhas nas madrugadas, dos dias à noite em que foi ao laboratório para ensinar, das aplicações intramamárias embaixo de chuva, dos atoleiros e das leituras incalculáveis deste trabalho. Serei eternamente grata por tudo!

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG, Acácio (“chuchu”), Marcos, Débora, Priscila, Nayara, Veraluce, pelas alegrias, principalmente na hora de lavar os incontáveis materiais de trabalho. Como é bom ter a amizade de vocês!

Aos proprietários das três granjas leiteiras por terem cedidos os animais para coleta das amostras de leite.

Ao Leandro Batista e ao Sr. Dorival, responsáveis pela Fazenda Escola da UFG, obrigada por terem cedido os animais para realização dos experimentos e por confiarem na seriedade do nosso trabalho. À Dona Dora, ordenhadeira, obrigada pela paciência e pela ajuda na sala de ordenha, a sua delicadeza e o carinho com os animais, me encantaram!

Aos animais pela oportunidade de trabalhar na área da veterinária e por conhecer uma doença tão problemática e que precisa de ajuda.

Ao Prof. Dr. Valter dos Santos Marques Souza e ao Prof. Dr. Pedro Gomes Cruz, do Instituto Federal Goiano- Campus Ceres (GO), pela ajuda na estatística.

Ao Prof. Dr. Pedro Henrique Ferri, do Instituto de Química da UFG, pela realização da análise espectrométrica.

Ao Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz, do Instituto de Química da UFG, pela análise da oleoresina de *Copaifera* spp. por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* de ressonância ciclôtrica de íons por transformada de Fourier (ESI FT-ICR MS).

Ao Jerônimo Neto e Vânia Rodríguez do Núcleo de Estudo e Pesquisa Tóxico-Farmacológica da FF/UFG pelas contribuições.

À toda equipe da Therapêutica Farmácia de Manipulação®, em especial ao Sidclay, técnico do laboratório de semi-sólidos, pela disponibilidade e dedicação.

À Profa. Rosa Mourão da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)- Campus Santarém (PA) e à toda sua equipe, pelas trocas de conhecimento e pela oportunidade de conhecer, de pertinho, a matéria-prima vegetal de estudo deste trabalho.

À Fernanda Bellato, a melhor secretária. Obrigada pelas orientações!

À Dona Glórinha, Mel e Edna pelo bom dia e pelo o sorriso de todos os dias.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Com os olhos cheios d'água, meu sincero muito obrigado a todos!

“ Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim. ”

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

Mastite bovina é um processo inflamatório/infeccioso da glândula mamária, de etiologia complexa e multivariada, sendo a de origem bacteriana a mais frequente. Devido aos elevados custos dos tratamentos dessa enfermidade, resistência bacteriana aos antibióticos, além dos prejuízos inerentes ao descarte do leite ou à presença de resíduos de medicamentos no mesmo, faz-se necessário estudos que busquem métodos alternativos para contornar essa problemática. As plantas medicinais com potencial antimicrobiano vêm ganhando espaço na medicina veterinária com o objetivo de reduzir o impacto e o uso de medicamentos de forma indiscriminada, bem como manter a integridade do animal e controlar a disseminação de linhagens bacterianas resistentes. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a oleorresina de *Copaifera* spp., verificar atividade antimicrobiana *in vitro* da oleorresina e do óleo essencial de *Copaifera* spp. frente às bactérias aeróbias e facultativas isoladas de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica grau III e avaliar preliminarmente, *in vivo*, formulação fitoterápica à base de *Copaifera* spp. Os testes de caracterização da oleorresina de *Copaifera* spp. demonstraram sua autenticidade e qualidade, a qual foi considerada adequada para o uso. As análises realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* de ressonância ciclôtrônica de íons por transformada de Fourier (ESI FT-ICR MS) identificaram os sesquiterpenos e diterpenos presentes no óleo essencial e na oleorresina de *Copaifera* spp., respectivamente. A técnica Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para sesquiterpenos, em especial para β -cariofileno, pode ser utilizada no controle de qualidade de oleorresina e óleo essencial de *Copaifera* spp., bem como em formulação fitoterápica utilizando oleorresina de *Copaifera* spp. como matéria-prima vegetal. A oleorresina apresentou melhor atividade antimicrobiana do que o óleo essencial de *Copaifera* spp. ($p < 0,0001$) frente às 55 bactérias isoladas. O teste de antibiograma das três formulações fitoterápicas demonstrou que a oleorresina de copaíba reproduziu a sua atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos isolados. A avaliação preliminar, *in vivo*, de uma formulação fitoterápica contendo 20% oleorresina de copaíba não foi eficaz e nem segura, pois intensificou o processo inflamatório, havendo necessidade de testes futuros, como de citotoxicidade e de irritabilidade dessa matéria-prima vegetal e do veículo utilizado.

Palavras-chave: Mastite Bovina. Copaíba. Oleorresina. Óleo Essencial. *Copaifera* spp. Concentração Inibitória Mínima. ESI FT-ICR MS.

ABSTRACT

Bovine mastitis is an inflammatory/infectious process of the mammary gland, its etiology is complex and multivariate. The most common mastitis has bacterial origin. Because of the high cost to treat this disease, and the bacterial resistance to antibiotics, beyond the losses due to the milk discard or the presence of drug residues in milk, studies are necessary to find out alternative methods to circumvent these problematic. The medicinal plants with antimicrobial activity have been making room in veterinary medicine with the objective to reduce the impact and the use of drugs indiscriminately, as well as maintain the integrity of the animal and control the dissemination of resistant bacterial lineage. Therefore, the aim of this work was characterize the oleoresin *Copaifera* spp., verify the antimicrobial activity *in vitro* of oleoresin and essential oil of *Copaifera* spp. in combating against aerobic and facultative isolated bacteria from cows' milk with subclinical grade III mastitis diagnostic and evaluate preliminarily, *in vivo*, phytotherapeutic formulation composed of *Copaifera* spp. The tests for characterization of the oleoresin, confirmed its authenticity and quality, considered appropriate for use. The analyzes performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) and *electrospray* ionization Fourier transformed ionic cyclotron resonance mass spectrometry (ESI FT-ICR MS) identified sesquiterpenes and diterpenes present in the essential oil and oleoresin of *Copaifera* spp., respectively. The technique of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for sesquiterpenes, especially for β -caryophyllene, can be used in quality control of essential oil and oleoresin of *Copaifera* spp., as well as in phytotherapeutic formulation using oleoresin of *Copaifera* spp. The oleoresin showed better antimicrobial activity than the essential oil of *Copaifera* spp. ($p < 0,0001$) in combating the 55 isolated bacteria. The antibiogram test of the three phytotherapeutic formulations demonstrated that the oleoresin had antimicrobial activity against the isolated microorganisms. The preliminary evaluation, *in vivo*, of a phytotherapeutic formulation containing 20% oleoresin of copaiba was neither effective nor safe, because it intensified the inflammatory process, requiring further tests, such as cytotoxicity and irritability of the raw material plant and of the vehicle used.

Key words: Bovine Mastitis. Oleoresin. Essential Oil. *Copaifera* spp. Minimum Inhibitory Concentration. ESI FT-ICR MS.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Divisão interna dos quartos mamários do úbere de vacas.....28
- Figura 2-** Extração da oleorresina de copaíba: **(A)** Perfuração do fuste com trado; **(B)** Escoamento da oleorresina; **(C)** Coleta da oleorresina; **(D)** Cessamento do escoamento da oleorresina; **(E)** Fechamento do orifício.32
- Figura 3-** Diversidade de coloração da oleorresina de copaíba: **(A):** Vista superior de frascos contendo oleorresinas de copaíba extraídas em Santarém (PA); **(B):** Oleorresinas de copaíba comercializada no Mercado Municipal de Santarém (PA). 33
- Figura 4-** Coleta de leite em caneca de fundo escuro ou telada para detecção de mastite clínica.....50
- Figura 5-** Bandeja contendo leite e reagente CMT utilizados para detecção de mastite subclínica.51
- Figura 6-** Microplaca estéril, contendo 96 poços em forma de “U”, utilizada no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo Müller Hinton.53
- Figura 7-** Esquema da técnica de microdiluição em caldo MH para teste de atividade antimicrobiana da oleorresina (OR) e do óleo essencial (OE) de *Copaifera* spp. frente às bactérias isoladas de amostras de leite de vacas com mastite subclínica grau III. As cores diferentes nas duplas de linhas de A a F indicam inóculos diferentes.....55
- Figura 8-** Deposição das formulações fitoterápicas à base de *Copaifera* spp., dos controles e do antibiótico gentamicina sobre o meio Müller-Hinton (MH).....57
- Figura 9-** Esquema de montagem do teste de antibiograma nas placas Petri contendo ágar Müller-Hinton (MH).58
- Figura 10-** Seringa para uso de medicamento intramamário em bovino.59
- Figura 11-** Antissepsia do teto de vacas leiteiras com solução iodada (*pré-dipping*).60
- Figura 12-** Teste *in vivo*: **A:** Aplicação intramamária da formulação fitoterápica à base de *Copaifera* spp. e do controle; **B:** Massagem pós-aplicação.60
- Figura 13-** Espectro de massas, no modo negativo, por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier- ESI(-) FT-ICR MS, da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.72
- Figura 14-** Estrutura química do ácido *ent-caura-16-eno-19-óico*.74
- Figura 15-** Estrutura química do (1 α ,4 α ,4 β ,10 β)-10-formil-1,4a-dimetil-8 metilenogibbano-1-carboxilato.74

Figura 16- Estrutura química do [(17 β)-3,17-dihidróxiestra-1(10),2,4-trien-17-il] acetato.	74
Figura 17- Estrutura química do ácido <i>ent</i> -8(17),13-labdadieno-15,19-dióico (ácido <i>ent</i> -agático).	74
Figura 18- Estrutura química do ácido 13-clerodeno-15,16-olídeo-18-óico.	75
Figura 19- Estrutura química do (4aR,5S,7R,8aS,9aS)-8a-hidróxi-3,4a, 5-trimetil-2-oxo-2,4,4a,5,6,7,8,8a,9,9a-decahidronafto[2,3-b]furano-7-il(2E)-2-metil-2 butenoato.	75
Figura 20- Estrutura química do 1-formil-3,7-dihidróxi-4a-(hidróximetil)-1-metil-8-metilenogibbano-10-carboxilato.	75
Figura 21- Estrutura química do ácido 3,13-clerodadieno-15,16-olídeo-18-óico (ácido patagônico).	75
Figura 22- Estrutura química do ácido <i>ent</i> -15,16-epóxi-7 β -hidróxi-3,13(16),14-clerodatrieno-18-óico (ácido 7-hidróxi-hardwíckiico).	76
Figura 23- Estrutura química do (5 β , 7 α , 8 α , 9 β , 10 α , 13 α , 14R) -7,14-dihidróxi-15-oxokaur-16-en-19-óico.	76
Figura 24- Estrutura química do (1 β , 5 β , 9 ξ , 10 α , 11 α , 13 α , 14S) -1,11,14,20-tetrahidróxi-7,20-epoxikaur-16-en-15-ona.	76
Figura 25- Cromatogramas 2D obtidos da análise do padrão β -cariofileno e da amostra oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. nas condições cromatográficas estabelecidas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).	79
Figura 26- Perfil cromatográfico 2D a 210nm do padrão β -cariofileno, da amostra de oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. e da solução diluente acetonitrila 75% (v/v).	80
Figura 27- Espectro de absorção do β -cariofileno no padrão e na amostra de oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp.	81
Figura 28- Linearidade: curva padrão média do padrão β -cariofileno.	82
Figura 29- Linearidade: curva padrão média da amostra de oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp.	83
Figura 30- Perfil cromatográfico 2D a 210nm do padrão β -cariofileno, da amostra de óleo essencial (OE) de <i>Copaifera</i> spp. e da solução diluente acetonitrila 75% (v/v).	88
Figura 31- Espectro de absorção do β -cariofileno no padrão e na amostra de óleo essencial (OE) de <i>Copaifera</i> spp.	89
Figura 32- Linearidade: curva padrão média da amostra de óleo essencial (OE) de <i>Copaifera</i> spp.	90

Figura 33- Atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. frente aos <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (SCP) isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.	98
Figura 34- Atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. frente aos <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (SCN) isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.	100
Figura 35- Atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. frente aos <i>Corynebacterium</i> spp. isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.	101
Figura 36- Atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. frente aos <i>Streptococcus</i> do grupo C, F, G isolados de amostras de leite de vacas com mastite bovina grau III.	102
Figura 37- Atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. frente as <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.....	103
Figura 38- Atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. frente as 55 bactérias isoladas de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.....	104
Figura 39- Antibiograma: Resultado da sensibilidade das bactérias isoladas de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica grau III frente à três formulações à base de oleorresina (OR) de copaíba e antibiótico gentamicina.....	111
Figura 40- Perfil cromatográfico 2D a 210nm do padrão β -cariofileno, da amostra (formulação fitoterápica aniônica) e do veículo (base galênica aniônica).	115
Figura 41- Espectro de absorção do β -cariofileno no padrão e na formulação fitoterápica à 20% de oleorresina de copaíba utilizando-se base galênica aniônica.	116
Figura 42- Linearidade: curva padrão média da formulação fitoterápica à 20% de oleorresina de copaíba utilizando-se base galênica aniônica.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sistema cromatográfico sob condição gradiente utilizado no desenvolvimento e validação do método para quantificação do marcador β -cariofileno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	46
Tabela 2- Parâmetros e especificações do <i>system suitability</i> utilizados para verificar a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico.	47
Tabela 3- Parâmetro utilizado para interpretação dos resultados obtidos pelo teste CMT.	51
Tabela 4- Composição química do óleo essencial (OE) de <i>Copaifera</i> spp. analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).	70
Tabela 5- Fórmulas moleculares e os diterpenos estimados do espectro de massas, modo negativo, por espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourie (ESI(-) FT-ICR MS) da oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp.....	73
Tabela 6- Parâmetros de <i>system suitability</i> obtidos para os cromatogramas do padrão β -cariofileno e da amostra de oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp.	78
Tabela 7- Áreas dos picos do padrão β -cariofileno obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a construção da curva padrão média.....	82
Tabela 8- Áreas dos picos da amostra de oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a construção da curva padrão média.	83
Tabela 9- Repetibilidade do método analítico para doseamento de β -cariofileno na amostra de oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp.....	84
Tabela 10- Precisão intermediária do método analítico para doseamento de β -cariofileno na amostra de oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp.....	85
Tabela 11- Determinação da exatidão por meio da recuperação da oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp.	85
Tabela 12- Resultados da robustez do método para doseamento de β -cariofileno na amostra de oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp.....	86
Tabela 13- Parâmetros de <i>system suitability</i> obtidos para os cromatogramas do padrão β -cariofileno e da amostra de óleo essencial (OE) de <i>Copaifera</i> spp.	87
Tabela 14- Áreas dos picos da amostra de óleo essencial (OE) de <i>Copaifera</i> spp. obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a construção da curva padrão média.	90
Tabela 15- Repetibilidade do método analítico para doseamento de β -cariofileno na amostra de óleo essencial (OE) de <i>Copaifera</i> spp.....	91

Tabela 16- Precisão intermediária do método analítico para doseamento de β -cariofileno na amostra de óleo essencial (OE) de <i>Copaifera</i> spp.....	91
Tabela 17- Total de bactérias isoladas de amostras de leite de vacas diagnosticas com mastite subclínica grau III no mês de agosto de 2012 e fevereiro de 2013.	93
Tabela 18- Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. frente aos <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (SCP) isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.	97
Tabela 19- Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. frente aos <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (SCN) isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.....	99
Tabela 20- Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial (OE) e oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. frente aos <i>Corynebacterium</i> spp. isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.	100
Tabela 21- Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. frente aos <i>Streptococcus</i> do grupo C, F, G isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.	101
Tabela 22- Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. frente às <i>Escherichia coli</i> isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.	103
Tabela 23- Bactérias isoladas de amostras de leite de vacas diagnosticas com mastite subclínica grau III no dia 0 (antes da 1° aplicação intramamária), como parâmetro para indicar a eficácia ou não da formulação farmacêutica à base de <i>Copaifera</i> spp.....	113
Tabela 24- Parâmetros de <i>system suitability</i> obtidos para os cromatogramas do padrão β -cariofileno e da formulação fitoterápica aniônica.	114
Tabela 25- Áreas dos picos da formulação fitoterápica à 20% de oleorresina de copaíba utilizando-se base galênica aniônica obtidas para a construção da curva padrão média.	118
Tabela 26- Repetibilidade do método analítico para doseamento de β -cariofileno na formulação fitoterápica à 20% de oleorresina de copaíba utilizando-se base galênica aniônica.	118
Tabela 27- Precisão intermediária do método analítico para doseamento de β -cariofileno na formulação fitoterápica à 20% de oleorresina de copaíba utilizando-se base galênica aniônica.	119

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1-** Resultados da caracterização da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.....63
- Quadro 2-** Resultado da sensibilidade dos *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) frente às três formulações fitoterápicas à base de oleorresina de copaíba e à gentamicina..... 108
- Quadro 3-** Resultado da sensibilidade dos *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) frente às três formulações fitoterápicas à base de oleorresina de copaíba e à gentamicina..... 109
- Quadro 4-** Aplicações intramamárias de formulação fitoterápica à 20% de oleorresina de copaíba utilizando base galênica aniônica. 112
- Quadro 5-** Aplicações intramamárias do controle (base galênica aniônica). 112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADN- ácido desoxirribonucleico
- CCS- Contagem de Células Somáticas
- CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais
- CG/EM- Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
- CIM- Concentração Inibitória Mínima
- CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CMT- *California Mastitis Test*
- CV- Coeficiente de Variação
- DP- Desvio Padrão
- ESI- *Electrospray*
- ESI FT-ICR MS- Espectrometria de massas com ionização por *electrospray* de ressonância ciclôtrica de íons por transformada de Fourie
- FA- Frequência Absoluta
- FDA- *Food and Drug Administration*
- FR- Frequência Relativa
- FT- Fator de cauda
- IA- Índice de Acidez
- LD- Limite de Detecção
- LQ- Limite de quantificação
- MH- Müeller-Hinton
- N- número de pratos teóricos da coluna
- OE- Óleo Essencial de *Copaifera* spp.
- OR- Oleorresina de *Copaifera* spp.
- RENISUS- Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS
- Rs- Resolução
- SCN- *Staphylococcus* coagulase negativo
- SCP- *Staphylococcus* coagulase positivo
- SEBRAE- Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
- SLC- sangue lisado de cavalo
- TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- TSB- *Tryptic Soy Broth*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	MASTITE BOVINA.....	24
1.2	ENTRAVES NO CONTROLE DA MASTITE BOVINA.....	27
1.3	TRATAMENTO ALTERNATIVO.....	30
1.4	OLEORRESINA DE COPAÍBA	31
1.4.1	Extração da oleorresina	32
1.4.2	Composição química	33
1.4.3	Atividade farmacológica	34
2	OBJETIVOS	38
2.1	OBJETIVO GERAL	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	MATERIAL	40
3.1.1	Material vegetal	40
3.1.2	Reagentes	40
3.2	CARACTERIZAÇÃO DA OLEORRESINA (OR) DE <i>Copaifera</i> spp.	40
3.2.1	Caracterização organoléptica	41
3.2.2	Análises para verificar adulterações na oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp.	41
3.2.2.1	Adulteração por parafina	41
3.2.2.2	Adulteração por óleo fixo	41
3.2.2.3	Adulteração por terebintina	41
3.2.2.4	Adulteração por bálsamo de gurjum	42
3.2.3	Análise de solubilidade	42
3.2.4	Determinação da densidade relativa e de massa	42
3.2.5	Determinação da viscosidade	43

3.2.6	Índice de Acidez (IA)	43
3.2.7	Obtenção do óleo essencial (OE) de <i>Copaifera</i> spp.	43
3.2.8	Análise química da fração volátil da oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp.	44
3.2.9	Identificação dos diterpenos presentes na oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. por espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (ESI FT-ICR MS).....	44
3.2.10	Desenvolvimento e validação do método de quantificação do marcador β -cariofileno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	45
3.2.10.1	Determinação das condições cromatográficas.....	45
3.2.10.2	Adequabilidade do sistema (<i>system suitability</i>).....	46
3.2.10.3	Validação da metodologia analítica.....	47
3.2.11	Co-validação da metodologia analítica para o óleo essencial (OE) de <i>Copaifera</i> spp.	49
3.3	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA	49
3.3.1	Escolha dos animais.....	49
3.3.2	Coleta das amostras de leite.....	50
3.3.3	Caracterização fenotípica dos micro-organismos isolados de mastite bovina subclínica grau III	51
3.3.4	Análise Estatística	52
3.4	TESTES DE SUSCETIBILIDADES	52
3.4.1	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	52
3.4.1.1	Reativação dos micro-organismos	53
3.4.1.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	53
3.4.1.3	Verificação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de três formulações fitoterápicas à base de <i>Copaifera</i> spp.....	56
3.4.2	Análise estatística.....	58
3.5	TESTES <i>IN VIVO</i>	58
3.5.1	Produção magistral da formulação fitoterápica à base de <i>Copaifera</i> spp. para aplicação <i>in vivo</i>	59

3.5.2	Aplicação intramamária e avaliação preliminar de formulação fitoterápica contendo <i>Copaifera</i> spp.	59
3.5.3	Determinação do teor de β-cariofileno na formulação fitoterápica à base de <i>Copaifera</i> spp.	61
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA OLEORRESINA (OR) DE <i>Copaifera</i> spp.	63
4.1.1	Caracterização organoléptica	64
4.1.2	Análises para verificar adulterações na oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp.	65
4.1.3	Análise de solubilidade	66
4.1.4	Determinação da densidade relativa e de massa	67
4.1.5	Determinação da viscosidade	67
4.1.6	Índice de Acidez (IA)	68
4.1.7	Obtenção do óleo essencial (OE) de <i>Copaifera</i> spp.	69
4.1.8	Análise química da fração volátil da oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp.	69
4.1.9	Identificação dos diterpenos presentes na oleorresina (OR) de <i>Copaifera</i> spp. por espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourie (ESI FT-ICR MS)	71
4.1.10	Desenvolvimento e validação do método de quantificação do marcador β-cariofileno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	77
4.1.10.1	Determinação das condições cromatográficas e <i>system suitability</i>	78
4.1.10.2	Validação da metodologia analítica.....	79
4.1.11	Co-validação da metodologia analítica para o óleo essencial (OE) de <i>Copaifera</i> spp.	86
4.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA	91
4.2.1	Coleta das amostras de leite	92
4.2.2	Caracterização fenotípica de micro-organismos isolados de mastite bovina subclínica grau III	92
4.3	TESTES DE SUSCETIBILIDADES	94
4.3.1	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	94

4.3.1.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	95
4.3.1.2	Verificação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de três formulações fitoterápicas à base de <i>Copaifera</i> spp.....	106
4.4	TESTE <i>IN VIVO</i>	112
4.4.1	Aplicação intramamária e avaliação preliminar de formulação fitoterápica contendo <i>Copaifera</i> spp.....	112
4.4.2	Determinação do teor de β-cariofileno na formulação fitoterápica à base de <i>Copaifera</i> spp.....	114
5	CONCLUSÕES.....	121
6	PERSPECTIVAS	124
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
	ANEXO	140
	APÊNDICE.....	147

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O sistema agronegócio e industrial do leite vêm se destacando há muito tempo na economia mundial (GUIMARÃES; LANGONI, 2009). No Brasil, é um dos mais importantes, devido ao seu enorme impacto social e econômico, gerando mais de três milhões de empregos diretos na produção primária e agregando mais de seis bilhões de reais ao valor da produção agropecuária nacional (VILELA; LEITE; RESENDE, 2002). É uma atividade tradicional, principalmente nas regiões sul e sudeste do país e novas áreas vêm se destacando, como o estado de Goiás, oeste do estado de Minas Gerais e a região nordeste, devido à alta produtividade dos rebanhos e pela quantidade de indústrias instaladas para beneficiar este importante insumo pecuário (BUENO; MESQUITA; DIAS FILHO, 2006; SEBRAE, 2010).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2008, o Brasil apareceu em nível mundial como o sexto maior produtor de leite, com mais de 27 bilhões de litros por ano (IBGE, 2008). Entretanto, o Brasil poderia ocupar os primeiros desse *ranking*, se não fosse a presença de doenças que acometem o rebanho. Dentre estas se destaca a mastite, uma enfermidade que acarreta as maiores perdas econômicas e redução na produção de leite, além de comprometer a qualidade físico-química e microbiológica do leite e derivados ou até mesmo, a perda parcial ou total da capacidade secretora da glândula mamária (GUIMARÃES; LANGONI, 2009; MARTINS et al., 2010).

No Brasil, em razão da alta prevalência de mastite nos rebanhos, a perda de produção está entre 12 a 15%, o que significa um total de 2,8 bilhões de litros de leite/ano em relação à produção anual (FONSECA; SANTOS, 2000). Segundo Bardal (2011), as perdas associadas à mastite bovina são duas vezes mais elevadas àquelas relativas à infertilidade e às doenças reprodutivas.

1.1 MASTITE BOVINA

A mastite ou mamite bovina é uma doença de difícil controle e erradicação. É um problema sanitário que afeta o gado leiteiro em todas as áreas produtoras do mundo, a qual está associada às más condições de higiene do ordenhador, bem como dos tetos e úberes das vacas antes, durante e após a ordenha (FERREIRA et al., 2007; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2008).

De uma forma geral, é um processo inflamatório/infeccioso da glândula mamária, sendo as vacas leiteiras adultas as mais acometidas (FACHIN et al., 2012; PERES NETO; ZAPPA, 2011). A sua etiologia é complexa e multivariada, porém a de origem bacteriana é a mais frequente (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004; LAFFRANCHI et al., 2001; OLIVEIRA, 2006; OLIVEIRA et al., 2010), e a extensão da resposta inflamatória varia de acordo com a natureza do estímulo e a capacidade de reação do animal (PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002).

Baseado na origem do patógeno, esta doença pode ser classificada em contagiosa ou ambiental. A primeira é provocada por micro-organismos dos gêneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Mycoplasma* spp., os quais são adaptados à sobreviver no úbere do animal (OLIVEIRA, 2006). Estes podem ser transmitidos de uma glândula infectada para outra saudável, durante o ato da ordenha ou por meio das mãos dos ordenhadores, por panos utilizados na limpeza e secagem dos tetos e ainda, pelos equipamentos da ordenha mal higienizados (FREITAS et al., 2005; DANTAS et al., 2009). Já a segunda é provocada principalmente por bactérias coliformes, como a *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Actinomyces pyogenes*, *Pseudomonas* spp., fungos, algas, como *Prototheca zopfii* (alga aclorofilada) (BUENO; MESQUITA; DIAS FILHO, 2006; OLIVEIRA, 2006; MARTINS et al., 2010) e vírus (LANGONI et al., 1998). Estes micro-organismos são oportunistas, não adaptados à sobreviver no úbere e estão presentes no ambiente em que o animal habita (GUIMARÃES; LANGONI, 2009).

Além dos micro-organismos supracitados, de acordo com Radostits et al. (2002), os agentes etiológicos da mastite bovina podem ser classificados em patógenos secundários ou menores (*Staphylococcus* spp. coagulase negativo) e incomuns (*Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia* spp., *Pasteurella* spp., *Mycobacterium bovis*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* e algumas espécies de bactérias anaeróbias, fungos e leveduras).

Dentre os diversos tipos de micro-organismo patogênicos da mastite bovina destaca-se *Staphylococcus aureus*, principal patógeno causador dessa enfermidade no Brasil e em outros países (SÁ et al., 2004). De acordo com Hirsh e Zee (2003), *Staphylococcus aureus* concorre com *Streptococcus agalactiae* como causa principal dessa enfermidade. Mas, às vezes, mastites bovinas são causadas por *Staphylococcus* coagulase negativo, notadamente *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus sciuri*.

Em relação a sua manifestação, a mastite bovina pode ser classificada em clínica e subclínica. A clínica é marcada por respostas inflamatórias mais graves, ou seja, observa-se os sinais de inflamação nos tetos e úbere, como presença de edema, cor avermelhada, aumento de temperatura e dor ao toque, além de alterações macroscópicas no leite (MARTINS et al., 2010; PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002), o qual se apresenta menos ou mais viscoso que o normal, de cor amarelada, com flocos ou coágulos, o que permite que a doença seja confirmada por observação direta do mesmo (OLIVEIRA, 2006; DANTAS et al., 2009).

Segundo Costa (2006), a mastite clínica pode ser classificada em aguda e crônica. Na primeira há sintomas evidentes de processo inflamatório e alterações macroscópicas no leite. Já na segunda há fibrosamento do tecido mamário e alterações no leite.

Um teste de campo muito utilizado para detectar a mastite clínica é o teste de caneca de fundo negro ou telada, que consiste em um coletor de fundo escuro ou telado dos primeiros jatos de leite antes da ordenha. Esse teste permite visualizar as alterações macroscópicas do leite como a presença de grumos, filamentos, coágulos, pus e sangue (CARVALHO et al, 2002; RIBEIRO et al., 2003; SÁ et al., 2004; VOLTOLINI et al., 2001).

Portanto, a mastite clínica é a causa mais comum de morte entre as vacas leiteiras adultas, pois a falta de um diagnóstico e tratamento correto pode levar o animal ao quadro de septicemia e possível óbito (MARTINS et al., 2010; PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002).

Já na mastite subclínica, as reações inflamatórias são mais brandas e os animais não apresentam alterações visíveis na glândula mamária e tampouco no leite, porém ocorre redução na produção e mudanças na composição do mesmo (BARDAL, 2011; GUIMARÃES; LANGONI, 2009). Neste caso, a doença pode disseminar silenciosamente pelo rebanho (BARBALHO; MOTA, 2001; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2008), resultando em infecções persistentes tanto no período de lactação quanto no período seco (animais sem produção de leite), sendo necessários exames complementares para sua detecção (GUIMARÃES; LANGONI, 2009; SILVA; NOGUEIRA, 2010).

O *California Mastitis Test* (CMT) é um dos testes de campo mais utilizados para o diagnóstico da mastite subclínica, sendo um indicador indireto da contagem de células somáticas (CCS) no leite (BARBALHO; MOTA, 2001; VIANA et al., 2010), as

quais são constituídas por células de defesa e epiteliais, sendo desta forma um parâmetro para monitorar a saúde da glândula mamária e a qualidade do leite quando da ocorrência de mastites (VIANA et al., 2010). O CMT consiste na reação do leite com um detergente aniônico que promove a liberação do ácido desoxirribonucleico (ADN) das células somáticas, levando à formação de um composto gelificado (ANDRADE et al., 1998). De acordo com a intensidade da reação, a mastite subclínica pode ser classificada em: Grau I: quando a reação é leve; Grau II: reação moderada e Grau III: reação intensa (RIBEIRO et al., 2003; VOLTOLINI et al., 2001).

Portanto, os testes de campo, caneca de fundo negro ou telada e o CMT são simples, baratos e realizados frequentemente no momento da ordenha. Isso permite a identificação da doença nos estágios iniciais, o que proporciona um controle mais efetivo e reduz o impacto econômico devido às perdas por descarte do leite contaminado ou com a utilização de medicamentos (OLIVEIRA et al., 2011; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2008).

Para o controle da mastite bovina, também é importante que se faça exame microbiológico e teste de antibiograma. A cultura microbiana, a qual possibilita o isolamento e a identificação dos agentes etiológicos envolvidos na mastite, é um teste complementar, decisivo e indispensável em um programa de controle da doença, porém caro e demorado, sendo pouco aplicável em rebanhos com grande número de animais (CARVALHO, 2002; MARTINS et al., 2010; RIBEIRO et al., 2003). Já o antibiograma, oferece como resultado padrões de resistência ou susceptibilidade de uma bactéria específica aos antibióticos ou quimioterápicos (DANTAS et al., 2009).

Apesar do isolamento bacteriano ser pouco aplicável, em algumas situações se faz necessário, para que se possa realizar o teste de antibiograma, principalmente nos casos de mastite recidivante, o qual irá direcionar o veterinário na escolha do antibiótico mais adequado ao tratamento (TEIXEIRA; RIBEIRO; SIMÕES, 2008).

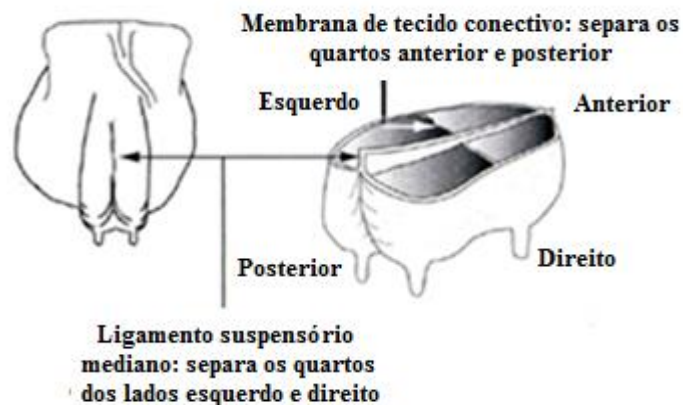
1.2 ENTRAVES NO CONTROLE DA MASTITE BOVINA

O método mais utilizado no tratamento da mastite é a antibioticoterapia. Atualmente, os principais antibióticos disponíveis no mercado e efetivos para o tratamento de mastite são: cloxacilina, ampicilina, penetamato de penicilina, combinações entre penicilina e estreptomicina, gentamicina, nafcilina, cefazolina, cefoperazona e a cefquinoma (TEIXEIRA; RIBEIRO; SIMÕES, 2008).

Uma das dificuldades enfrentadas pelos técnicos e produtores na tentativa de controlar a mastite em um rebanho está no descarte de leite de vacas em lactação que recebem tratamento com antibiótico, o que aumenta significativamente a perda econômica do produtor (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2008; TEIXEIRA; RIBEIRO; SIMÕES, 2008).

O úbere da vaca compreende quatro quartos, sendo cada um deles uma glândula individual, drenada por um teto (Figura 1). As quatro glândulas secretoras são estruturalmente separadas e funcionam independentemente, sem fluxo de leite entre elas (BRITO; SALES, 2007). Porém, quando a vaca é tratada com antibiótico em um quarto, por via intramamária, deve-se descartar todo o leite produzido, pois o antibiótico é absorvido, ocorrendo a passagem para o sangue e daí para o leite dos outros quartos. Logo, o aparecimento de resíduos em quartos não tratados deve-se a essa passagem via corrente sanguínea, e não à passagem direta de um quarto para outro (BRITO; BRITO; MENDONÇA, 2012).

Figura 1- Divisão interna dos quartos mamários do úbere de vacas.



Fonte: Brito; Sales (2007), com adaptação.

Sendo assim, o tratamento da mastite no período de lactação é encarado com restrições, não somente porque sua efetividade é inferior quando comparada com a terapia no período seco, mas principalmente em função da sua associação com perdas econômicas decorrentes do leite descartado durante o tratamento e no período de eliminação do antibiótico (período de carência), o qual é de pelo menos uma semana, antes do leite ser novamente comercializado (GUIMARÃES; LANGONI, 2009; LARANJA; MACHADO, 1994; TEIXEIRA; RIBEIRO; SIMÕES, 2008).

Para se ter uma noção das perdas inerentes a esse fato, se considerarmos uma vaca que produza 30 litros de leite/dia, ao ser submetida ao tratamento de mastite, todo o leite deve ser descartado. Se o tratamento durar três dias, o que não é adequado, mas é o que está sendo feito na maioria dos casos, são necessários mais sete dias de carência para que o leite possa ser novamente comercializado, ou seja, serão descartados 300 litros de leite. Se considerarmos o preço de R\$ 1,30 pago pelo laticínio aos produtores, em 10 dias o produtor deixa de ganhar R\$ 390,00 desse animal, fora os custos com o tratamento (medicamentos e honorários veterinários) (relatos em campo).

Devido a esses fatores, frequentemente, o produtor não cumpre o tratamento pelo período suficiente, ou ainda, muitas das vezes, não administra as doses recomendadas para atingir uma concentração mínima efetiva (TEIXEIRA; RIBEIRO; SIMÕES, 2008). Assim, o uso de antibióticos de forma inadequada resulta nas falhas terapêuticas, infecções recorrentes/crônicas e problemas de resistência aos antimicrobianos (ARAÚJO, 1998; NADER FILHO et al., 2007; TEIXEIRA; RIBEIRO; SIMÕES, 2008). A resistência ao tratamento está relacionada com a produção de enzimas que inativam as drogas, alteração do sítio-alvo e alteração da absorção ou do efluxo do medicamento (CLSI, 2003).

Fator agravante do tratamento da mastite é a presença de resíduos de antibióticos no leite de consumo, o que representa riscos à saúde pública (MEDEIROS, et al., 2009; ZAFALON et al., 2008), pois podem causar reações de hipersensibilidade e possível choque anafilático em indivíduos alérgicos (BRITO; LANGE, 2005), alteração no equilíbrio da microbiota intestinal e seleção de bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores (FREITAS et al., 2005). Segundo White e Mcdermott (2001), o aumento da resistência bacteriana em humanos com processos infecciosos não é somente decorrente do intenso e inadequado uso de antibióticos, mas também da ingestão de antibióticos via alimentos de origem animal.

Além disso, a presença de resíduos de antibióticos no leite também acarreta problema tecnológico às indústrias de laticínios, uma vez que os resíduos são resistentes à pasteurização e tem um efeito inibidor no desenvolvimento de fermentos lácteos, os quais trazem transtornos especialmente no processamento de iogurte, queijos e manteiga (ALMEIDA et al., 1999; BRANCHER; FAGUNDES, 1998).

Além de afetar a saúde do animal, esta enfermidade causa prejuízos diretos aos produtores, aos laticínios e até mesmo ao consumidor final, ou seja, afeta toda a

cadeia produtiva, sendo que, os maiores reflexos são sobre os médios e pequenos produtores, pois o leite fornecido por estes é fonte de subsistência e renda (BARDAL, 2011).

Segundo Costa (2006), o tratamento medicamentoso ideal da mastite seria aquele que pudesse controlar todos os processos infecciosos do úbere e não deixasse resíduos no leite. Logo, o produtor fica sem alternativa de tratamento pois, não há no mercado um medicamento intramamário tópico que não atinja a corrente sanguínea, que não deixe resíduo no leite, e que não acarrete danos ao animal, à população, à indústria e também ao meio ambiente, pois na maioria das vezes o leite mastítico de vacas em tratamento é descartado no solo ou em leito dos rios.

1.3 TRATAMENTO ALTERNATIVO

Com a crescente conscientização da população sobre os perigos da produção, sem considerar de imediato os efeitos sobre o meio ambiente, aos animais e as pessoas, abre-se espaço para o desenvolvimento de medicamentos de origem não sintéticos no tratamento de doenças que acometem o ser humano e os animais (FIGUEIREDO, 2002). Por exemplo, a Comunidade Europeia tem restringindo o uso de aditivos antibióticos químicos-sintéticos na alimentação animal, criando diversas barreiras ao comércio internacional, na busca de um alimento de menor risco à saúde da população (REGULAMENTO EUROPEU, 2003).

Diante do exposto, atualmente o produtor necessita de alternativas para o tratamento da mastite que não seja o antibiótico de origem sintética. Entretanto, há carência de estudos na área homeopática/fitoterápica veterinária em decorrência da falta de parcerias entre os profissionais e pesquisadores da área de medicina veterinária e farmacêutica para a avaliação científica de plantas medicinais de uso popular, bem como, o desenvolvimento de medicamentos alternativos para o uso em animais. Em se tratando de mastite bovina, os produtores necessitam de um medicamento fitoterápico que tenha efeito terapêutico satisfatório, sem causar danos à população, à indústria e ao meio ambiente.

Outro fato que vem estimulando o desenvolvimento de medicamentos derivados de produtos naturais é o aparecimento cada vez mais frequente de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado. Na tentativa de mudar esse contexto, diversos trabalhos científicos buscam validar saberes

tradicionais, utilizando-se extratos de plantas medicinais com a finalidade de reduzir o uso dos antibióticos e outros compostos químicos convencionais (BARDAL, 2011; FACHIN et al., 2012; OYARZABAL, 2011; SCHUCH, 2007).

Dessa forma, as plantas medicinais com potencial antimicrobiano vêm ganhando espaço na medicina veterinária com o objetivo de reduzir o impacto e o uso de medicamentos de forma indiscriminada, manter a integridade do animal e de controlar a disseminação das linhagens bacterianas resistentes (BRAGA; SILVA, 2007; VIEIRA et al., 2010).

1.4 OLEORRESINA DE COPAÍBA

Diversas plantas medicinais e derivados vegetais são utilizados pela população brasileira por possuírem propriedades antimicrobianas cientificamente comprovadas, como é o caso das copaibeiras, árvores nativas da região tropical da América Latina e da África Ocidental. Na América Latina, as espécies de copaibeiras se estendem do México à Argentina (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

No Brasil, as copaibeiras, além de serem encontradas na região centro-oeste, também estão difundidas nas regiões sudeste e amazônica, principalmente nos estados do Pará e Amazonas (BIAVATTI et al., 2006; PAIVA et al., 1998; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Na mata são facilmente encontradas devido ao aroma que se desprende das cascas do tronco. De crescimento lento, podem alcançar de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos (ALENCAR, 1982)

As copaibeiras pertencem ao gênero *Copaifera*, família Leguminosae, subfamília *Caesalpinoideae* que possui 72 espécies, das quais 28 são catalogadas e 16 são endêmicas do Brasil (RIGAMONTE-AZEVEDO; WADT; WADT, 2004). A *Copaifera langsdorfii* Desf. é a mais encontrada no território brasileiro, sendo observada da Amazônia à Santa Catarina, no Nordeste e Centro-oeste (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

As árvores das diversas espécies de *Copaifera* são conhecidas pela população brasileira por bálsamo, caobi, capaíba, capaúba (MS); copai (SP); copaíba-preta, copaíba-da-várzea, copaíba-vermelha (BA, MG); copaibeira, copaibeira-de-minas, copaúba (SP); copaúva, cupiúva, oleiro, óleo (MG, PR); óleo-amarelo, óleo-capaíba (BA, MG); óleo-copaíba (BA, MG, PR); óleo-pardo, óleo-vermelho (BA, RJ, SP); óleo-de-copaíba (ES, RJ, SP, GO); pau-óleo (PR); pau-de-óleo (CE, DF, GO, MG, MS, MT,

PE, PI, PR, SP); pau-óleo de copaíba e pau-óleo do sertão (BA), sendo que, a etiologia do termo copaíba veio do tupi “cupa- yba”, que significa árvore de depósito de seiva ou que tem jazida (reserva de óleo no seu interior) (BARBOSA; SCUDELLER, 2009; BIAVATTI et al., 2006).

De elevado valor ecológico e econômico, não somente na Amazônia, mas em todo o continente Sul-Americano, as espécies do gênero *Copaifera* são as mais estudadas no mundo (BARBOSA; SCUDELLER, 2009). Em 1677 e 1820, respectivamente, já faziam parte da Farmacopéia Britânica e Americana e, em 1926, foi incluída na primeira edição da Farmacopéia Brasileira (HECK; VIANA; VICENTINI, 2012). Com potencial de avançar nas diversas fases das pesquisas e gerar produtos de interesse a saúde, a *Copaifera* spp. faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (RENISUS) (BRASIL, 2009), bem como, do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2011).

1.4.1 Extração da oleorresina

Dos troncos das copaibeiras é extraída a oleorresina de copaíba (Figura 2A-E), líquido transparente, de viscosidade variável, cuja coloração também pode variar do amarelo ao marrom (Figura 3A-B) (BIAVATTI et al., 2006). Segundo Alencar (1982), a oleorresina é um produto de excreção da planta, que funciona como defesa contra animais, fungos e bactérias, atraindo insetos polinizadores, além de regular o metabolismo do vegetal.

Figura 2- Extração da oleorresina de copaíba: (A) Perfuração do fuste com trado; (B) escoamento da oleorresina; (C) Coleta da oleorresina; (D) Cessamento do escoamento da oleorresina; (E) Fechamento do orifício.



Fonte: Medeiros (2006).

Figura 3- Diversidade de coloração da oleorresina de copaíba: **(A)**: Vista superior de frascos contendo oleorresinas de copaíba extraídas em Santarém (PA); **(B)**: Oleorresinas de copaíba comercializada no Mercado Municipal de Santarém (PA).



Fonte: Próprio autor.

Uma preocupação das indústrias farmacêuticas com relação à obtenção dessa matéria-prima vegetal é a possibilidade de adulteração na própria origem, pela mistura com outros óleos de diferentes gêneros ou famílias botânicas, que apresentam densidade ou aroma semelhantes, ou ainda pela adição de produtos de menor valor agregado, como álcool, óleos vegetais comestíveis (de soja e de milho), óleos minerais (parafina), petrolados (diesel), banha animal e entre outros, com o objetivo de diluir a mesma, provocando variações na composição química e consequentemente alterações da atividade farmacológica (TAPPIN et al., 2004; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

1.4.2 Composição química

Por ser um exsudato constituído de diterpênicos e sesquiterpênicos, a designação correta para o óleo de copaíba é oleorresina, porém o comércio emprega há anos erroneamente o nome de bálsamo de copaíba. Entretanto, a oleorresina de copaíba não é um bálsamo verdadeiro, pois não contém derivados do ácido benzóico ou cinâmico (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Os ácidos diterpênicos ou resinosos compõem a parte resinosa, sólida, não volátil, insolúvel em água, a qual está diluída em compostos voláteis (sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos), que são extraídos por hidrodestilação e possuem aromas marcantes, sendo utilizados principalmente pelas indústrias de perfumes

(CASCON; GILBERT, 2000; PIERI, MUSSI; MOREIRA, 2009; RIGAMONTE-AZEVEDO, WADT, WADT, 2004).

Os sesquiterpenos encontrados com maior frequência na oleorresina de copaíba são: β -cariofileno; α -copaeno; α -cubebeno; α -humuleno; β -bisaboleno; α e β selineno; α -bisabolol; β -elemeno; δ -cadineno, σ -cadineno, cadinol, entre outros compostos não identificados, que gira em torno de 13,5% (CASCON, GILBERT, 2000; MENDONÇA; ONOFRE, 2009; RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2004). No estudo realizado por Rigamonte-Azevedo et al. (2004), o β -cariofileno foi o composto majoritário e encontrado em todas as oleorresinas analisadas.

Já os principais diterpenos são o ácido copálico, ácido hardwíckiico, ácido caurenóico, ácido copaífero e ácido colavênico, sendo o ácido copálico o componente químico encontrado em todas as oleorresinas de copaíba até hoje estudadas, razão pela qual sugere-se que seja utilizado como marcador químico dessa matéria-prima vegetal (CASCON; GILBERT, 2000; PIERI, MUSSI; MOREIRA, 2009; RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2004; VEIGA JR; PATITUCCI; PINTO, 1997; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Entretanto, Cascon e Gilbert (2000) afirmam que o ácido copálico não pode ser considerado como marcador confiável, pois em seu estudo algumas espécies analisadas apresentaram apenas traços deste componente.

Segundo Veiga Junior, Pinto e Maciel (2005), apesar de apresentarem alterações nas quantidades e tipos de sesquiterpenos e diterpenos, apenas essas classes de substâncias estão presentes na composição da oleorresina pura, as quais são responsáveis por suas propriedades farmacológicas e biológicas.

1.4.3 Atividade farmacológica

O uso medicinal da oleorresina de copaíba já ocorria entre os nativos antes da chegada dos portugueses ao Brasil. Atualmente é um dos mais importantes produtos naturais amazônicos comercializados em feiras livres, mercados populares, ervanários e farmácias de produtos naturais de todo o Brasil e no exterior (Estados Unidos, França, Alemanha e Inglaterra), podendo ser encontrada na forma farmacêutica de pomadas, *in natura*, cápsulas, emulsões, entre outras. Todavia, o grande interesse pela oleorresina de copaíba é pela indústria de cosméticos, com a fabricação de xampus, loções capilares, sabonetes, cremes condicionadores, loções

hidratantes e pós-barba, fixador para perfumes e espumas de banhos (MACIEL et al., 2002; TAPPIN et al., 2004; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Testes *in vitro* e *in vivo* demonstraram que várias espécies do gênero *Copaifera* possuem atividade anti-inflamatória (PAIVA et al., 2002a; VEIGA JÚNIOR et al., 2007), antitumoral (OHSAKI et al., 1994), efeito gastroprotetor (PAIVA et al., 1998), cicatrizantes de úlceras e feridas em geral (PAIVA et al., 2002b; MARTINS, SILVA, 2010), antioxidante e inibição da peroxidação lipídica, atuando como protetor de células danificadas do tecido intestinal (PAIVA et al., 2004), atividade repelente ao mosquito *Aedes aegypti* (OLIVEIRA, 2008), atividade antiparasitária frente à *Leishmania amazonenses* (SANTOS et al., 2008a; SANTOS et al., 2013), atividades antifúngica e antibacteriana (ALVES et al., 2000; BRAGA, SILVA, 2007; FENNER et al., 2006; GONÇALVES, ALVES FILHO, MENEZES, 2005).

Com relação ao efeito antimicrobiano da oleorresina de copaíba, estudos tem demonstrado sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (MENDONÇA; ONOFRE, 2009), bem como, bactérias do gênero *Streptococcus* (VASCONCELOS et al., 2008).

Trabalho desenvolvido por Pieri et al. (2012) com oleorresinas de duas espécies diferentes de *Copaifera* (*Copaifera langsdorffii* Desf. e *Copaifera officinalis* L.), também mostrou a inibição de três bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *Shigella flexneri*) e Gram-positivas (*S. aureus*). De acordo com Santos et al. (2008b), em bactérias Gram-positivas a oleorresina de copaíba atua na parede celular, causando rupturas e danos com liberação de compostos citoplasmáticos e até mesmo perda da parede celular, alteração da morfologia e diminuição do volume da célula.

O estudo realizado por Deus, Alves e Arruda (2011) demonstrou que o óleo essencial da espécie *Copaifera multijuga* Hayne apresentou melhor efeito antifúngico frente às espécies *Aspergillus flavus* e *Candida parapsilosis* do que a oleorresina. Os mesmos sugerem que o β -cariofileno, α -copaeno, trans- α -bergamoteno, α -humuleno, γ -muuroleno e β - bisaboleno sejam os responsáveis por essa atividade.

O exposto mostra as potencialidades da oleorresina de copaíba extraída das copaibeiras e a possibilidade do desenvolvimento de produtos com valor agregado e que valorize toda a cadeia produtiva.

Por fim, a bovinocultura leiteira precisa de alternativas que possam controlar um dos maiores entraves na produção, que é a mastite, pois os elevados custos dos tratamentos, baixa efetividade da terapia convencional, resistência bacteriana aos antibióticos, além dos prejuízos inerentes ao descarte do leite ou à presença de resíduos de medicamentos no mesmo, impedem que o Brasil dê um salto na produção agroindustrial leiteira. Diante disso, a utilização de derivados vegetais pode ser uma opção para esta problemática, e a oleorresina de copaíba, devido às suas propriedades farmacológicas (anti-inflamatória e antimicrobiana), é uma matéria-prima que deve ser avaliada visando o desenvolvimento de fitoterápico para uso animal.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a oleorresina de *Copaifera* spp., verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* da oleorresina (OR) e do óleo essencial (OE) de *Copaifera* spp. frente as bactérias aeróbias e facultativas isoladas de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica grau III e avaliar preliminarmente, *in vivo*, formulação fitoterápica contendo *Copaifera* spp.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver e validar método analítico para identificar e quantificar o marcador β -cariofileno na OR de *Copaifera* spp. e co-validar método analítico para identificar e quantificar o β -cariofileno no OE de *Copaifera* spp. por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- ✓ Identificar os sesquiterpenos, na fração volátil de *Copaifera* spp., por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) e os diterpenos, na OR de *Copaifera* spp., por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* de ressonância ciclôtrônica de íons por transformada de Fourie (ESI FT-ICR EM);
- ✓ Isolar e identificar micro-organismos aeróbios e facultativos a partir de amostras de leite de vacas diagnosticadas pelo teste de CMT com mastite subclínica grau III;
- ✓ Verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* de três formulações fitoterápicas à base de *Copaifera* spp. e da gentamicina, frente às bactérias previamente isoladas;
- ✓ Co-validar método analítico por CLAE para quantificar o marcador β -cariofileno na formulação fitoterápica à base de *Copaifera* spp. proposta para aplicação *in vivo*;
- ✓ Tratar os animais diagnosticados com mastite subclínica grau III com a formulação fitoterápica contendo *Copaifera* spp. e em seguida, avaliar clinicamente os mesmos.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material vegetal

A OR de copaíba (*Copaifera* spp.) foi adquirida da empresa Nutragyn Indústria de Alimentos LDTA localizada na cidade de Goiânia (GO), em junho de 2012 (Anexo A). Foi acondicionada em recipientes de vidro âmbar e mantida à temperatura ambiente.

3.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau P.A. e HPLC. O padrão de β -cariofileno (Lote: 1321406V) foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich, USA), apresentando 99% de pureza.

Todos os meios de cultura utilizados foram da empresa ISOFAR Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA OLEORRESINA (OR) DE *Copaifera* spp.

As análises de caracterização e desenvolvimento do método analítico de quantificação do marcador β -cariofileno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) e no Laboratório de PD&I de Bioprodutos da Farmácia de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (FF/UFG).

A análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) e o processamento dos dados da análise por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* de ressonância ciclôtrônica de íons por transformada de Fourie (ESI FT-ICR MS) foram realizadas no Instituto de Química da UFG.

3.2.1 Caracterização organoléptica

Para a caracterização organoléptica, uma alíquota de OR de *Copaifera* spp. foi transferida para um béquer e em seguida foram analisados: aspecto, cor, odor e sabor segundo Brasil (1926).

3.2.2 Análises para verificar adulterações na oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.

De acordo com Brasil (1926), foram realizados quatro ensaios para verificar possíveis adulterações da OR de *Copaifera* spp. com parafina (óleo mineral), óleo fixo, terebintina e bálsamo de gurjum. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.2.1 Adulteração por parafina

Em um béquer dissolveu-se 5mL de OR de *Copaifera* spp. em 15mL de álcool absoluto e em seguida, a solução foi aquecida até ebulição, por 1 minuto.

A ausência de parafina é indicada pela ausência de pequenas gotas oleosas dispersas no líquido, mesmo após 1 hora de resfriamento.

3.2.2.2 Adulteração por óleo fixo

Em um béquer, ferveu-se durante 2 minutos (min) 20 gotas de OR de *Copaifera* spp. com 1mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio (1:10). Após o resfriamento, acrescentou-se 2mL de éter etílico.

A ausência de gelatinização descarta a presença de óleo fixo.

3.2.2.3 Adulteração por terebintina

Num béquer, aqueceu-se em banho-maria (aproximadamente 100°C), 10g de OR de *Copaifera* spp. durante 4 horas. Um teste controle com essência de terebintina foi utilizado.

A ausência de odor de terebintina e de cristais dessa substância no resíduo indicam que a OR de *Copaifera* spp. não apresenta este contaminante.

3.2.2.4 Adulteração por bálsamo de gurjum

Num tubo de ensaio, misturou-se 1 gota de ácido nítrico com 3mL de ácido acético glacial e adicionou-se cuidadosamente 4 gotas de OR de *Copaifera* spp. sobre a solução.

A ausência de bálsamo de gurjum é indicada pela não formação de zona avermelhada na superfície de separação dos líquidos. A cor vermelha ou púrpura também não deve ser formada quando os líquidos forem misturados por agitação.

3.2.3 Análise de solubilidade

Os experimentos foram realizados de acordo com Brasil (1926) e, em triplicatas para cada solvente.

Colocou-se 1mL de OR de *Copaifera* spp. em 7 tubos de ensaio. Adicionou-se no 1º tubo, 1mL de clorofórmio; no 2º tubo, 1mL de éter de petróleo; no 3º tubo, 1mL de álcool etílico absoluto; no 4º tubo, 1mL de álcool amílico; no 5º tubo, 1mL de éter etílico; no 6º tubo, 1mL de sulfureto de carbono e, no 7º tubo, 1mL de água. Em seguida, todos os tubos foram levados a um vortex por 10 segundos (s) e, após deixados em repouso por 3 min foi realizada a leitura dos resultados.

Em outro tubo de ensaio, sem agitação, dissolveu-se 1mL de OR de *Copaifera* spp. em 8mL de éter de petróleo.

3.2.4 Determinação da densidade relativa e de massa

O teste de densidade relativa foi realizado em triplicata de acordo com Brasil (1926). Utilizou-se um picnômetro limpo e seco de 10mL, calibrado por meio da determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água recém-destilada, a 25°C. Em seguida, a OR de *Copaifera* spp. foi transferida para o picnômetro à temperatura de 25°C, e o picnômetro foi pesado. Obteve-se o peso da amostra por meio da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa foi determinada pela razão entre a massa da OR de *Copaifera* spp. e a massa de água, ambas a 25°C

Posteriormente, calculou-se a densidade de massa da OR de *Copaifera* spp. a 25°C, segundo Brasil (2010).

3.2.5 Determinação da viscosidade

O experimento foi realizado em triplicata, de acordo com Brasil (2010). As medidas de viscosidade foram realizadas em um viscosímetro Brookfield-DV-III, com um conjunto de spindles tipo LV, nas configurações de 60 rotações por minuto (rpm), torque 23,6% e temperatura 25°C.

3.2.6 Índice de Acidez (IA)

O teste foi realizado em triplicata, segundo metodologia de Vasconcelos e Godinho (2002) e, a padronização da solução 0,1N de hidróxido de sódio (NaOH) com biftalato de potássio foi realizada de acordo com Brasil (2010).

Pesou-se cerca de 2g de OR de *Copaifera* spp. em um erlenmeyer de 125mL e em seguida, adicionou-se 25mL da mistura éter etílico: álcool etílico (2:1) e agitou-se. Posteriormente, adicionou-se 2 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 1% e titulou-se com solução 0,1N de NaOH até a mudança da coloração incolor para rósea. Também foi realizada a titulação em branco, a qual utilizou-se todos os reagentes, exceto a OR de *Copaifera* spp.

O IA foi calculado pela Equação 1:

$$IA = V.N.56,1/m \quad (1)$$

Em que: *V*= volume de solução de NaOH gasto na titulação em mL.

N= normalidade da solução de NaOH.

m= massa da amostra em gramas (g).

3.2.7 Obtenção do óleo essencial (OE) de *Copaifera* spp.

Mediu-se em uma proveta 10mL de OR de *Copaifera* spp., a qual foi transferida para um balão de fundo redondo de 1000mL. Em seguida, foram adicionados 600mL de água destilada e hidrodestilou-se por 4 horas com o aquecimento aproximado de 100°C. A hidrodestilação foi realizada em aparato do tipo Clevenger, acoplado a um sistema de refrigeração com a manutenção da água de condensação entre 19-20°C.

Após a extração, o OE de *Copaifera* spp. foi medido no tubo graduado do próprio aparato e acondicionado em frasco âmbar, mantido sob refrigeração (freezer-20°C) e ao abrigo de luz, para as análises posteriores.

A avaliação do rendimento em porcentagem (v/v) foi calculado em relação ao volume inicial (mL) da OR de *Copaifera* spp. submetida à extração, de acordo com Brasil (1926).

A extração do OE de *Copaifera* spp. foi realizada em triplicata.

3.2.8 Análise química da fração volátil da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.

A fração volátil da OR de *Copaifera* spp. foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) em um equipamento Shimadzu QP 5050A, utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida CBP-5 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m). A vazão foi de 1,0mL/min para o Hélio como gás de arraste sob fluxo constante, com temperatura inicial de 60°C, mantida por 2 min e seguida de aquecimento, primeiramente a taxa de 3°C/min até 240°C, depois de 10°C/min até 280°C e constante de 280°C por 10min, sendo a energia de ionização de 70eV.

O volume de injeção foi de 1 μ L da amostra diluída em diclorometano (CH₂CL₂) na proporção de 1:5. Os componentes individuais do OE de *Copaifera* spp. foram caracterizados por comparação dos espectros de massa e os índices de retenção que foram calculados com referência a uma sequência linear de n-alcanos C8-C36 (ADAMS, 2007).

3.2.9 Identificação dos diterpenos presentes na oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* de ressonância ciclôtrônica de íons por transformada de Fourier (ESI FT-ICR MS)

A amostra de OR de *Copaifera* spp. foi diluída para 0,25mg/mL com água:metanol (1:1), que continha 0,1% v/v de hidróxido de amônio (NH₄OH) para análise no modo negativo. Em seguida, a solução resultante foi diretamente injetada a uma taxa de fluxo de 5 μ L/min na fonte de *electrospray* (ESI).

O espectrômetro de massa (modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) foi configurado para operar em uma faixa de massa de *m/z* 150-500. As condições da fonte do ESI foram: pressão do gás nebulizador de 3bar, uma voltagem capilar de 3,5 kV e uma *transfer capillary temperature* de 250°C.

Os íons foram acumulados na cela de colisão hexapolo com o tempo de 5×10^{-3} segundos, em seguida transferidos para a cela de ressonância ciclotrônica de íons (ICR), por meio do sistema de guia de íons multipolar (hexapolo). O tempo de permanência no hexapolo foi de 0,7 milissegundos.

O espectro foi adquirido pelo acúmulo de 32 *scans* em domínio de tempo com 8 mega-ponto do domínio de tempo dos conjuntos de dados. O espectro de massa foi calibrado externamente usando NaTFA.

O poder de resolução ($m/\Delta m_{50\%}$ aproximadamente 500 000), em que $\Delta m_{50\%}$ é a largura do pico completo em metade da altura, m/z aproximadamente 400 e precisão de massa <1 ppm promoveram uma atribuição inequívoca das fórmulas moleculares.

O espectro de massa foi adquirido e processado usando o software Data Analysis (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Os dados do espectro de massa foram processados, e as composições elementares dos compostos foram determinadas medindo os valores de m/z . As estruturas propostas para cada fórmula foram atribuídas utilizando a base de dados ChemSpider (www.chemspider.com) e também de acordo com o estudo de Veiga Júnior e Pinto (2002). Para a elaboração das estruturas químicas propostas foi empregado o software ChemWin.

3.2.10 Desenvolvimento e validação do método de quantificação do marcador β -cariofileno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters® (Massachusetts, USA), equipado com bomba quaternária, injetor automático, módulo de separação e2695, com detector de arrosos de diodos (PDA 2998), e sistema de processamento de dados, o *software* Empower 2.0.

3.2.10.1 Determinação das condições cromatográficas

O desenvolvimento do método analítico de quantificação do marcador β -cariofileno foi realizado segundo Oliveira et al. (2013), com adaptações. A fase estacionária utilizada foi uma coluna C18 da ZORBAX Eclipse® (250 x 4,6mm, 5 μ m), a qual foi mantida a 30°C. A fase móvel utilizada foi acetonitrila (ACN) grau HPLC acidificada com ácido fosfórico à 0,2% (solvente A) e água ultrapura (H₂O Milli-Q®) acidificada com ácido fosfórico à 0,05% (solvente B), mantidas a uma vazão de

1,0mL/min sob condição gradiente (Tabela 1). O comprimento de onda de leitura foi de 210nm, o volume de injeção em todas as análises foi de 10 μ L e o tempo de análise, 40 min.

Tabela 1- Sistema cromatográfico sob condição gradiente utilizado no desenvolvimento e validação do método para quantificação do marcador β -cariofileno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	70	30
8	70	30
12	90	10
32	90	10
36	70	30
40	70	30

Legenda: **Solvente A-** acetonitrila acidificada com ácido fosfórico à 0,2%; **Solvente B-** água ultrapura acidificada com ácido fosfórico à 0,05%.

Todas as soluções, amostras e padrão, foram preparadas em ACN (75% v/v) grau HPLC, as quais foram filtradas em membrana de 0,45 μ m (Millex®- Millipore) antes de serem injetadas. A fase móvel também foi filtrada em membrana fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45 μ m (Millipore).

Os picos cromatográficos correspondentes ao β -cariofileno nas amostras foram identificados pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros de UV dos mesmos com o padrão de referência, e a quantificação ocorreu pela integração das áreas dos picos.

3.2.10.2 Adequabilidade do sistema (*system suitability*)

Os testes de adequabilidade do sistema *system suitability* são parte integrante dos métodos de cromatografia líquida. São aplicados com a finalidade de verificar se a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico estão adequadas para as análises a serem realizadas (BRASIL, 2010).

Os parâmetros de *system suitability* resolução (R_s), fator de cauda (FT) e número de pratos teóricos da coluna (N) foram avaliados conforme as especificações

do guia de validação de métodos cromatográficos da *Food and Drug Administration-FDA* (Tabela 2) (CDER, 1994; RIBANI et al., 2004).

Tabela 2- Parâmetros e especificações do *system suitability* utilizados para verificar a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico.

Parâmetros	Especificações
Resolução (Rs)	Rs > 2 entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo (impureza, produto de degradação ou outras substâncias).
Fator de calda (TF)	TF ≤ 2
Número de pratos teóricos da coluna (N)	Em geral deve ser > 2000 para CLAE

Fonte: CDER (1994); Ribani et al. (2004).

3.2.10.3 Validação da metodologia analítica

A validação da metodologia analítica foi realizada conforme a Resolução 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003) para Categoria I, referente aos testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.

Os seguintes parâmetros foram avaliados: especificidade, linearidade, limite de quantificação e detecção, precisão, exatidão e robustez.

A especificidade do método foi avaliada pela comparação entre os cromatogramas do padrão β -cariofileno, da amostra (OR de *Copaifera* spp.) e do diluente (ACN 75% v/v grau HPLC) a 210nm, e também pelos espectros UV do pico do marcador β -cariofileno, no padrão e na amostra, para verificar se houve co-eluição.

A linearidade do método, para o padrão β -cariofileno e para a amostra de OR de *Copaifera* spp., foi verificada pela obtenção de uma curva padrão média, pelo método dos mínimos quadrados, feita a partir de três curvas padrão com cinco pontos de diferentes concentrações usando-se o software *Excel 2013* (Microsoft Office, USA).

Para o padrão β -cariofileno a concentração dos pontos foram de 0,160; 0,250; 0,330, 0,400 a 0,500mg/mL e para a amostra de OR de *Copaifera* spp. foram de 1,23; 1,44; 1,64; 1,85 a 2,05mg/mL. O valor do coeficiente de correlação (r) da curva padrão foi usado como parâmetro de aceitação da linearidade do método. A curva padrão

média encontrada do padrão β -cariofileno foi utilizada para a quantificação do β -cariofileno na OR de *Copaifera* spp.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados relacionando-se três curvas padrão e a curva média da OR de *Copaifera* spp., por meio das Equações 2 e 3, respectivamente.

Equação 2:

$$LD = DP_{a.3}/IC \quad (2)$$

Em que: *LD*= limite de detecção.

DP_a= desvio padrão do intercepto com o eixo do y de 3 curvas de calibração construídas.

IC= inclinação da curva de calibração.

Equação 3:

$$LQ = DP_{a.10}/IC \quad (3)$$

Em que: *LQ*= limite de quantificação.

DP_a= desvio padrão do intercepto com o eixo do y de 3 curvas de calibração construídas.

IC = inclinação da curva de calibração.

A precisão nível repetibilidade foi verificada por meio de seis determinações na concentração de 1,64mg/mL da amostra de OR de *Copaifera* spp., sendo calculada por meio do coeficiente de variação- CV% (Equação 4). Esta análise foi realizada em um mesmo dia e por um único analista. Já a precisão intermediária foi conduzida em dois dias diferentes, por dois analistas distintos, observando-se a concordância entre os resultados, a qual foi expressa por meio do coeficiente de variação entre os doze resultados obtidos.

Equação 4:

$$CV(\%) = DP/CMD * 100 \quad (4)$$

Em que: *CV(%)*= Coeficiente de Variação

DP= Desvio Padrão

CMD= Concentração Média Determinada

A exatidão do método foi avaliada a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento em três concentrações diferentes,

baixa-80%, média-100% e alta-120%, com três réplicas cada, da amostra de OR de *Copaifera* spp. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Equação 5).

Equação 5:

$$\text{Exatidão} = \text{CME} / \text{CT} * 100 \quad (5)$$

Em que: CME= *Concentração Média Experimental*

CT= *Concentração Teórica*

A robustez foi verificada pela variação da temperatura da coluna (28 e 32°C), da vazão da fase móvel (0,98 e 1,02mL/min) e da composição da fase móvel (solução A- acetonitrila acidificada com ácido fosfórico à 0,2%: 68 e 72%). Os resultados obtidos foram comparados com os resultados de soluções analisadas nas condições do método desenvolvido (anteriormente descritas-item 3.2.10.1), por meio do coeficiente de variação (CV%).

3.2.11 Co-validação da metodologia analítica para o óleo essencial (OE) de *Copaifera* spp.

Os parâmetros de especificidade, linearidade, bem como precisão (nível repetibilidade e precisão intermediária) foram avaliados de acordo com o item 3.2.10.3, com objetivo de analisar a adequação da metodologia desenvolvida para quantificação do β -cariofileno nesta matriz.

Para a linearidade do método, a concentração dos pontos da amostra de OE de *Copaifera* spp. foram de 0,6; 0,7; 0,8, 0,9 a 1mg/mL. Para precisão (nível repetibilidade e precisão intermediária) a concentração foi de 0,8mg/mL.

3.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

3.3.1 Escolha dos animais

Para participação no estudo foram selecionadas vacas de aptidão leiteira; de raças e idades variadas; primíparas ou pluríparas e no máximo com 2/3 do estágio de

lactação; que não faziam uso de qualquer tipo de medicamentos e aparentemente saudáveis.

Não foram incluídas nos experimentos vacas nos primeiros 15 dias e no último 1/3 de lactação. Também foi levantado o histórico de cada animal com relação à mastite e aquelas com histórico de mastite crônica não foram incluídas nas análises.

Para a coleta das amostras de leite, foram escolhidos animais que apresentaram mastite subclínica de grau III, pois animais com mastite clínica, quando detectados, normalmente já estavam em tratamento, não sendo indicado para o cultivo microbiológico.

3.3.2 Coleta das amostras de leite

As amostras de leite foram coletadas em três granjas leiteiras próximas à cidade de Goiânia, em dois períodos distintos, mês de agosto/2012, período de seca e mês de fevereiro/2013, período de chuva. Das três propriedades, duas realizavam ordenha mecânica e uma manual, duas vezes ao dia, com intervalo médio de 10-12 horas.

Antes de iniciar a ordenha, os animais foram submetidos à lavagem dos tetos com água e em seguida, ao teste da caneca de fundo escuro ou telada (Figura 4), para detecção de mastite clínica. Os quartos mamários sem mastite clínica foram submetidos ao teste de campo CMT (Figura 5), com a finalidade de se detectar a mastite subclínica grau III (ANDRADE et al., 1998; VOLTOLINI et al., 2001). A leitura e interpretação dos resultados foram realizadas de acordo com a Tabela 3.

Figura 4- Coleta de leite em caneca de fundo escuro ou telada para detecção de mastite clínica.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5- Bandeja contendo leite e reagente CMT utilizados para detecção de mastite subclínica.



Legenda: CMT- *California Mastitis Test*.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 3- Parâmetro utilizado para interpretação dos resultados obtidos pelo teste CMT.

Resultados	Leitura
Negativo	A mistura permanece fluida, sem precipitação.
Fracamente positivo (Grau I)	Apresenta distinta precipitação, sem formação de gel.
Distintamente positivo (Grau II)	Apresenta formação gelatinosa
Fortemente positivo (Grau III)	Apresenta formação gelatinosa e umbelização central

Legenda: CMT- *California Mastitis Test*.

Fonte: Voltolini et al. (2001).

Os tetos dos quartos mamários diagnosticados com mastite subclínica grau III foram lavados com água e em seguida realizou-se antissepsia com álcool 70%. Posteriormente, desprezou-se os três primeiros jatos de leite e coletou-se 10mL de leite em tubos de vidro esterilizados, os quais foram transportados imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG.

3.3.3 Caracterização fenotípica dos micro-organismos isolados de mastite bovina subclínica grau III

De cada amostra semeou-se 100µL de leite em placas contendo ágar manitol salgado e ágar MacConkey, as quais foram incubadas em aerobiose a 37°C por 24h. Também, semeou-se 100µL de leite em placas contendo ágar Sabouraud, suplementado com 0,05% de cloranfenicol, as quais foram lacradas com fita adesiva e armazenadas em temperatura ambiente (25°C ± 2) por 7 dias, para verificar a proliferação de leveduras. Ainda do tubo de coleta, 500µL de leite foram transferidos

para 4,5mL de água peptonada, realizando-se uma diluição de 10^{-1} , da qual retirou-se o volume de 100 μ L para semeadura em ágar base, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de cavalo (ágar sangue), o qual foi incubado em microaerofilia por 24-48h, de acordo com Winn et al. (2008).

Após este período, foi realizada a caracterização morfocolonial e isolamento de colônias. Aquelas obtidas a partir do ágar manitol salgado e MacConkey foram repicadas em ágar nutriente e incubadas em aerobiose a 37°C por 24h. Já as obtidas a partir do ágar sangue foram repicadas novamente em ágar sangue e incubadas em microaerofilia por 24- 48h.

Em seguida, foi realizada a caracterização morfotintorial pelo método de coloração de Gram e o teste de KOH a 3%. Após determinação da coloração e da forma bacteriana, as chaves de identificação de Baron, Peterson e Finegold (1994) foram seguidas, e os testes bioquímicos foram feitos de acordo com Winn et al. (2008) e Brasil (2004) para se chegar à identificação em espécie das bactérias isoladas.

Cepas padrões de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 13315 e *Escherichia coli* ATCC 8739, cedida pelo IPTSP/UFG, foram utilizadas como controle e confiabilidade dos resultados obtidos.

Após identificação dos micro-organismos, estes foram acondicionados em tubos *ependorf* contendo 1mL de caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB), acrescido de 20% de glicerina, os quais foram congelados em freezer -20°C, para as análises posteriores.

3.3.4 Análise Estatística

Foi realizada análise de frequência para os dados de caracterização fenotípica de micro-organismos.

3.4 TESTES DE SUSCETIBILIDADES

3.4.1 Atividade antimicrobiana *in vitro*

3.4.1.1 Reativação dos micro-organismos

Para reativação das bactérias, as provenientes do ágar manitol salgado e MacConkey foram descongeladas no mesmo meio de cultura de origem e incubadas a 37°C por 24h. Em seguida, com uma alça de platina flambada, pegou-se uma colônia isolada proveniente destes meios de culturas, as quais foram repicadas em ágar nutriente inclinado e incubadas a 37°C, por mais 24h.

As originárias do ágar sangue foram descongeladas neste mesmo meio e incubadas em microaerofilia por 24-48h. Em seguida, uma colônia isolada foi repicada novamente em ágar sangue e incubada em microaerofilia, por mais 24-48h. Realizou-se também coloração de Gram para confirmação das características das amostras reativadas.

3.4.1.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) da OR e OE de *Copaifera* spp. frente aos micro-organismos isolados foi determinada por meio da técnica de microdiluição em caldo Müller-Hinton (MH), conforme preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2003).

Este teste foi realizado em microplacas estéreis de 96 poços em forma de “U”, a qual continha 12 colunas (numeradas de 1 a 12) e 8 linhas (nomeadas de A a H) (Figura 6).

Figura 6- Microplaca estéril, contendo 96 poços em forma de “U”, utilizada no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo Müller Hinton.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Fonte: Amaral; Paula; Paula (2009).

Para a solução da OR de *Copaifera* spp., pesou-se 0,02g da OR em tubo esterilizado, acrescentou-se 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 2 μ L de Tween80®. Depois, 9mL de caldo MH foram adicionados, obtendo-se uma concentração final de 2000 μ g/mL.

Posteriormente, foram distribuídos em cada orifício da microplaca 100 μ L de caldo MH da coluna 2 a 12, nas linhas de A a H. Na coluna 1, nas linhas de A a G, foram colocados 200 μ L de OR de *Copaifera* spp. na concentração de 2000 μ g/mL e na linha H, coluna 1, foram colocados 200 μ L de DMSO diluído a 10% em caldo MH.

Em seguida, foram realizadas as diluições seriadas, sendo retirados 100 μ L da coluna 1 e transferidos para a coluna 2, realizou-se a homogeneização dos orifícios da coluna 2 e sequencialmente 100 μ L foram retirados e transferidos para a coluna 3, esse procedimento foi realizado até a coluna 11 de onde foram descartados 100 μ L. Na linha H ocorreu a diluição seriada do DMSO até a coluna 12.

Inóculos bacterianos foram suspensos em solução salina estéril (NaCl a 0,85%) até obtenção de turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland, obtida por leitura em espectrofotômetro a 625nm (0,08 à 0,1 de absorbância). Em seguida, realizou-se uma diluição de 1:10 em salina a 0,85% de forma a se obter uma concentração de células bacterianas de 10⁷ UFC/mL.

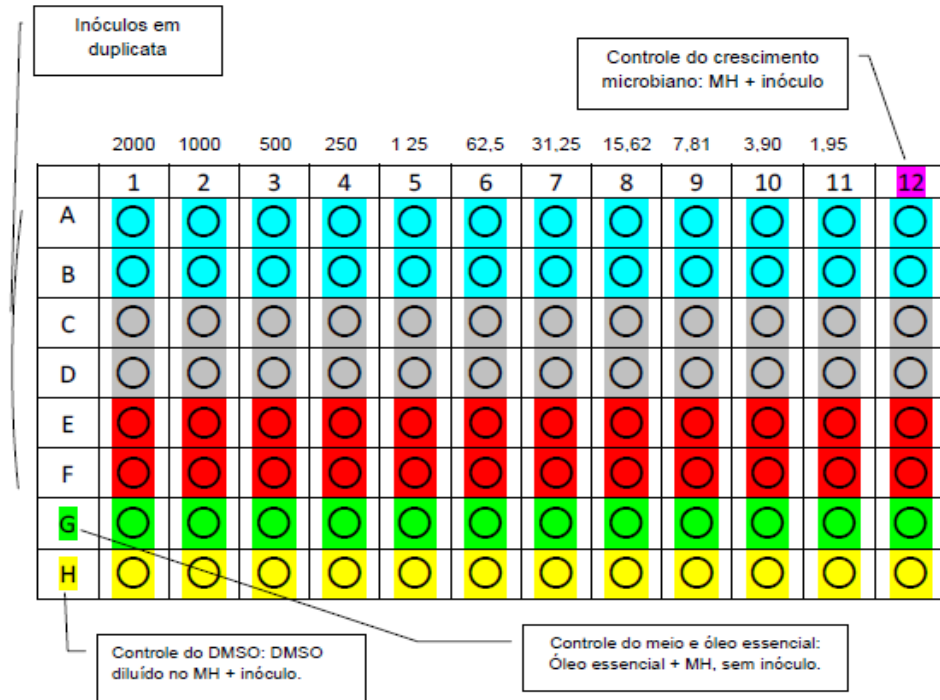
Em cada microplaca adicionou-se três cepas bacterianas diferentes. Sendo assim, a distribuição de cada inóculo ocorreu da seguinte forma: linhas A e B, inóculo 1; linhas C e D, inóculo 2; linhas E e F, inóculo 3. Portanto, cada cepa foi alocada em duas linhas.

De cada inóculo, 5 μ L foram adicionados nas linhas correspondentes, porém não foram colocados na linha G, porque esta foi a linha destinada para o controle da esterilidade do meio MH e da OR de *Copaifera* spp.

A diluição final dos inóculos nos poços ficou na faixa de 5 x 10⁵ UFC/mL ou 5 x 10⁴ UFC/ poço. A linha H serviu como controle do DMSO e a coluna 12 como o controle do crescimento microbiano, ou seja, não recebeu OR de *Copaifera* spp., mas recebeu-se meio de cultura e inóculo (viabilidade da cepa).

A Figura 7 apresenta esquematicamente o método de microdiluição em caldo descrito anteriormente, bem como a concentração da OR e do OE de *Copaifera* spp. em cada poço.

Figura 7- Esquema da técnica de microdiluição em caldo MH para teste de atividade antimicrobiana da oleoresina (OR) e do óleo essencial (OE) de *Copaifera* spp. frente às bactérias isoladas de amostras de leite de vacas com mastite subclínica grau III. As cores diferentes nas duplas de linhas de A a F indicam inóculos diferentes.



Fonte: Amaral; Paula; Paula (2009).

Para as bactérias fastidiosas o meio MH foi suplementado com sangue lisado de cavalo (SLC) a 5 %, de acordo com CLSI (2003).

Para o preparo do SLC a 5%, o sangue desfibrinado de cavalo foi congelado e descongelado por sete vezes até ficar totalmente lisado. Posteriormente, misturou-se assepticamente, volumes iguais de SLC e água destilada esterilizada, obtendo-se SLC a 50%. Logo, centrifugou-se duas vezes o SLC a 50% a 12.000 rotações por minuto (rpm), durante 20 min.

Em seguida, acrescentou-se 5µL do sobrenadante de SLC a 50% ao caldo MH, obtendo-se uma concentração final de SLC à 5%. O SLC foi acrescentado antes da inoculação dos micro-organismos, de maneira a evitar diluição adicional do agente antimicrobiano nas microplacas.

Por fim, as microplacas foram incubadas a 37°C por 24h e, para os organismos fastidiosos, foram incubados em microaerofilia por 24h. Aproximadamente 1 hora antes de completar o período de incubação acrescentou-se nos poços das microplacas 20µL de cloreto de trifetil tetrazolium (TTC) a 0,5% e as microplacas

foram novamente incubadas por mais 30 min. Em seguida, realizou-se a de leitura. O aparecimento de coloração vermelha era indicativo de crescimento bacteriano.

A concentração inibitória mínima foi considerada a menor concentração da OR de *Copaifera* spp. capaz de inibir o crescimento bacteriano. De acordo com Holetz et al. (2002), a atividade antimicrobiana é considerada boa quando a amostra apresenta $CIM \leq 100 \mu\text{g/mL}$, moderada $100 < CIM \leq 500 \mu\text{g/mL}$, fraca $500 < CIM \leq 1000 \mu\text{g/mL}$ e inativa $CIM > 1000 \mu\text{g/mL}$.

O mesmo procedimento foi realizado para o OE de *Copaifera* spp.

3.4.1.3 Verificação da atividade antimicrobiana *in vitro* de três formulações fitoterápicas à base de *Copaifera* spp.

As bases galênicas utilizadas foram creme emulsão do tipo catiônica, aniônica (Lanette®) (Anexo B) e não-iônica (Polowax®), (Anexo C) as quais continham conservantes antimicrobianos (Nipagin® e Nipazol®) (Anexo D e E). Essas bases foram adquiridas na Therapêutica Farmácia de Manipulação® localizada na cidade de Goiânia.

O procedimento experimental para realização desta análise ocorreu em 2 etapas:

- Etapa 1: Incorporação da matéria-prima vegetal nas bases galênicas (catiônica, não-iônica e aniônica).

A produção magistral ocorreu na Therapêutica Farmácia de Manipulação®. Foi incorporado 20% de material vegetal em cada base galênica, de acordo com a Fórmula (1).

Fórmula (1):

Material Vegetal (20%) -----10g

Base galênica (80%) ----- q.s.p 50g

Primeiramente, pesou-se em um gral 40g de base galênica, em seguida, adicionou-se 10g do material vegetal e, com auxílio do pistilo e do pão-duro, manteve-se uma agitação rápida e constante para homogeneizar os mesmos. Este procedimento foi realizado para cada base galênica.

As formulações fitoterápicas à base de *Copaifera* spp. foram acondicionadas em frascos plásticos, opacos e mantidos à temperatura ambiente. Em relação aos controles (bases galênicas sem a matéria-prima vegetal), também foram acondicionados em frascos plásticos, opacos e mantidos à temperatura ambiente.

- Etapa 2: Antibiograma

O teste de antibiograma foi realizado pelo método de difusão em ágar MH de acordo com Winn et al. (2008), no Laboratório de Bacteriologia do IPTSP/UFG. Foram testadas 42 cepas bacterianas dentre as amostras identificadas, e as mesmas foram descongeladas e reativadas de acordo com o item 3.4.1.1.

Primeiramente preparou-se os inóculos bacterianos em solução salina estéril (NaCl a 0,85%) até obter-se uma turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland, a qual foi obtida por leitura em espectrofotômetro a 625nm (0,08 à 0,1 de absorbância). Em seguida, os mesmos foram semeados com *swab* estéril sobre a superfície do ágar MH.

Posteriormente, com ponteiras esterilizadas e utilizadas uma única vez, as formulações fitoterápicas foram depositadas na superfície do ágar MH, sendo o mesmo procedimento feito para os controles. Também, foi depositado sobre a placa um disco contendo antibiótico gentamicina (10µg) (Figura 8).

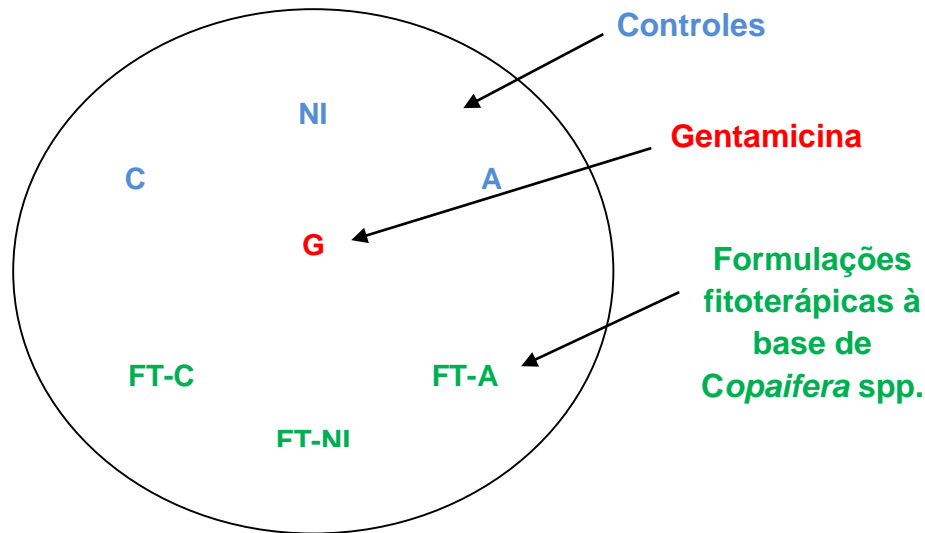
Figura 8- Deposição das formulações fitoterápicas à base de *Copaifera* spp., dos controles e do antibiótico gentamicina sobre o meio Müller-Hinton (MH).



Fonte: Próprio autor.

Para evitar interferências entre os possíveis halos de inibição, foi mantida uma distância aproximadamente de 40mm entre as formulações fitoterápicas, os controles e o antibiótico gentamicina (Figura 9).

Figura 9- Esquema de montagem do teste de antibiograma nas placas Petri contendo ágar Mueller-Hinton (MH).



Legenda: **Controles-** C: catiônica; NI: não-iônica; A: aniônica; G: **Gentamicina**; **Formulações fitoterápicas à base de *Copaifera* spp.-** FT-C: formulação fitoterápica utilizando base galênica catiônica; FT-NI: formulação fitoterápica utilizando base galênica não-iônica; FT-A: formulação fitoterápica utilizando base galênica aniônica.

Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C, e após 24h de incubação foi realizada a leitura. Para as formulações fitoterápicas e o controle, foi considerado sensível a presença de qualquer tamanho de halo de inibição. Já para o antibiótico gentamicina, a leitura foi feita de acordo com CLSI (2008).

3.4.2 Análise estatística

Foi realizada análise de frequência para os dados da atividade antimicrobiana da OR e do OE de *Copaifera* spp. frente às bactérias isoladas.

Para a comparação da melhor atividade antimicrobiana entre a OR e o OE de *Copaifera* spp. utilizou-se o teste não-paramétrico Wilcoxon pelo procedimento NPAR1WAY do SAS a 5% de significância.

3.5 TESTES *IN VIVO*

3.5.1 Produção magistral da formulação fitoterápica à base de *Copaifera* spp. para aplicação *in vivo*

A produção magistral da formulação fitoterápica à base de *Copaifera* spp. foi realizada na Therapêutica Pharmácia de Manipulação®, dois dias antes da aplicação intramamária.

Também foi incorporada na base galênica 20% da matéria-prima vegetal, e o modo de preparo foi realizado de acordo com o item 3.4.1.3, porém utilizou-se agitador mecânico para homogeneizar as mesmas, já que a quantidade preparada foi maior.

Em seguida, a formulação fitoterápica à base de *Copaifera* spp. foi envasada em seringa para uso de medicamento intramamário em bovino (Figura 10) na quantidade de 11g. O mesmo procedimento foi adotado para o controle, base galênica sem a matéria-prima vegetal. Posteriormente, todas as seringas foram armazenadas em caixa de isopor e mantidas à temperatura ambiente para posterior aplicação.

Figura 10- Seringa para uso de medicamento intramamário em bovino.



Fonte: Injeblow Indústria e Comércio Ltda (2013).

3.5.2 Aplicação intramamária e avaliação preliminar de formulação fitoterápica contendo *Copaifera* spp.

Para realização do teste *in vivo*, o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFG, com o protocolo de n. 063/12 (Anexo F), sendo o “n” proposto, 30 animais.

Os experimentos foram realizados na Fazenda Escola da UFG, com autorização do responsável pelo rebanho, o qual assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), preconizado pelo CEUA/ UFG (Apêndice A).

Primeiramente, as vacas leiteiras foram submetidas à lavagem dos tetos com água e em seguida, ao teste da caneca de fundo escuro ou telada. Após, foi feita antissepsia pelo método de *pré-dipping* (Figura 11) com solução à base de iodo e em seguida, os tetos foram secados com toalha de papel descartável.

Figura 11- Antissepsia do teto de vacas leiteiras com solução iodada (*pré-dipping*).

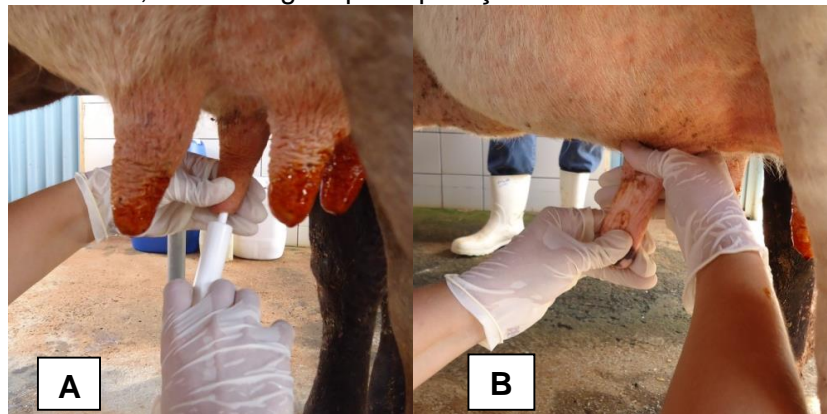


Fonte: Próprio autor.

Posteriormente, dois jatos de leite foram desprezados, e amostras de leite foram colhidas para realização do teste de campo CMT, com a finalidade de detectar a mastite subclínica grau III (ANDRADE et al., 1998; VOLTOLINI et al., 2001). Após o teste, os animais foram ordenhados.

Dos animais diagnosticados com mastite subclínica grau III, realizou-se outra antissepsia com álcool 70% e, em seguida, coletou-se amostras de leite para avaliação microbiológica de acordo com o item 3.3.3. e, efetuou-se as aplicações intramamárias (Figura 12A) da formulação fitoterápica à base de *Copaifera* spp. e do controle.

Figura 12- Teste *in vivo*: **A:** Aplicação intramamária da formulação fitoterápica à base de *Copaifera* spp. e do controle; **B:** Massagem pós-aplicação.



Fonte: Próprio autor.

Após as aplicações, era realizada uma massagem no teto, no sentido vertical (Figura 12B), para que os mesmos pudessem chegar até a cisterna da glândula mamária e, por fim, realizou-se antissepsia do teto com solução de glicerina iodada (*pós-dipping*).

A granja leiteira adotava o sistema de ordenha mecânica, duas vezes ao dia, com intervalo médio de 10-12 horas. Todas as aplicações intramamárias foram realizadas sempre após a última ordenha. Os animais foram avaliados clinicamente, todos os dias, tendo sido proposto sete aplicações.

3.5.3 Determinação do teor de β -cariofileno na formulação fitoterápica à base de *Copaifera* spp.

Para a determinação do teor de β -cariofileno na formulação fitoterápica à base de *Copaifera* spp. foi co-validado o método de quantificação de β -cariofileno por CLAE.

Os parâmetros de especificidade, linearidade, bem como de precisão (repetibilidade e precisão intermediária) foram avaliados de acordo com o item 3.2.10.3, com o objetivo de analisar a adequação da metodologia desenvolvida para quantificação do β -cariofileno nesta matriz.

Para a linearidade do método, a concentração dos pontos da formulação fitoterápica à base de *Copaifera* spp. foram de 6,43; 7,20; 7,97; 8,74 a 9,60mg/mL. Já para precisão (nível repetibilidade e precisão intermediária) a concentração foi de 7,97mg/mL.

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA OLEORRESINA (OR) DE *Copaifera* spp.

Foram realizados vários testes para caracterização da OR de *Copaifera* spp. e os resultados estão no Quadro 1.

Quadro 1- Resultados da caracterização da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.

Testes	Especificações	Resultados
Caracterização organoléptica*	<p>Aspecto: líquido transparente, mais ou menos espesso;</p> <p>Cor: amarelo claro à amarelo pardo, pouco ou não fluorescente;</p> <p>Odor: cheiro forte, aromático e especial;</p> <p>Sabor: acre persistente, um pouco amargo e balsâmico*.</p>	<p>Aspecto: líquido transparente, mais espessa;</p> <p>Cor: amarelo claro não fluorescente;</p> <p>Odor: cheiro forte e aromático;</p> <p>Sabor: acre persistente, pouco amargo.</p>
Análise de solubilidade*	<p>Dissolve-se completamente no clorofórmio e no éter de petróleo, formando soluções límpidas.</p> <p>Solúvel no álcool etílico absoluto, álcool amílico, éter etílico e sulfureto de carbono, formando soluções levemente opalescentes e, insolúvel em água.</p> <p>Ao dissolver 1mL de OR de copaíba em 8mL de éter de petróleo, deve-se formar precipitado flocoso branco*.</p>	<p>Dissolveu completamente no clorofórmio e no éter de petróleo, formando soluções límpidas.</p> <p>Solúvel no álcool etílico absoluto, álcool amílico, éter etílico e sulfureto de carbono e insolúvel em água.</p> <p>Ao dissolver 1mL de OR de copaíba em 8mL de éter de petróleo, formou-se precipitado flocoso branco.</p>
Densidade relativa*	0,940 a 0,995 a 25°C *	0,984 a 25°C
Densidade de massas	----	0,982g/mL a 25°C
Viscosidade	----	118 mPa.s
Teor de essências*	≥ 40% *.	41,60 % ± 0,208

Legenda: IA: Índice de Acidez; *Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 1926); **Biavatti et al. (2006).

Quadro 1 (continuação)- Resultados da caracterização da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.

Testes	Especificações	Resultados
Ausência de parafina*	Não deve-se formar pequenas gotas oleosas dispersas no líquido, mesmo após 1 hora *.	Não formou pequenas gotas oleosas dispersas no líquido, mesmo após 1 hora.
Ausência de óleo fixo*	Não deve-se produzir gelatinização *.	Não produziu gelatinização.
Ausência de terebintina*	Não deve-se desprender cheiro de terebintina e o resíduo não deve conter cristais *.	Não desprende cheiro de terebintina e o resíduo não conteve cristais.
Ausência de bálsamo de gurjun*	Não deve- se formar zona avermelhada na superfície de separação dos líquidos, nem estes, sendo misturados por agitação devem tomar cor vermelha ou púrpura*.	Não formou zona avermelhada na superfície de separação dos líquidos, nem estes, sendo misturados por agitação tomou-se cor vermelha ou púrpura.
IA (mg KOH/g)**	9,5-45,8mg KOH/g	47,23 mg KOH/g \pm 0,115

Legenda: IA: Índice de Acidez; *Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 1926); **Biavatti et al. (2006).

4.1.1 Caracterização organoléptica

A análise do aspecto visual, sabor, odor e da percepção ao tato da matéria-prima vegetal é o meio mais simples e rápido de verificar alguns parâmetros de qualidade, principalmente de identidade e pureza. Ao apresentar características diferentes das estabelecidas, considera-se que o material vegetal não preenche os requisitos necessários, sendo portanto rejeitada (FARIAS, 2010).

Portanto, a OR de *Copaifera* spp. adquirida estava de acordo com os parâmetros organolépticos preconizados por Brasil (1926), a qual apresentou-se como um líquido transparente, mais espessa, de cor amarelo claro, sem fluorescência, com cheiro forte e aromático (Quadro 1).

Os parâmetros organolépticos estabelecidos de um material vegetal, no entanto, dependendo da forma de cultivo, dos fatores ambientais como solo, condições climáticas, época e local de coleta, espécie, entre outros, podem sofrer alterações. Sendo assim, variações nas características organolépticas da OR de copaíba nem sempre significam que a amostra se encontra adulterada ou não preencha os requisitos necessários estabelecidos.

Silva et al. (2012) demonstraram que a espécie *Copaifera reticulata* produziu uma OR de aspecto líquido, fino, odor fraco e de coloração amarelo-dourada (73,3% das árvores), mas com variações de amarelo-média (16,7%) à amarelo-clara (10%). Alencar (1982) sugere que, além da espécie de copaíba, as características do local de crescimento das árvores, como granulometria do solo, podem afetar a coloração da OR.

Com relação à coloração, Rigamonte-Azevedo et al. (2004) sugerem que árvores maiores, talvez mais velhas, produzam OR de coloração mais escura. Isto implica que a tonalidade da OR também pode estar relacionada à competição com outras árvores, como densidade de indivíduos em ambientes de floresta aberta ou densa, e à idade da copaibeira. Entretanto, essas informações não são conclusivas, tendo a necessidade de mais estudos para verificar estas hipóteses.

A OR de *Copaifera* spp. em estudo também apresentou sabor acre persistente e pouco amargo, estando de acordo Brasil (1926) (Quadro 1). Segundo Souza (2010), a avaliação do aspecto sabor da OR é de extrema valia, devendo ser realizada por pessoas treinadas; é uma das formas de identificar os morfotipos das copaibeiras em campo. Desse modo, o morfotipo copaíba angelim-branco apresenta sabor mais suave e com consistência mais viscosa, enquanto copaíba mari-mari é mais líquida e possui sabor mais amargo.

Por fim, segundo Burt (2004), variações no perfil organoléptico dos óleos indica diferenças na composição química dos mesmos, o que pode influenciar em suas propriedades farmacológicas. Logo, se a coleta da OR de copaíba fosse realizada de forma padronizada, levando-se em consideração os fatores ambientais e genéticos, valorizaria características intrínsecas de cada espécie e agregaria maior valor à matéria-prima vegetal, pois permitiria melhor comercialização do produto por parte das comunidades extrativistas.

4.1.2 Análises para verificar adulterações na oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.

A variabilidade dos componentes da OR de copaíba é muitas vezes atribuída a mistura com óleos de diferentes espécies botânicas, como bálsamo de gurjum e com óleos da espécie *Calophyllum*, os quais possuem densidade e aroma semelhantes. Também se atribui a essa variabilidade, adulterações pela mistura com outros tipos de óleos de menor valor agregado, para aumentar o volume e, conseqüentemente, o

rendimento da mesma (VEIGA JR; PATITUCCI; PINTO, 1997; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Logo, os resultados mostraram que a OR de *Copaifera* spp. avaliada neste trabalho não estava adulterada com parafina, óleos fixos, resina de terebintina e bálsamo de gurjum, estando dentro dos critérios preconizados por Brasil (1926) (Quadro 1).

4.1.3 Análise de solubilidade

O teste de solubilidade realizado auxiliou na avaliação da qualidade da OR de copaíba. O resultado obtido estava de acordo com os parâmetros preconizados por Brasil (1926), pois a OR de *Copaifera* spp. dissolveu-se completamente no clorofórmio e no éter de petróleo (proporção de 1:1), o que resultou em soluções límpidas. A OR foi também solúvel no álcool etílico absoluto, álcool amílico, éter etílico, sulfureto de carbono e insolúvel em água. Outro parâmetro avaliado foi a formação imediata de precipitado flocoso branco ao dissolver 1mL de OR de copaíba em 8mL de éter de petróleo (proporção 1:8), o que ocorreu no presente estudo (Quadro 1).

A OR de copaíba é constituída de sesquiterpenos (fração volátil de característica apolar) e diterpenos (ácidos diterpênicos de característica polar). Na proporção de 1:1, de OR de *Copaifera* spp. e éter de petróleo, a OR de copaíba estava mais concentrada e isso permitiu que os compostos de baixa polaridade contribuíssem com a solubilização dos compostos de maior polaridade, o que resultou na solubilidade total da OR de copaíba. Já na proporção de 1:8, de OR de *Copaifera* spp. e éter de petróleo, a OR de copaíba está menos concentrada, logo a fração de baixa polaridade da OR de copaíba não contribuiu com a solubilização dos compostos de maior polaridade, os quais precipitaram. Assim, estes dois resultados puderam ser observados neste trabalho, os quais estão de acordo com Brasil (1926).

De acordo com Castro et al. (2012) e Vasconcelos e Godinho (2002), o teste de solubilidade da OR de copaíba nos solventes etanol e éter de petróleo é uma forma de verificar se o material vegetal está sendo adulterado com triacilglicerídeos (óleos graxos). Os terpenos são solúveis em solventes polares como o etanol e pouco solúveis em solventes apolares como o éter de petróleo. Os triacilglicerídeos, no entanto, são insolúveis em etanol e totalmente solúveis em éter de petróleo. De acordo com os resultados obtidos conclui-se que a OR de estudo não estava adulterada por

triacilglicerídeos, pois houve solubilização no etanol. Ao adicionar maior proporção de éter de petróleo (1:8), houve precipitação da fração polar da OR de *Copaifera* spp., o que indica que, se tivesse triacilglicerídeos, estes influenciariam na solubilização dos compostos de maior polaridade e não haveria precipitação.

4.1.4 Determinação da densidade relativa e de massa

O valor da densidade relativa da OR de copaíba segundo Brasil (1926) é de 0,940 a 0,995 à 25°C. Logo, a OR avaliada estava dentro das especificações, com valor de 0,984 à 25° C (Quadro 1).

Já a densidade de massa à 25°C, a qual foi calculada de acordo com Brasil (2010), teve o valor de 0,982g/mL (Quadro 1), o que está dentro da faixa descrita na literatura para OR de copaíba, como por exemplo, o estudo de Silva et al. (2012), em que a densidade média da OR da espécie *Copaifera reticulada* foi de 0,980 g/cm³. Já no trabalho de Freire et al. (2011), foi encontrada densidade média da espécie *Copaifera paupera* de 0,9534g/mL, valor próximo ao encontrado no presente estudo.

4.1.5 Determinação da viscosidade

A viscosidade da OR de copaíba pode variar mediante a proporção da fração volátil e resinosa presente no material vegetal, ou seja, quanto maior a proporção de resina maior será a viscosidade. Em contrapartida, quanto maior a proporção da fração volátil, menor será a viscosidade (AMARAL; SIMÕES; FERREIRA, 2005).

No presente estudo, a viscosidade apresentada pela OR foi de 118 mPa.s. (Quadro 1). No trabalho de Silva et al. (2012), a viscosidade das OR da espécie *Copaifera reticulada* variaram entre as áreas de coleta, de 14 a 170 Pa.s, tendo o valor médio de 82,27 Pa.s. Logo, o resultado do presente trabalho foi acima desse valor médio. Acredita-se que as variações físicas da OR são decorrentes de atributos genéticos e ambientais (ALENCAR, 1982).

De acordo com Rigamonte-Azevedo et al. (2004), há tendência das OR de baixa viscosidade serem límpidas e as de alta viscosidade serem opacas, dados diferentes do encontrado no presente estudo, em que a OR de copaíba apresentou característica mais espessa e límpida (Quadro 1). Já em relação ao tamanho das árvores, esses mesmos autores observaram tendência das menores apresentarem

óleos de baixa viscosidade e as maiores, de alta viscosidade. Outro fator é que, através do conhecimento empírico de extrativistas do Estado do Acre pode-se relacionar a viscosidade das OR com o tipo de copaíba, ou seja, a copaíba branca e amarela produzem óleos de baixa viscosidade; a vermelha, média viscosidade e a preta, alta viscosidade.

4.1.6 Índice de Acidez (IA)

O IA é a massa de hidróxido de potássio, em miligramas, gasta na neutralização dos ácidos livres presentes em um grama de amostra de óleo (BRASIL, 2010). Assim, o IA da OR de *Copaifera* spp. deste trabalho foi de 47,23 mg KOH/g \pm 0,115.

De acordo com a metodologia proposta por Vasconcelos e Godinho (2002), Biavatti et al. (2006) realizaram-se o IA para 7 amostras de OR de copaíba, das quais algumas eram comerciais e outras autênticas e, os dados do IA variaram de 9,5 a 45,8 mg KOH/g, resultado próximo ao encontrado neste trabalho (Quadro 1).

Embora o método descrito por Vasconcelos e Godinho (2002) seja clássico e de baixo custo, o qual possibilita investigar adulterações grosseiras de OR de copaíba, Biavatti et al. (2006) sugerem que o mesmo seja avaliado, contemplando um número maior de amostras, antes de ser sugerido como método para controle de qualidade de OR de copaíba.

De acordo com o estudo realizado por Souza (2010), há características físico-químicas (IA) distintas para cada espécie e ainda variação entre indivíduos de copaibeiras. Sendo assim, acredita-se que os valores do IA do método proposto deve ser padronizado, levando-se em consideração a época e local de coleta da OR, a espécie, formas de cultivo, condições climáticas, solo, entre outros.

Segundo Silva et al. (2012), a variabilidade das características físico-químicas indica que cada árvore deve ser analisada separadamente, e que grupos de árvores com características similares também devem ser manejados separadamente. Esse manejo pode agregar valor ao produto, mesmo considerando que o manejo e exploração das árvores de forma separada aumentam os custos.

Características distintas também podem propiciar diferentes utilizações industriais das OR. Uma OR mais fina, de baixa viscosidade e baixa acidez tem maior fração de óleos essenciais, a qual pode ser destinada às indústrias farmacêuticas ou utilizada como fixador de perfumes em empresas de cosméticos. Em contrapartida,

as mais espessas, mais densas e mais ácidas, podem ser empregadas em indústrias de cosméticos, para a fabricação de sabonetes, xampus e condicionadores (SILVA et al., 2012; SOUZA, 2010).

4.1.7 Obtenção do óleo essencial (OE) de *Copaifera* spp.

O rendimento médio do processo de obtenção do OE de copaíba foi de 41,60% (v/v) \pm 0,208 em relação ao volume inicial de OR de *Copaifera* spp., o qual se encontrava dentro das condições de Brasil (1926) (Quadro 1). Levando-se em consideração o rendimento médio da fração volátil, sugere-se que a proporção de resina da OR de estudo era maior do que de fração volátil.

O percentual de OE obtido a partir da OR de copaíba foi muito superior ao encontrado no estudo realizado por Alencar (2013), em que o OE de copaíba extraído pelo método de hidrodestilação apresentou um rendimento de aproximadamente 10% em relação à OR utilizada para extração. Sendo assim, sugere-se que os parâmetros utilizados na metodologia de extração foram adequados para obtenção de um rendimento na extração de OE a partir de OR de copaíba.

Segundo Silva (2006), variações discrepantes no rendimento dos OE estão relacionadas com a época de coleta, uma vez que a produção destes óleos varia durante o ciclo vegetativo e com o tipo da espécie em estudo.

4.1.8 Análise química da fração volátil da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.

A constituição química do OE de *Copaifera* spp. obtida pelo processo de extração por hidrodestilação em aparato tipo Clevenger está descrita na Tabela 4, a qual foi semelhante aos encontrados por vários autores (CASCON; GILBERT, 2000; DEUS; ALVES; ARRUDA, 2011; VASCONCELOS et al. 2008, VEIGA JÚNIOR et al. 2007).

De acordo com a Tabela 4 foi possível identificar vários sesquiterpenos, sendo que todos (96,14%) eram hidrocarbonetos, e os compostos não identificados somaram 3,84%. Segundo os estudos de Cascon (2004), os sesquiterpenos hidrocarbonetos de duas espécies analisadas representaram cerca de 80% das OR, valor inferior ao encontrado neste estudo. De acordo com o autor, variações

quantitativas das análises químicas podem estar relacionadas com as fases de crescimento do vegetal e com as variações das condições ambientais.

Tabela 4- Composição química do óleo essencial (OE) de *Copaifera* spp. analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

Constituintes	KI (Índice de Kovats)	% Relativa dos constituintes do óleo essencial
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		
δ- elemeno	1338	0,27
α- cubebeno	1348	3,80
α- copaeno	1376	33,61
β- cubebeno	1388	1,44
β- elemeno	1390	2,14
Cipereno	1398	0,21
β- cariofileno	1419	35,03
γ- elemeno	1436	0,60
α- trans- bergamoteno	1434	1,33
α- humuleno	1454	4,33
Aromadendreno	1460	2,23
γ- muuroleno	1479	0,61
cadina-1(6),4 diene<cis>	1463	1,11
α-muuroleno	1500	0,34
β-bisaboleno	1505	0,40
γ-cadineno	1513	2,46
δ-cadineno	1523	4,18
α-cadineno	1538	0,18
Germacrene B	1561	1,89
		96,16
Sesquiterpenos oxigenados	---	---
Compostos não identificados	---	3,84
TOTAL	---	100

O constituinte majoritário encontrado foi o β-cariofileno com 35,03%, seguido de α-copaeno com 33,61%, α-humuleno com 4,33% e δ-cadineno com 4,18%. Esse dado corrobora com o trabalho de Cascon e Gilbert (2000), em que predominou β-cariofileno, principal componente, seguido de α-copaeno. No trabalho de Veiga Júnior

et al. (2007), para três espécies estudadas também obteve-se β -cariofileno como constituinte majoritário, seguido de α -humuleno, α -copaeno, α -bergamoteno, δ -cadineno.

4.1.9 Identificação dos diterpenos presentes na oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourie (ESI FT-ICR MS)

Electrospray (ESI) é uma técnica de ionização à pressão atmosférica, de espectrometria de massas, e é obtida pelo fluxo de fase móvel que atravessa um capilar de pequeno diâmetro alimentado com uma diferença de potencial de KV. O campo elétrico é obtido pela aplicação de uma diferença de potencial de 2 a 5 KV que induz o acúmulo de carga na superfície do líquido no final do capilar, formando gotículas carregadas. Assim, a gota sendo formada na ponta do capilar estará enriquecida por íons positivos ou negativos, dependendo do potencial aplicado (DINIZ, 2011; MORAES; LAGO, 2003).

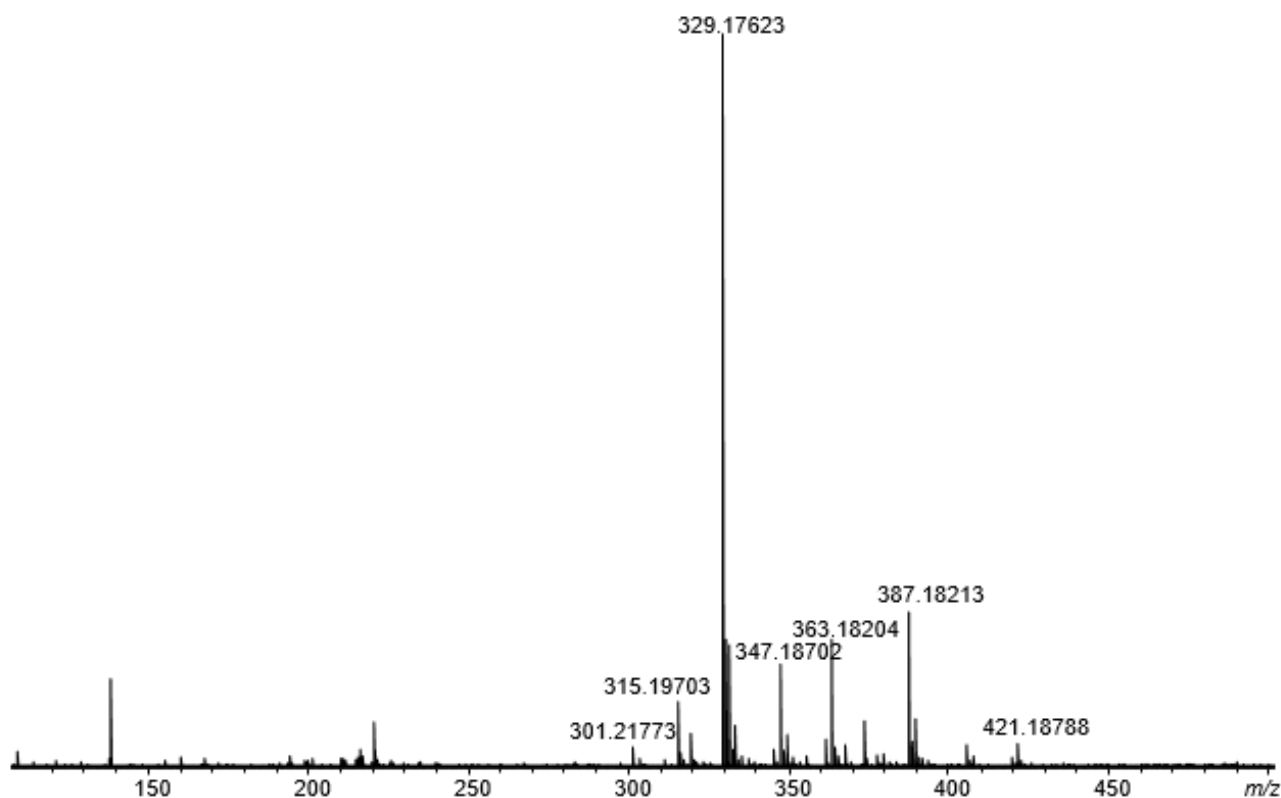
A medida que a densidade de carga é aumentada na gota, presa à ponta do capilar, o campo elétrico formado entre o capilar e o contra-eletródo aumenta, provocando uma deformação na gota. A gota ganha forma de um cone, o qual é denominado de cone de Taylor. Quando a densidade de carga supera a tensão superficial, a gota se desprende do capilar subdividindo-se. A frequência deste último processo depende da magnitude do campo elétrico, da tensão superficial do solvente e da condutividade da solução. Como resultado final, os íons tornam-se completamente dessolvatados. Pode-se presumir que ESI envolve apenas o rompimento gradual de interações não covalentes, principalmente a remoção de moléculas de solventes (DINIZ, 2011).

Como os analisadores dos espectrômetros de massas não analisam massa propriamente, mas sim, a razão massa/carga (m/z) dos íons, o espectro de massas de macromoléculas biológicas corresponde a distribuição de sinais consecutivos que correspondem a populações de íons com diferentes cargas obtidas por protonação $[M+zH]^{z+}$ ou cátions (modo positivo-ESI(+)); ou desprotonação $[M-zH]^{z-}$ ou ânions (modo negativo-ESI(-)) (CROTTI et al., 2006; DALMASCHIO, 2012).

Através desse método de ionização moléculas de baixo ou alto peso molecular, alta polaridade e complexidade estrutural podem ser facilmente analisadas por espectrometria de massas (PEREIRA, 2013). Portanto, a implementação de uma fonte de ESI é relativamente simples, comparando-se com outras fontes para espectrometria de massas (MORAES; LAGO, 2003).

A Figura 13 demonstra o espectro de massas, no modo negativo-ESI(-), dos compostos presentes na amostra de OR de *Copaifera* spp. Já a Tabela 5 contém as fórmulas moleculares estimadas do ESI(-) FT-ICR MS e os diterpenos presentes na mesma.

Figura 13- Espectro de massas, no modo negativo, por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* de ressonância ciclôtrica de íons por transformada de Fourier-ESI(-) FT-ICR MS, da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.



De acordo com a Tabela 5, foi possível identificar sesquiterpenos, diterpenos e compostos com 22 átomos de carbonos na amostra de OR de *Copaifera* spp.

Os esqueletos carbonados dos terpenóides são formados pela condensação de um número variável de unidades isoprênicas (pentacarbonos). Os sesquiterpenos e diterpenos contêm, respectivamente, 3 e 4 unidades de isopreno. Portanto, os sesquiterpenos e os diterpenos são formados, respectivamente, por 15 e 20 átomos

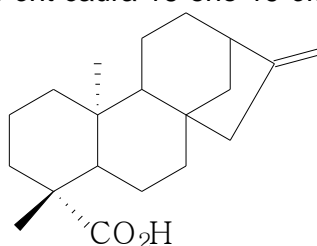
de carbono (SIMÕES; SPITZER, 2010). Já os compostos contendo 22 átomos de carbono acredita-se que sejam diterpenos esterificados com etila ou acetila.

Tabela 5- Fórmulas moleculares e os diterpenos estimados do espectro de massas, modo negativo, por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* de ressonância ciclôtrônica de íons por transformada de Fourie (ESI(-) FT-ICR MS) da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.

Experimental (m/z)	Fórmula Molecular	Erro	Diterpenos presente na OR de <i>Copaifera</i> spp.
289.15771	[C ₁₅ H ₂₆ O ₃ + Cl] ⁻	----	----
301.21773	[C ₂₀ H ₃₀ O ₂ - H] ⁻	-1,41	ácido <i>ent</i> -caura-16-eno-19-óico (Figura 14)
303.13697	[C ₁₅ H ₂₄ O ₄ + Cl] ⁻	----	----
305.15263	[C ₁₅ H ₂₆ O ₄ + Cl] ⁻	----	----
315.19703	[C ₂₀ H ₂₇ O ₃ - H] ⁻	-1,43	(1α,4α,4β,10β)-10-formil-1,4a-dimetil-8-metilenogibbano-1-carboxilato (Figura 15)
319.13188	[C ₁₅ H ₂₄ O ₅ + Cl] ⁻	----	----
321.14757	[C ₁₅ H ₂₆ O ₅ + Cl] ⁻	----	----
329.17623	[C ₂₀ H ₂₅ O ₄ - H] ⁻	-1,22	[(17β)-3,17- dihidróiestra-1(10),2,4-trien-17-il] acetato (Figura 16)
333.11122	[C ₁₅ H ₂₂ O ₆ +Cl] ⁻	----	----
333.20727	[C ₂₀ H ₃₀ O ₄ - H] ⁻	----	ácido <i>ent</i> -8(17),13-labdadieno-15,19-dióico (ácido <i>ent</i> -agático) (Figura 17) ou ácido 13-clerodeno-15,16-olídeo-18-óico (Figura 18)
347.18702	[C ₂₀ H ₂₇ O ₅ - H] ⁻	-1,08	(4aR,5S,7R,8aS,9aS)- 8a-hidróxi-3,4a,5-trimetil-2-oxo-2,4,4a,5,6,7,8,8a,9,9a-decahidronafto[2,3-b]furano-7-il (2E)-2-metil-2-butenoato (Figura 19)
363.18204	[C ₂₀ H ₂₇ O ₆ - H] ⁻	-2,02	1-formil-3,7-dihidróxi-4a-(hidróximetil)-1-metil-8-metilenogibbano-10-carboxilato (Figura 20)
367.18151	[C ₂₀ H ₂₈ O ₄ +Cl] ⁻	-0,54	ácido 3,13-clerodadieno-15,16-olídeo-18-óico (ácido patagônico) (Figura 21) ou ácido <i>ent</i> -15,16-epóxi-7β-hidróxi-3,13(16),14-clerodatrieno-18-óico (ácido 7-hidróxi-hardwíckiico) (Figura 22)
373.20276	[C ₂₂ H ₂₉ O ₅ - H] ⁻	-2,91	----
383.16329	[C ₂₀ H ₂₈ O ₅ +Cl] ⁻	-0,57	(5β, 7α, 8α, 9β, 10α, 13α, 14R) -7,14-dihidróxi-15-oxokaur-16-en-19-óico (Figura 23)
387.18203	[C ₂₂ H ₂₇ O ₆ - H] ⁻	-2,10	----
399.15823	[C ₂₀ H ₂₈ O ₆ +Cl] ⁻	-0,59	(1β, 5β, 9ξ, 10α, 11α, 13α, 14S) -1,11,14,20-tetrahidróxi-7,20-epoxikaur-16-en-15-ona (Figura 24)
421.18788	[C ₂₂ H ₂₉ O ₈ - H] ⁻	-2,59	-----

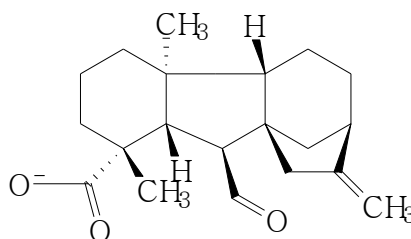
As estruturas químicas dos diterpenos presentes na amostra de OR de *Copaifera* spp., segundo a base de dados ChemSpider e também, de acordo com o estudo de Veiga Júnior e Pinto (2002), estão presentes nas Figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24.

Figura 14- Estrutura química do ácido *ent*-caura-16-eno-19-óico.



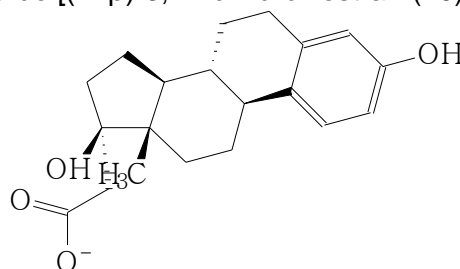
Fonte: Próprio autor. Programa: ChemWin.

Figura 15- Estrutura química do (1 α ,4 α ,4 β ,10 β)-10-formil-1,4a-dimetil-8 metilenogibbano-1-carboxilato.



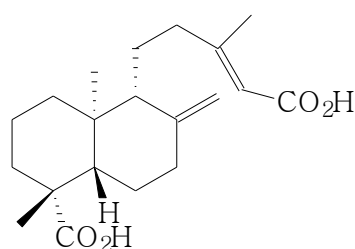
Fonte: Próprio autor. Programa: ChemWin.

Figura 16- Estrutura química do [(17 β)-3,17-dihidroxiestra-1(10),2,4-trien-17-il] acetato.



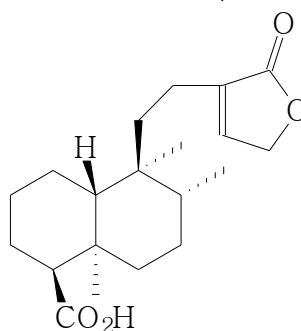
Fonte: Próprio autor. Programa: ChemWin.

Figura 17- Estrutura química do ácido *ent*-8(17),13-labdadieno-15,19-dióico (ácido *ent*-agático).



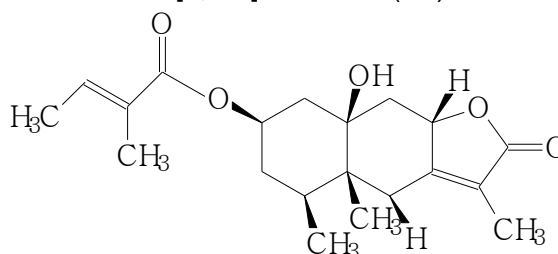
Fonte: Próprio autor. Programa: ChemWin.

Figura 18- Estrutura química do ácido 13-clerodeno-15,16-olídeo-18-óico.



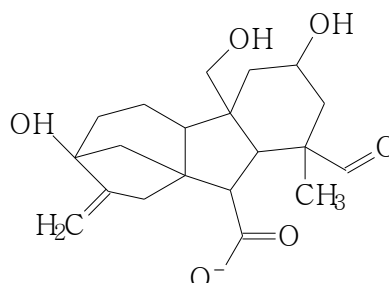
Fonte: Próprio autor. Programa: ChemWin.

Figura 19- Estrutura química do (4aR,5S,7R,8aS,9aS)-8a-hidróxi-3,4a, 5-trimetil-2-oxo-2,4,4a,5,6,7,8,8a,9,9a-decahidronafto[2,3-b]furano-7-il(2E)-2-metil-2 butenoato.



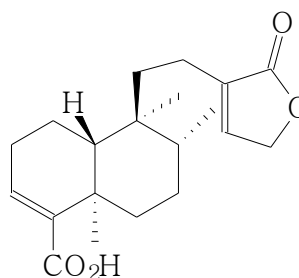
Fonte: Próprio autor. Programa: ChemWin.

Figura 20- Estrutura química do 1-formil-3,7-dihidróxi-4a-(hidróximetil)-1-metil-8-metilenogibbano-10-carboxilato.



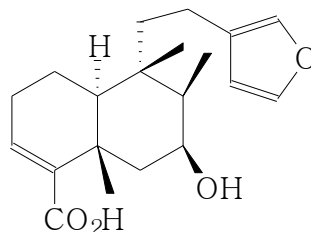
Fonte: Próprio autor. Programa: ChemWin.

Figura 21- Estrutura química do ácido 3,13-clerodadieno-15,16-olídeo-18-óico (ácido patagônico).



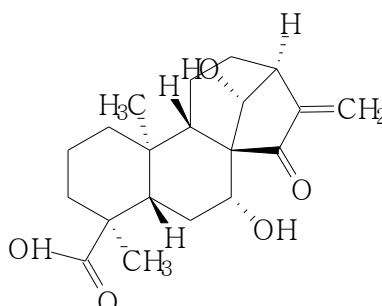
Fonte: Próprio autor. Programa: ChemWin.

Figura 22- Estrutura química do ácido *ent*-15,16-epóxi-7 β -hidróxi-3,13(16),14-clerodatrieno-18-óico (ácido 7-hidróxi-hardwíckiico).



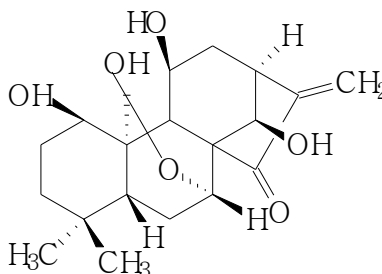
Fonte: Próprio autor. Programa: ChemWin.

Figura 23- Estrutura química do (5 β , 7 α , 8 α , 9 β , 10 α , 13 α , 14R) -7,14-dihidróxi-15-oxokaur-16-en-19-óico.



Fonte: Próprio autor. Programa: ChemWin.

Figura 24- Estrutura química do (1 β , 5 β , 9 ξ , 10 α , 11 α , 13 α , 14S) -1,11,14,20-tetrahidróxi-7,20-epoxikaur-16-en-15-ona.



Fonte: Próprio autor. Programa: ChemWin.

Segundo Veiga Júnior e Pinto (2002), os 28 diterpenos descritos nas OR de copaíba estudadas pertencem aos esqueletos caurano, labdano e clerodano. Somente dois cauranos foram descritos na literatura científica: ácido *ent*-caura-16-eno-19-óico, o qual foi também encontrado na amostra de estudo, e o ácido *ent*-16- β -caurano-19-óico. Pelo método de ESI(-) FT-ICR MS, utilizado neste trabalho, foi possível identificar mais dois cauranos na OR de *Copaifera* spp.: (5 β , 7 α , 8 α , 9 β , 10 α , 13 α , 14R) -7,14-dihidróxi-15-oxokaur-16-en-19-óico (Figura 23) e o (1 β , 5 β , 9 ξ , 10 α , 11 α , 13 α , 14S) -1,11,14,20-tetrahidróxi-7,20-epoxikaur-16-en-15-ona (Figura 24).

Como pode-se observar na Tabela 5, pelo método de ESI(-) FT-ICR MS, a mesma fórmula molecular (mesmo conjunto de átomos) pode ser sugestiva de dois

compostos diferentes, com arranjos distintos entre os átomos, o que denomina-se isômeros. Exemplo disso é a fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_4$, a qual pode ser o ácido *ent*-8(17),13-labdadieno-15,19-dióico (ácido *ent*-agático) (Figura 17) ou o ácido 13-clerodeno-15,16-olídeo-18-óico (Figura 18), e a fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_4$, a qual pode ser o ácido 3,13-clerodadieno-15,16-olídeo-18-óico (ácido patagônico) (Figura 21) ou o ácido *ent*-15,16-epóxi-7 β -hidróxi-3,13(16),14-clerodatrieno-18-óico (ácido 7-hidróxi-hardwíckiico) (Figura 22).

4.1.10 Desenvolvimento e validação do método de quantificação do marcador β -cariofileno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) é a técnica mais utilizada para identificar e quantificar compostos em frações voláteis (BONATO, 2006). No entanto, a CLAE pode tornar a análise facilitada em centros analíticos que não dispõem de equipamentos sofisticados como o espectrômetro de massas e ainda, segundo Jardim, Collins e Guimarães (2006), possibilitar análise de substâncias termolábeis. Porém, a restrição para a aplicação de CLAE, de acordo com Moreau, Preisig e Osman (1992), na análise de sesquiterpenos é inerente ao número limitado de detectores comumente disponíveis, mas o acoplamento com o detector de arranjo de diodos (Photodiodo Array-PDA) é bastante útil, o qual foi utilizado neste estudo.

Diante disso, para fins de controle de qualidade, o marcador químico desse estudo foi o β -cariofileno. Além de ser um dos compostos responsáveis pelas propriedades anti-inflamatória e antimicrobiana da copaíba, é um dos sesquiterpenos mais encontrados em análises com OR de copaíba (COLOMBO et al., 2011). Em se tratando do ponto de vista prático, atentou-se para a vantagem da disponibilidade do β -cariofileno como padrão comercializado, ao contrário do ácido copálico e de outros ácidos diterpênicos, os quais devem ser isolados. Contudo, a utilização dos dois padrões (sesquiterpenos e diterpenos) seria aconselhável para a obtenção de resultados quantitativos para os dois grupos de terpenos presentes na OR de copaíba.

4.1.10.1 Determinação das condições cromatográficas e *system suitability*

Antes de realizar experimentos de validação deve-se avaliar se o sistema utilizado para a análise é capaz de fornecer dados de qualidade aceitáveis. Esta avaliação é alcançada com experimentos de conformidade do sistema “*system suitability*”, que pode ser definida como um conjunto de testes para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis (RIBANI et al., 2004).

Os resultados da avaliação dos parâmetros de *system suitability* (resolução-Rs; fator de cauda-FT e número de pratos teóricos da coluna-N) referentes ao padrão β -cariofileno e a amostra (OR de *Copaifera* spp.) estão presentes na Tabela 6.

Tabela 6- Parâmetros de *system suitability* obtidos para os cromatogramas do padrão β -cariofileno e da amostra de oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.

Amostras	Rs	FT	N
Padrão β -cariofileno	----	1,11	53.025
OR de <i>Copaifera</i> spp.	2,717	1,08	51.729
Especificação da literatura*	> 2	≤ 2	> 2000

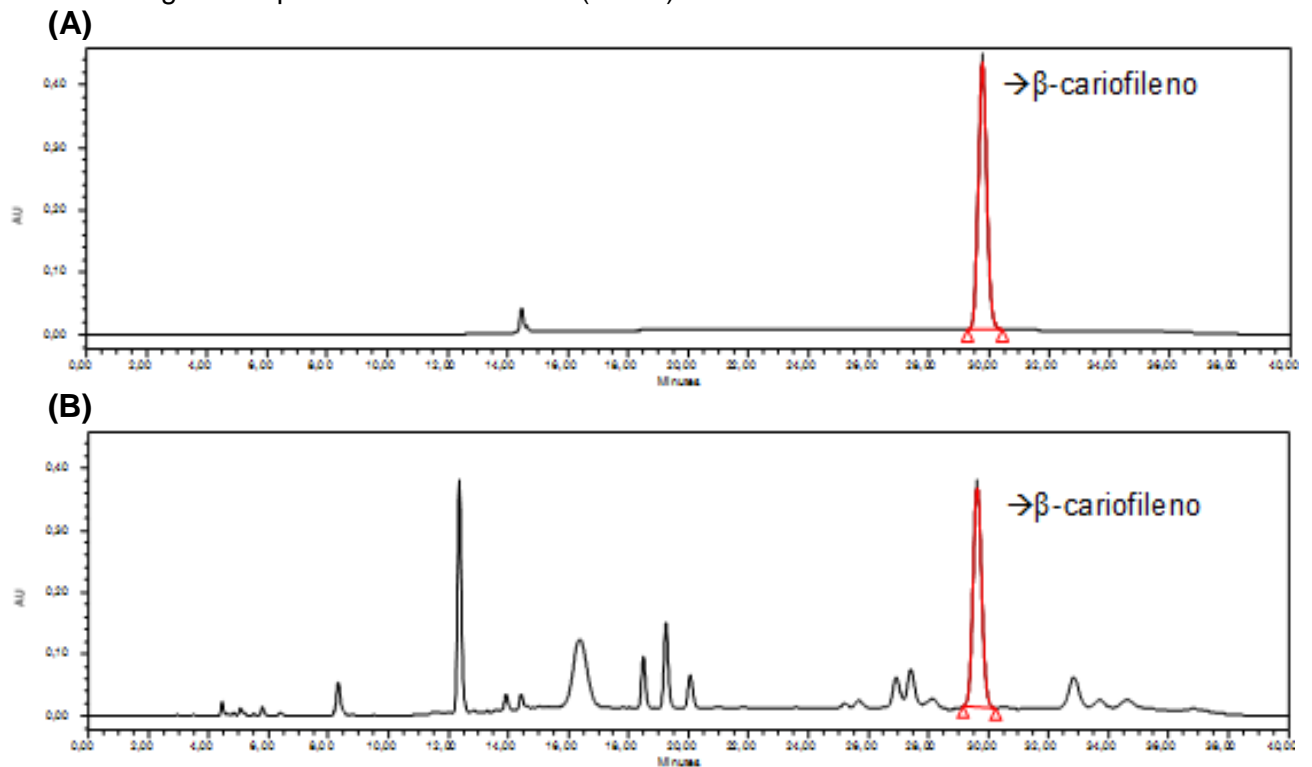
Legenda: Rs-resolução; FT-fator de cauda; N-número de pratos teóricos da coluna.

Fonte: CDER (1994); RIBANI et al. (2004).

Os dados encontrados sugerem que o sistema estava apto a gerar resultados com exatidão e precisão aceitáveis visto que, os mesmos estão de acordo com as especificações da FDA (1994) (CDER, 1994; RIBANI et al., 2004).

Os cromatogramas 2D obtidos da análise do padrão β -cariofileno e da amostra (OR de *Copaifera* spp.) nas condições cromatográficas estabelecidas estão na Figura 25.

Figura 25- Cromatogramas 2D obtidos da análise do padrão β -cariofileno e da amostra oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. nas condições cromatográficas estabelecidas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).



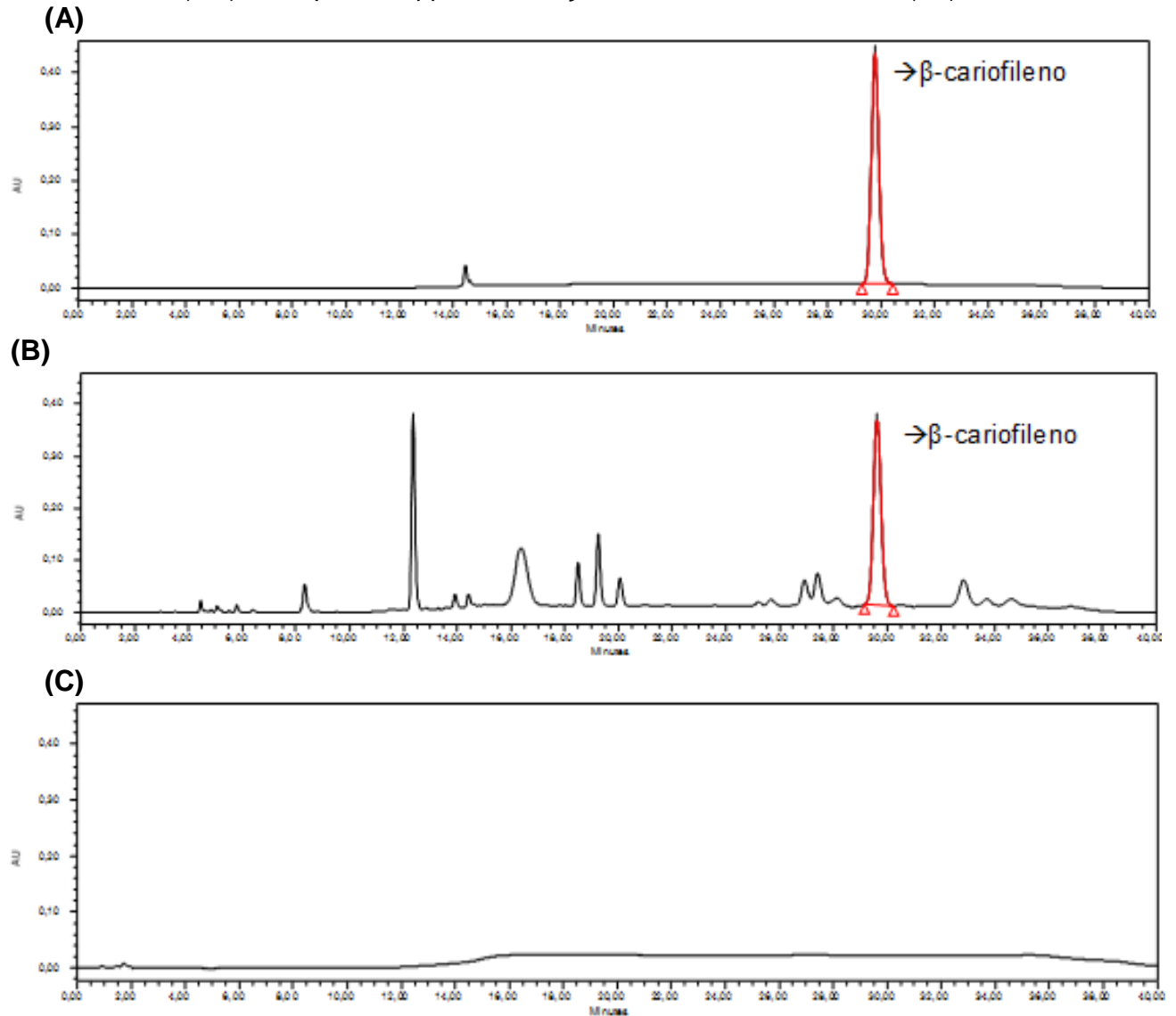
Legenda: (A)- Padrão β -cariofileno; (B)- Amostra de oleorresina de *Copaifera* spp.

4.1.10.2 Validação da metodologia analítica

Especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003), garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Caso esses parâmetros não sejam assegurados, a linearidade, exatidão e precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004).

Diante disso, a especificidade do método foi verificada pela injeção do diluente, e como se observa na Figura 26-C (cromatograma referente ao diluente), não há presença de qualquer pico interferente no tempo equivalente ao tempo de retenção do marcador β -cariofileno (Figura 26-A e 26-B), logo o método pode ser considerado específico.

Figura 26- Perfil cromatográfico 2D a 210nm do padrão β -cariofileno, da amostra de oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. e da solução diluente acetonitrila 75% (v/v).

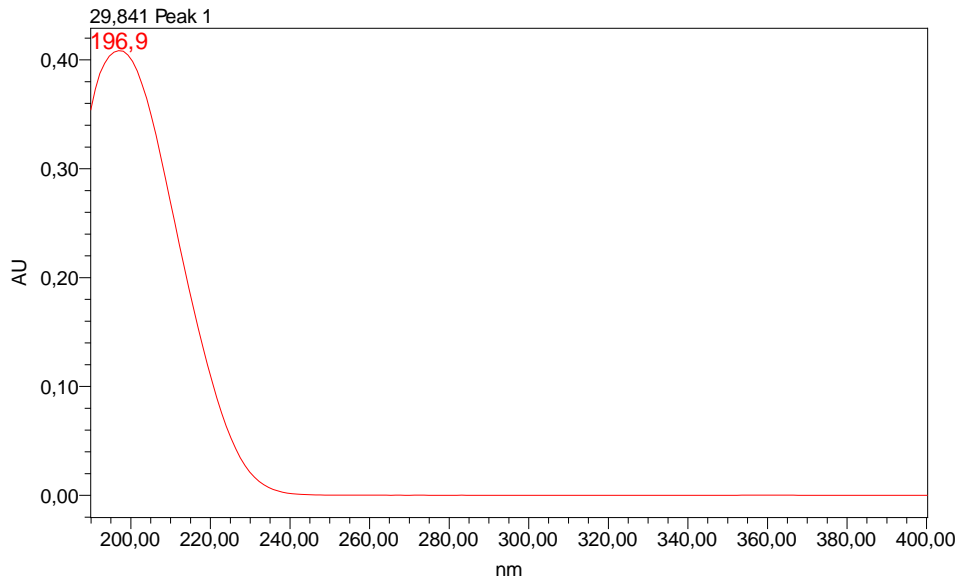


Legenda: (A)- Padrão β -cariofileno; (B)- Amostra oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.; (C)- Diluente acetonitrila 75% (v/v) grau HPLC).

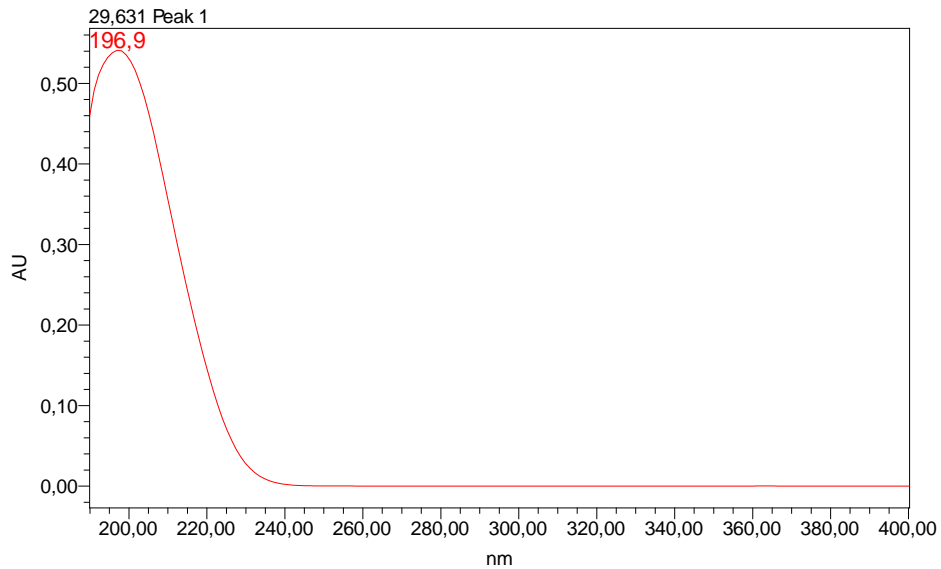
Outro indicativo da especificidade do método é a semelhança entre os espectros UV do pico do analito, comparando-se padrão e amostra, o que pode ser observado na Figura 27, a qual demonstra que o método proposto também pode ser considerado específico.

Figura 27- Espectro de absorção do β -cariofileno no padrão e na amostra de oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.

(A)

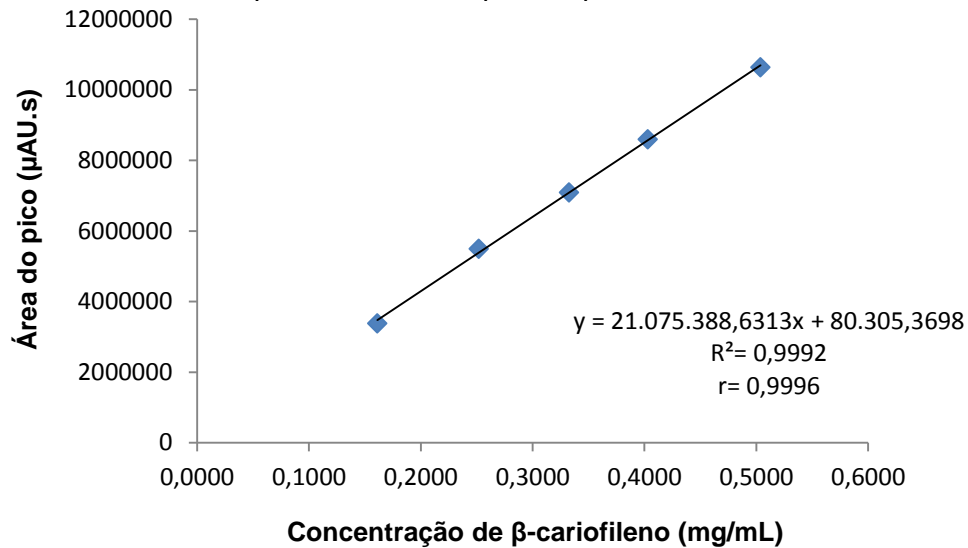


(B)



Legenda: **(A)**- β -cariofileno no padrão; **(B)**- β -cariofileno na amostra de oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.

Em relação a linearidade do padrão, o método mostrou-se linear, dentro do intervalo de concentração de 0,160 a 0,500mg/mL. A curva padrão média está representada pela Figura 28 e apresentou coeficiente de correlação (r) de 0,9996. Este valor está de acordo com as especificações da ANVISA (BRASIL, 2003) que estabelece como critério mínimo aceitável $r=0,99$ e, a equação da reta obtida foi $y=21.075.388,6313x + 80.305,3698$.

Figura 28- Linearidade: curva padrão média do padrão β -cariofileno.

Este resultado comprova a capacidade da metodologia utilizada em demonstrar que as áreas obtidas são diretamente proporcionais à concentração de β -cariofileno no padrão. Os dados referentes à triplicata dos pontos da curva padrão estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7- Áreas dos picos do padrão β -cariofileno obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a construção da curva padrão média.

Concentração teórica (mg/mL)	Área 1 (μ AU.s)	Área 2 (μ AU.s)	Área 3 (μ AU.s)	Área média (μ AU.s)	DP (%)	CV (%)
0,160	3298836	3343387	3513657	3385293,333	113376	3,3491
0,250	5638322	5302347	5566419	5502362,667	176910,2	3,2152
0,330	7032051	6856902	7392116	7093689,667	272879,1	3,8468
0,400	8458729	8622248	8728567	8603181,333	135925,7	1,5799
0,500	10314324	10965423	10664041	10647929,33	325848,4	3,0602

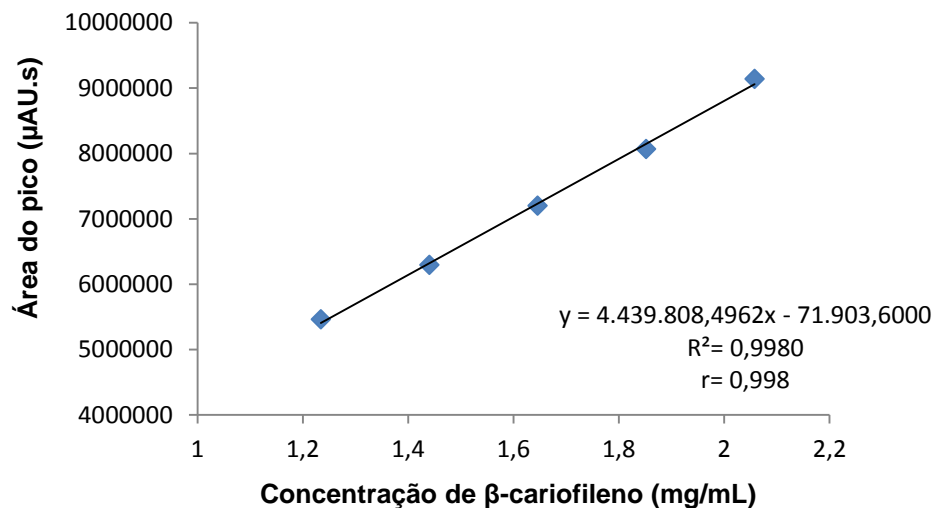
Legenda: DP- Desvio padrão; CV (%) - Coeficiente de Variação.

Segundo Oliveira (2013), quando se trabalha com substância padrão, a linearidade é mais provável de ocorrer, uma vez que não há efeitos de matriz, já que todo o sólido terá se dissolvido. O mesmo não pode ocorrer quando se trabalha com amostras complexas de origem vegetal em que, somente uma pequena parcela das mesmas se constitui dos analitos. Portanto, pode ocorrer que uma variação da quantidade de amostra não leve a uma variação linear da resposta, se os efeitos de

matriz forem pronunciados. Daí a importância da realização do teste de linearidade também para a amostra.

Contudo, para a amostra de OR de *Copaifera* spp., o método mostrou-se linear, dentro do intervalo de concentração de 1,23 a 2,05mg/mL. A curva padrão média da amostra de OR de *Copaifera* spp. está representada pela Figura 29, em que apresentou coeficiente de correlação (r) de 0,998 estando também de acordo com as especificações da ANVISA (BRASIL, 2003) e, a equação da reta obtida foi $y = 4.439.808,4962x - 71.903,6000$.

Figura 29- Linearidade: curva padrão média da amostra de oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.



Este resultado comprova a capacidade da metodologia utilizada em demonstrar que as áreas obtidas são diretamente proporcionais à concentração de β-cariofileno na amostra de OR de *Copaifera* spp. Os dados referentes à triplicata dos pontos da curva padrão estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8- Áreas dos picos da amostra de oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a construção da curva padrão média.

Concentração teórica (mg/mL)	Área 1 (µAU.s)	Área 2 (µAU.s)	Área 3 (µAU.s)	Área média (µAU.s)	DP (%)	CV (%)
1,23	5556664	5320210	5511839	5462904,333	125592,9	2,2990
1,44	6275091	6241180	6370730	6295667	67181,32	1,0671
1,64	7095578	7136265	7383426	7205089,667	155777,9	2,1621
1,85	8003930	7862089	8354182	8073400,333	253295,2	3,1374
2,05	8996994	9098647	9328165	9141268,667	169649,7	1,8559

Legenda: DP- Desvio padrão; CV (%)- Coeficiente de Variação.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) da amostra de OR de *Copaifera* spp. foram de 0,2188 e 0,7293mg/mL, respectivamente, o que indicam que a metodologia possui sensibilidade instrumental adequada para β -cariofileno.

A repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficiente de variação (CV%) de 0,4074 e 4,4944 respectivamente, os quais podem ser visualizados nas Tabelas 9 e 10. Os valores obtidos comprovam a precisão do método desenvolvido tanto em nível de repetibilidade quanto em nível de precisão intermediária, uma vez que o coeficiente de variação entre os resultados das replicatas realizadas foram <5%, conforme especificação da ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 9- Repetibilidade do método analítico para doseamento de β -cariofileno na amostra de oleoresina (OR) de *Copaifera* spp.

Análise	Concentração experimental (mg/mL)	Área (μAU.s)	Teor (%)	Teor Médio (%)	DP (%)	CV (%)
1	0,3316	7068344	20,2896			
2	0,3383	7209102	20,5375			
3	0,3354	7148302	20,4032	20,4341	0,0832	0,4074
4	0,3369	7181508	20,4456			
5	0,3371	7184476	20,4554			
6	0,3382	7208472	20,4735			

Legenda: DP- Desvio padrão; CV (%) - Coeficiente de Variação.

Tabela 10- Precisão intermediária do método analítico para doseamento de β -cariofileno na amostra de oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.

Análise	Concentração experimental (mg/mL)	Área (μAU.s)	Teor (%)	Teor Médio (%)	DP (%)	CV (%)
1	0,3316	7068344	20,2896			
2	0,3383	7209102	20,5375			
3	0,3354	7148302	20,4032			
4	0,3369	7181508	20,4456			
5	0,3371	7184476	20,4554			
6	0,3382	7208472	20,4735			
7	0,3266	6964191	18,3914	19,9011	0,8944	4,4944
8	0,3146	6711571	17,9592			
9	0,3468	7389055	19,7040			
10	0,3508	7474222	20,7839			
11	0,3380	7204402	19,9075			
12	0,3203	6831865	19,4625			

Legenda: DP- Desvio padrão; CV (%) - Coeficiente de Variação

Os resultados obtidos para a determinação da exatidão estão na Tabela 11. O percentual de recuperação médio variou de 103,1964 a 104,9952% comprovando que o método desenvolvido é exato.

Tabela 11- Determinação da exatidão por meio da recuperação da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.

%	Concentração teórica (mg/mL)	Área (μAU.s)	Concentração experimental (mg/mL)	Recuperação (%)	Média (%)	CV (%)
80%	0,2443	5556664	0,2598	106,3550		
80%	0,2451	5320210	0,2486	101,4353	103,9569	2,3685
80%	0,2476	5511839	0,2577	104,0804		
100%	0,3257	7095578	0,3329	102,1833		
100%	0,3268	7136265	0,3348	102,4455	103,1964	1,4858
100%	0,3301	7383426	0,3465	104,9605		
120%	0,4072	8996994	0,4231	103,9047		
120%	0,4085	9098647	0,4279	104,7514	104,9952	1,1722
120%	0,4127	9328165	0,4388	106,3296		

Legenda: CV (%) - Coeficiente de Variação

Em relação ao parâmetro robustez, o método em questão mostrou-se robusto para os parâmetros analíticos avaliados: temperatura da coluna, vazão da fase móvel e composição da fase móvel. Os valores de coeficiente de variação encontrados foram baixos (<5%) e os resultados obtidos estão na Tabela 12.

Tabela 12- Resultados da robustez do método para doseamento de β -cariofileno na amostra de oleorresina (OR) de *Copaifera* spp.

Condição	Área 1 (μ AU.s)	Área 2 (μ AU.s)	Área 3 (μ AU.s)	Área Média (μ AU.s)	CV (%)
Método Desenvolvido	7299548	7169841	7509240	7326209,67	1,7573
T=28°C	7069101	7477421	7187968	7244830	1,8736
T=32°C	7090594	7482001	7269345	7280646,67	1,8596
Vazão FM: 0,98mL/min	7184363	7557841	7137167	7293123,67	1,9448
Vazão FM:1,02mL/min	6646822	7284153	6937235	6956070	3,6939
FM= 68% (Solvente A)	7242665	7157493	7518474	7306210,67	1,9486
FM= 72% (Solvente A)	7208760	7131660	7472002	7270807,33	1,8176

Legenda: FM-Fase Móvel; T- Temperatura; CV-Coeficiente de Variação; Solvente A- acetonitrila acidificada com ácido fosfórico à 0,2%.

Por fim, a validação da metodologia foi específica, linear, precisa aos níveis de repetibilidade e precisão intermediária, exata e robusta, e o teor de β -cariofileno encontrado foi de 19,90% (m/m). Sendo assim, a técnica CLAE para sesquiterpenos, em especial para β -cariofileno, pode ser utilizada no controle de qualidade de OR de *Copaifera* spp.

4.1.11 Co-validação da metodologia analítica para o óleo essencial (OE) de *Copaifera* spp.

A co-validação, também chamada de revalidação por alguns autores, faz-se necessária quando a proposta e/ou nível de qualidade desejado do método são alterados, quando o procedimento é modificado, ou até mesmo quando um método é usado novamente após certo período de tempo (RIBANI et al., 2004).

Os resultados da avaliação dos parâmetros de *system suitability* (resolução-Rs; fator de cauda-FT e número de pratos teóricos da coluna-N) referentes a co-validação da metodologia na matriz OE de *Copaifera* spp. estão presentes na Tabela 13.

Tabela 13- Parâmetros de *system suitability* obtidos para os cromatogramas do padrão β -cariofileno e da amostra de óleo essencial (OE) de *Copaifera* spp.

Amostras	Rs	FT	N
Padrão β -cariofileno	----	1,11	53.025
OE de <i>Copaifera</i> spp.	2,870	0,98	50.554
Especificação da literatura*	> 2	≤ 2	> 2000

Legenda: Rs-resolução; FT-fator de cauda; N-número de pratos teóricos da coluna.

Fonte: CDER (1994); RIBANI et al. (2004).

Os dados encontrados sugerem que o sistema está apto a gerar resultados com exatidão e precisão aceitáveis, visto que os mesmos estão de acordo com as especificações da FDA (1994) (CDER, 1994; RIBANI et al., 2004).

Como se observa na Figura 30-C, o cromatograma referente ao diluente demonstra a ausência de qualquer pico interferente no tempo equivalente ao tempo de retenção do marcador β -cariofileno (Figura 30-A e 30-B), assim o método pode ser considerado específico.

Outro indicativo da especificidade do método é a semelhança entre os espectros UV dos picos de cada analito, comparando-se padrão e amostra, o que pode ser observado na Figura 31, a qual demonstra que o método proposto pode ser considerado específico.

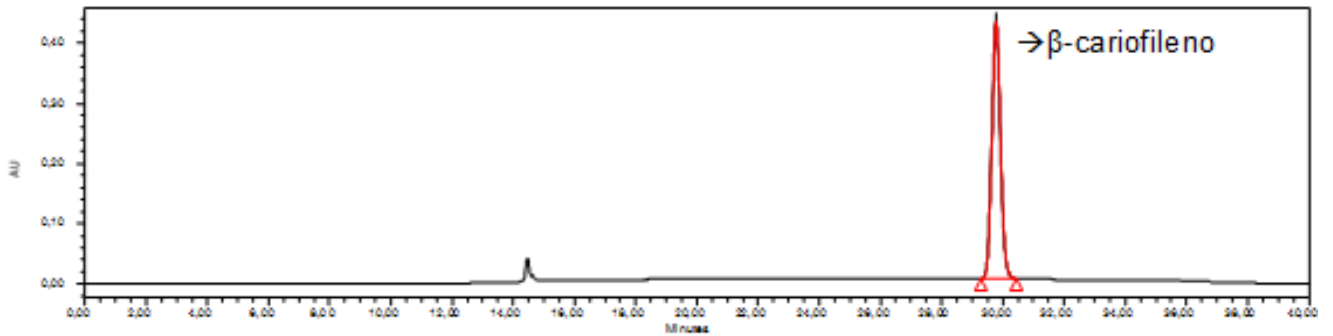
Para a amostra de OE de *Copaifera* spp., a qual é uma matriz complexa, a linearidade também foi realizada, com o intuito de verificar se a variação da quantidade de amostra levaria a uma variação linear da resposta.

Contudo, o método mostrou-se linear, dentro do intervalo de concentração de 0,6 a 1,0mg/mL. A curva padrão média da amostra de OE de *Copaifera* spp. está apresentada na Figura 32 e tem coeficiente de correlação (r) de 0,998, o qual está de acordo com as especificações da ANVISA (BRASIL, 2003), sendo que a equação da reta obtida foi $y = 8.537.496,2312x - 370.718,6667$.

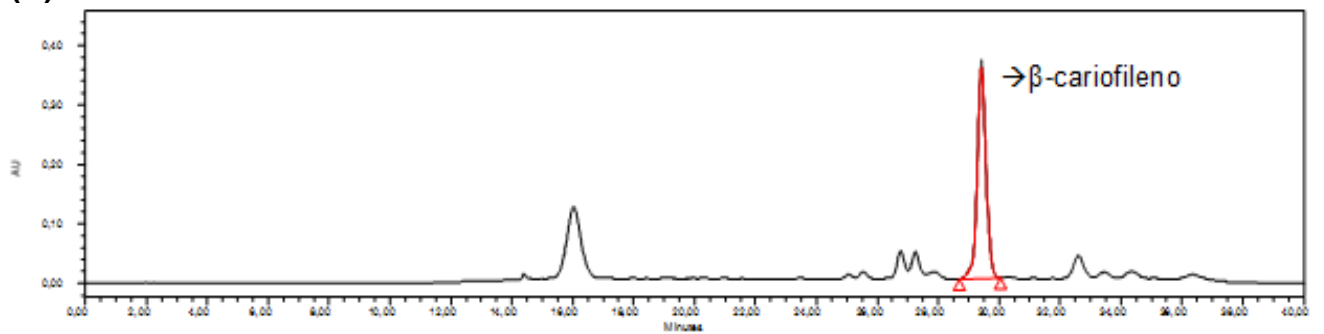
Este resultado comprova a capacidade da metodologia utilizada em demonstrar que as áreas obtidas são diretamente proporcionais à concentração de β -cariofileno na amostra de OE de *Copaifera* spp. Os dados referentes à triplicata dos pontos da curva padrão estão dispostos na Tabela 14.

Figura 30- Perfil cromatográfico 2D a 210nm do padrão β -cariofileno, da amostra de óleo essencial (OE) de *Copaifera* spp. e da solução diluente acetonitrila 75% (v/v).

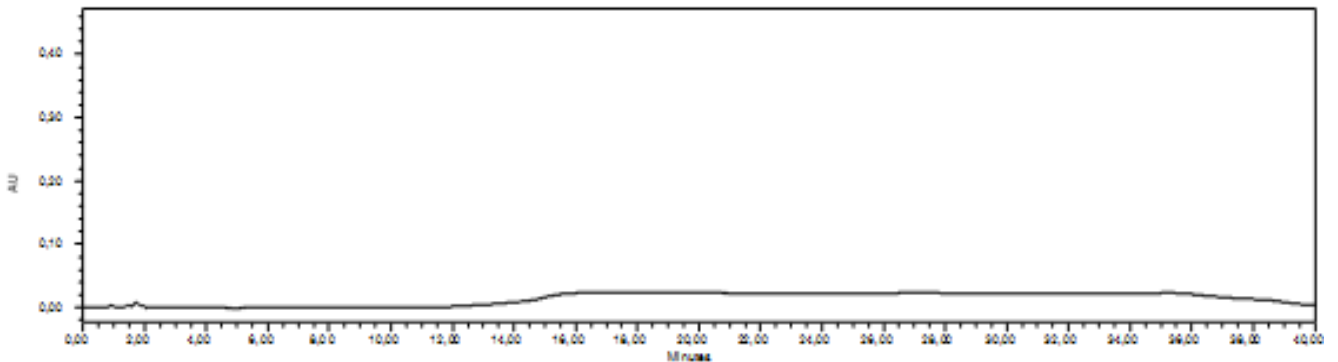
(A)



(B)



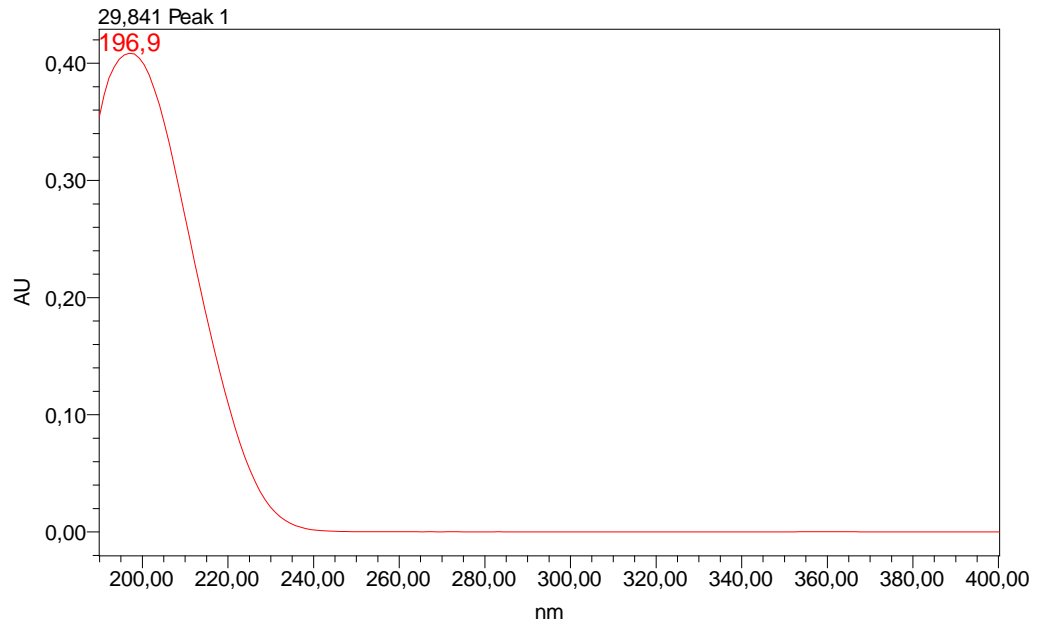
(C)



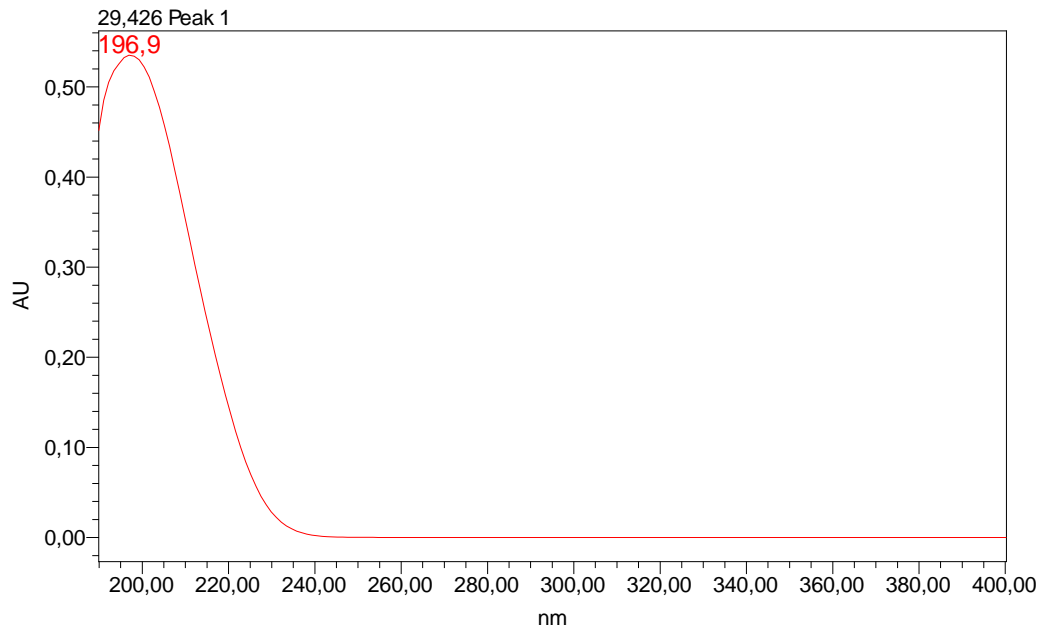
Legenda: (A)- Padrão β -cariofileno; (B)- Amostra de óleo essencial de *Copaifera* spp.; (C)- Diluente acetonitrila 75% (v/v) grau HPLC.

Figura 31- Espectro de absorção do β -cariofileno no padrão e na amostra de óleo essencial (OE) de *Copaifera* spp.

(A)



(B)



Legenda: **(A)**- β -cariofileno no padrão; **(B)**- β -cariofileno na amostra de óleo essencial de *Copaifera* spp.

Figura 32- Linearidade: curva padrão média da amostra de óleo essencial (OE) de *Copaifera* spp.

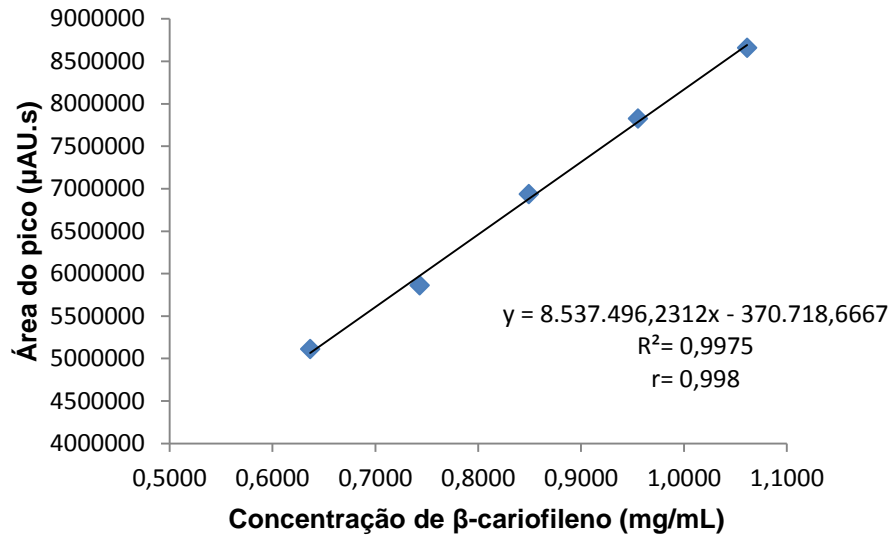


Tabela 14- Áreas dos picos da amostra de óleo essencial (OE) de *Copaifera* spp. obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a construção da curva padrão média.

Concentração teórica (mg/mL)	Área 1 (μ AU.s)	Área 2 (μ AU.s)	Área 3 (μ AU.s)	Área média (μ AU.s)	DP (%)	CV (%)
0,6	5011199	4967378	5356079	5111552	212897,0651	4,1650
0,7	5830258	5587924	6160670	5859617,333	287499,5182	4,9065
0,8	6882398	6683232	7237208	6934279,333	280608,458	4,0467
0,9	7786099	7564433	8130768	7827100	285385,0812	3,6461
1,0	8619087	8373647	8982392	8658375,333	306268,3441	3,5372

Legenda: DP- Desvio padrão; CV (%)- Coeficiente de Variação.

A repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficiente de variação (CV%) de 0,2889 e 1,4506, respectivamente, os quais podem ser visualizados nas Tabelas 15 e 16. Os valores obtidos comprovam a precisão do método desenvolvido tanto em nível de repetibilidade quanto em nível de precisão intermediária, uma vez que o coeficiente de variação entre os resultados das replicatas realizadas foram <5%, conforme especificação da ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 15- Repetibilidade do método analítico para doseamento de β -cariofileno na amostra de óleo essencial (OE) de *Copaifera* spp.

Análise	Concentração experimental (mg/mL)	Área (μ AU.s)	Teor (%)	Teor Médio (%)	DP (%)	CV (%)
1	0,3140	6697968	38,1496			
2	0,3147	6713408	37,9619			
3	0,3144	6706857	38,0161	37,9826	0,1097	0,2889
4	0,3142	6702596	38,0376			
5	0,3113	6641937	37,8726			
6	0,3108	6630800	37,8576			

Legenda: DP- Desvio padrão; CV (%)- Coeficiente de Variação.

Tabela 16- Precisão intermediária do método analítico para doseamento de β -cariofileno na amostra de óleo essencial (OE) de *Copaifera* spp.

Análise	Concentração experimental (mg/mL)	Área (μ AU.s)	Teor (%)	Teor Médio (%)	DP (%)	CV (%)
1	0,3140	6697968	38,1496			
2	0,3147	6713408	37,9619			
3	0,3144	6706857	38,0161			
4	0,3142	6702596	38,0376			
5	0,3113	6641937	37,8726			
6	0,3108	6630800	37,8576			
7	0,3103	6620645	38,6506	38,4824	0,5582	1,4506
8	0,3132	6681468	38,7628			
9	0,3140	6697724	38,8103			
10	0,3148	6714250	39,2038			
11	0,3155	6729206	39,2912			
12	0,3145	6709392	39,1750			

Legenda: DP- Desvio padrão; CV (%)- Coeficiente de Variação.

Enfim, a co-validação da metodologia foi específica, linear e precisa aos níveis de repetibilidade e precisão intermediária, e o teor de β -cariofileno encontrado foi de 38,48% (m/m). Sendo assim, a técnica CLAE para sesquiterpenos, em especial para β -cariofileno, pode ser utilizada no controle de qualidade de OE de *Copaifera* spp.

4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

4.2.1 Coleta das amostras de leite

No mês de agosto de 2012, 37 vacas leiteiras foram submetidas ao teste da caneca de fundo telado e CMT, sendo que 13 estavam saudáveis, uma apresentou mastite clínica e 23 eram portadoras de mastite subclínica que variou de grau I a III. Destas últimas, 16 vacas apresentaram quartos mamários com mastite subclínica de grau III, tendo sido coletado leite de 22 tetos para a avaliação microbiológica.

Já no mês de fevereiro de 2013, 40 animais foram submetidos aos testes supracitados, sendo que 20 estavam saudáveis e 20 apresentaram mastite subclínica que variou de grau I a III. Destas últimas, 8 vacas apresentaram quartos mamários com mastite subclínica de grau III, tendo sido coletadas amostras de leite de 14 tetos para avaliação microbiológica.

Segundo Ribeiro et al. (2003), o CMT é um dos testes mais utilizado para avaliar a sanidade da glândula mamária e diagnosticar a mastite subclínica. No presente estudo, demonstrou ser prático, simples, eficiente e de fácil interpretação. De acordo com Brito e Sales (2007), a desvantagem do CMT é que ele permite apenas estimar o conteúdo de células somáticas e isso é feito de forma subjetiva, o que exige da pessoa treinamento e sensatez na leitura e interpretação dos resultados.

Neste trabalho, toda a amostra de leite colhida de vacas diagnosticadas com mastite subclínica grau III foi positiva para crescimento microbiano. De acordo com Ribeiro et al. (2003), quando se faz diagnóstico para mastite utilizando-se o teste de CMT deve-se atentar para os casos de reação positiva no CMT e cultura bacteriana negativa. De acordo com Oliveira (2006), nestes casos a natureza da mastite subclínica pode não ser infecciosa e sim, inflamatória, em decorrência de lesões traumáticas ou do uso de produtos químicos, o que não ocorreu no presente trabalho.

Segundo Costa (2006), a mastite de origem infecciosa é a mais importante, por ser contagiosa e apresentar baixa percentagem de cura espontânea, podendo evoluir para um quadro de septicemia e, em alguns casos, levar o animal acometido à morte.

4.2.2 Caracterização fenotípica de micro-organismos isolados de mastite bovina subclínica grau III

Coletou-se amostras de leite de 36 tetos para avaliação microbiológica. Após cultivo, não houve proliferação de leveduras, porém 60 bactérias foram identificadas,

sendo as bactérias *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) e *S. aureus* as mais frequentes, conforme descrito na Tabela 17.

Tabela 17- Total de bactérias isoladas de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica grau III no mês de agosto de 2012 e fevereiro de 2013.

MICRO-ORGANISMOS	FA	FR
Gênero <i>Staphylococcus</i>		
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (SCN)	22	36,7%
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (SCP)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	26,7%
<i>Staphylococcus schleiferi schleiferi</i>	03	5,0%
<i>Staphylococcus hyicus</i>	02	3,3%
<i>Staphylococcus schleiferi coagulans</i>	02	3,3%
<i>Staphylococcus intermedius</i>	01	1,7%
<i>Corynebacterium</i> spp.	04	6,7%
<i>Streptococcus</i> do grupo C,F,G	03	5,0%
<i>Escherichia coli</i>	02	3,3%
Bactérias isoladas com baixa frequência em mastite	05	8,3%
TOTAL	60	100%

Legenda: FA- Frequência Absoluta; FR- Frequência Relativa.

De acordo com a Tabela 17, os micro-organismos isolados com baixa frequência de amostras de leite de vacas leiteiras diagnosticadas com mastite foram *Leuconostoc* spp. (02), *Acinetobacter* spp. (01), *Sphingomonas paucimobilis* (01) e *Stomatococcus* spp. (1).

Segundo Brito, Campos e Brito (2002), bactérias do gênero *Staphylococcus* destacam-se na etiologia das infecções intramamárias do gado leiteiro no Brasil e isso pode ser observado nos resultados encontrados, o que corrobora com o trabalho de Mota et al. (2012) em que, 58,4% das bactérias isoladas no Estado de Pernambuco em caso de mastite foram classificadas em SCN seguido de 28,9% de *S.aureus*.

Porém, nem sempre isso ocorre, como relatado no trabalho de Martins et al. (2010), que encontraram na microrregião de Cuiabá, maior prevalência nos casos de mastite subclínica *Corynebacterium* spp. (27,6%) seguido de *S. aureus* (21,5%). Esta

variação de agente etiológicos pode estar relacionada aos fatores higiênicos, ambientais, tipo de manejo e sazonais de cada propriedade, o que reafirma a complexidade dessa enfermidade e seu aspecto multifatorial.

Com relação aos SCN, os quais são considerados patógenos secundários que causam, em geral, reação inflamatória moderada na glândula mamária (BRITO; CAMPOS; BRITO, 2002) e foram os agentes etiológicos isolados com maior frequência neste estudo, tem sido relatados como isolados comuns nos casos de mastite bovina no Brasil e em muitos países, como no trabalho de Oliveira et al. (2011), em que a frequência do agente foi de 25% e 32,3% em mastite clínica e subclínica, respectivamente. Logo, de acordo com Mota et al. (2012), os SCN poderiam ser considerados patógenos emergentes.

Martins et al. (2010) e Zafalon et al. (2008) enfatizaram o *S. aureus* como o principal patógeno causador da mastite bovina em infecções clínicas e subclínicas. Apesar do *S. aureus* não ter sido o mais frequente neste estudo, a sua frequência também foi alta, o que o torna um agente importante na etiologia da doença

A alta frequência de *S. aureus* nos casos de mastite pode ser explicada pelo fato de que a pele do úbere e dos tetos são os principais sítios de localização desses agentes, o que acaba facilitando as infecções por esse micro-organismo (HIRSH; ZEE, 2003), além de poder ser transmitido entre as vacas antes, durante e após a ordenha, em decorrência das más condições de higiene do ambiente e do ordenhador.

Entre os patógenos ambientais, destacam-se a *Escherichia coli*, a qual foi isolada no período de coleta que ocorreu na época chuvosa. De acordo com Dantas et al. (2009), o período chuvoso propicia o acúmulo de esterco com urina, lama ou água contaminada no ambiente, o que contribui para a proliferação de enteropatógenos.

Segundo Ferreira et al. (2007), para as mastites ambientais, o controle depende principalmente da conscientização do produtor em relação à higiene tanto das instalações como da ordenha e manejo, pelo fato de os agentes estarem presentes no ambiente onde vivem os animais.

4.3 TESTES DE SUSCETIBILIDADES

4.3.1 Atividade antimicrobiana *in vitro*

4.3.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Segundo Nascimento et al. (2007), para a realização de testes que visam verificar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais, é necessário definir e adotar uma metodologia adequada e padronizada. Logo, a técnica de microdiluição em caldo MH, utilizada no presente estudo para verificar a atividade antimicrobiana do OE, bem como da OR de *Copaifera* spp., de acordo com o CLSI (2003), foi de fácil execução e interpretação, mostrando-se eficiente para a proposta do presente estudo. De acordo com Nascimento et al. (2007), os testes de CIM pelo método de diluição são mais confiáveis, pois disponibilizam dados quantitativos, ao contrário do teste de difusão em ágar, o qual se constitui em um método qualitativo.

O protocolo experimental proposto contou com três controles, sendo um para o crescimento bacteriano (coluna 12), outro para a esterilidade da matéria-prima vegetal e do caldo MH (linha G), e por fim, outro para o DMSO (linha H) (Figura 7). Foi possível observar que em todos os ensaios houve crescimento bacteriano na coluna 12, ao contrário da linha G, que em todos os ensaios não houve crescimento bacteriano, demonstrando que a matéria-prima vegetal e o caldo MH não estavam contaminados.

Já na linha H, o objetivo era verificar se o DMSO a 10%, agente emulsificante, iria interferir no crescimento bacteriano. De acordo com os resultados obtidos, não houve interferência, ou seja, houve crescimento bacteriano mesmo na presença do DMSO. De acordo com Janssen, Scheffer e Baerheim Svendsen (1987), o agente emulsificador está sujeito a possíveis interações com a substância em teste, bem como, possuir atividade antimicrobiana. Porém, esses efeitos podem ser acentuados ou minimizados dependendo do modo de preparo da solução óleo-agente emulsificador. Por isso, preconiza-se uma relação adequada entre os mesmos.

A atividade antimicrobiana do OE e da OR de *Copaifera* spp. foi realizada frente aos SCP (*S. aureus*, *S. schleiferi schleiferi*, *S. hyicus*, *S. schleiferi coagulans* e *S. intermedius*), SCN, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* do grupo C, F, G e *Escherichia coli*. Para os micro-organismos classificados em *Leuconostoc* spp., *Acinetobacter* spp., *Sphingomonas paucimobilis* e *Stomatococcus* spp., o teste de CIM não foi realizado, pois são agentes etiológicos isolados com baixa frequência na mastite bovina.

De acordo com Holetz et al. (2002), a atividade antimicrobiana é considerada boa quando a amostra apresenta $CIM \leq 100 \mu\text{g/mL}$, moderada $100 < CIM \leq 500 \mu\text{g/mL}$, fraca $500 < CIM \leq 1000 \mu\text{g/mL}$ e inativa $CIM > 1000 \mu\text{g/mL}$.

Para os isolados de *S. aureus* foi verificado valores de CIM do OE de *Copaifera* spp. de $1000 \mu\text{g/mL}$ para 37,5% (6/16) e $>1000 \mu\text{g/mL}$ para 62,5% (10/16). Em relação ao *S. schleiferi schleiferi* (3/3), ao *S. hyicus* (2/2), *S. schleiferi coagulans* (2/2) e *S. intermedius* (1/1) o CIM foi $>1000 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 18).

Ao avaliar as suscetibilidades dessas mesmas bactérias em relação à OR de *Copaifera* spp., o CIM foi $<100 \mu\text{g/mL}$ para 87,5% (14/16) dos *S. aureus*, com exceção de dois isolados, o *S. aureus* de número (9) e (10), em que o CIM foi de $125 \mu\text{g/mL}$ e $500 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em relação ao *S. schleiferi schleiferi* (3/3), *S. hyicus* (2/2), *S. schleiferi coagulans* (1/2) e *S. intermedius* (1/1), o CIM foi $<100 \mu\text{g/mL}$, com exceção do *S. schleiferi coagulans* de número (2) que o CIM foi $250 \mu\text{g/mL}$, como pode ser observado na Tabela 18.

Portanto, a atividade antimicrobiana da OR de *Copaifera* spp. frente aos SCP foi considerada boa em 87,5% (21/24) das amostras, ao contrário do OE de *Copaifera* spp., o qual não apresentou efeito em 75% (18/24) dos isolados. Logo, os SCP apresentaram sensibilidade maior frente a OR do que ao OE de *Copaifera* spp. (Figura 33).

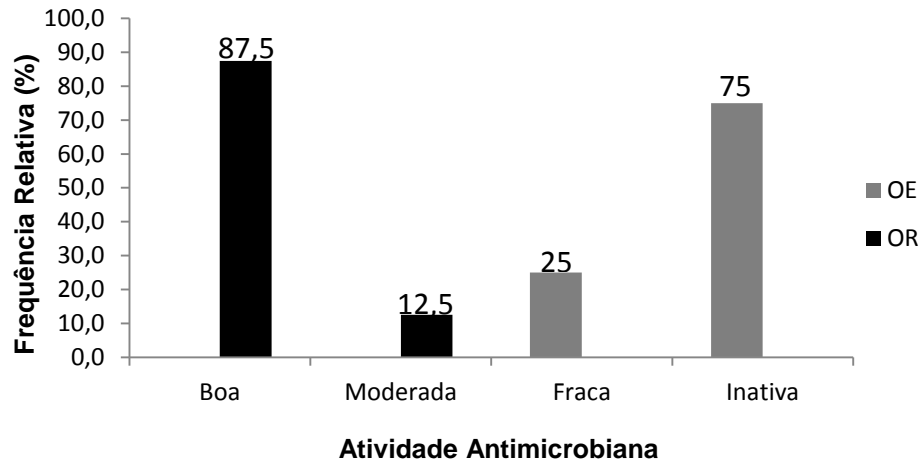
Esses resultados corroboram com o trabalho de Santos et al. (2008b), em que as OR das espécies *Copaifera martii*, *Copaifera officinalis* e *Copaifera reticulata* exibiram boa atividade antibacteriana (CIM de $31,3-62,5 \mu\text{g/mL}$) contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. aureus* resistente a metilicina, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, e *Enterococcus faecalis*), com diminuição da viabilidade dessas bactérias em 3 horas. Entretanto, no presente trabalho, a amostra utilizada era um *pool* de OR *Copaifera* spp. não sendo possível identificar as espécies envolvidas na atividade antimicrobiana.

Já no estudo de Packer e Luz (2007), a OR não demonstrou inibição frente à *S. Aureus* (ATCC 6538). Analisando a susceptibilidade já conhecida do *S. aureus* em relação à copaíba, devido à outros estudos científicos, os mesmos sugerem como motivo para a ausência de inibição a possível degradação dos compostos antimicrobianos presentes na OR. Outra razão, de acordo com Pieri et al. (2012), pode ser a composição específica da OR, a qual poderia naturalmente ter quantidades menores de substâncias com atividade antimicrobiana frente à esta bactéria.

Tabela 18- Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. frente aos *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.

Micro-organismos	CIM (µg/mL)	
SCP	OE de <i>Copaifera</i> spp.	OR de <i>Copaifera</i> spp.
<i>S. aureus</i>		
(1)	1000	31,25
(2)	>1000	15,62
(3)	>1000	15,62
(4)	>1000	15,62
(5)	1000	7,81
(6)	>1000	7,81
(7)	>1000	31,25
(8)	>1000	15,62
(9)	>1000	125
(10)	>1000	500
(11)	1000	7,81
(12)	>1000	31,25
(13)	1000	7,81
(14)	1000	1,95
(15)	1000	31,25
(16)	>1000	15,62
<i>S. schleiferi schleiferi</i>		
(1)	>1000	62,5
(2)	>1000	62,5
(3)	>1000	62,5
<i>S. hyicus</i>		
(1)	>1000	62,5
(2)	>1000	31,25
<i>S. schleiferi coagulans</i>		
(1)	>1000	31,25
(2)	>1000	250
<i>S. intermedius</i>		
(1)	>1000	31,25

Figura 33- Atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. frente aos *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.



Ao observar a Tabela 18 foi possível verificar que, o perfil de sensibilidade entre as amostras de uma mesma espécie bacteriana apresentou variações. De acordo com Braga e Silva (2007), isso está relacionado aos fatores genéticos intrínsecos das bactérias, da pressão seletiva exercida pelo meio onde foram cultivadas e à origem dos isolados pesquisados.

Quanto aos SCN, a CIM do OE de *Copaifera* spp. foi $<100\mu\text{g/mL}$ para 9,1% (02/22) das amostras, de $125\mu\text{g/mL}$ para 9,1% (02/22), de $1000\mu\text{g/mL}$ para 22,7% (05/22) e para as demais, 59,1% (13/22), o CIM foi $>1000\mu\text{g/mL}$ (Tabela 19).

Com relação à suscetibilidade dessas mesmas bactérias à OR de *Copaifera* spp., o CIM foi $<100\mu\text{g/mL}$ para 40,9% (9/22), de $1000\mu\text{g/mL}$ para 31,8% (7/22) e $>1000\mu\text{g/mL}$ para as restantes, 27,3% (6/22) (Tabela 19).

Logo, frente aos SCN, o OE de *Copaifera* spp. apresentou boa atividade antimicrobiana em 9,1% (02/22) dos isolados porém, foi a OR de *Copaifera* spp. que teve um melhor efeito antimicrobiano em 40,9% (09/22) das amostras. Portanto, os SCN tiveram uma sensibilidade maior frente a OR do que ao OE de *Copaifera* spp. (Figura 34).

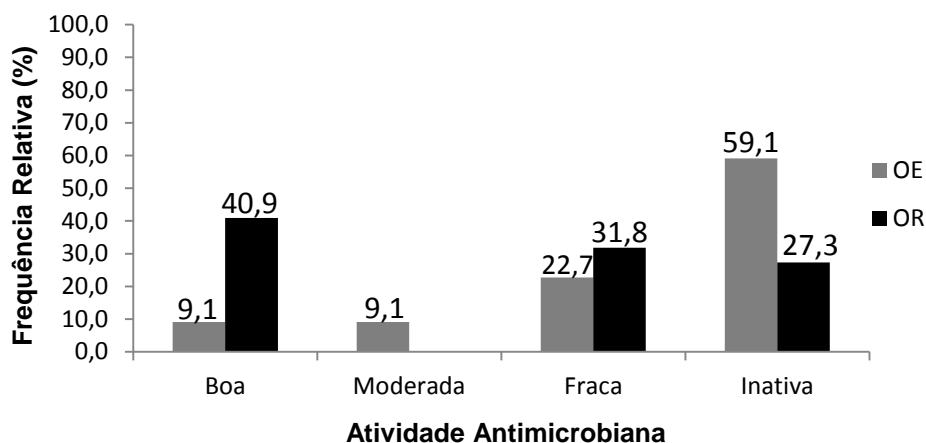
Como pode ser observado, os SCN tiveram uma suscetibilidade menor que os SCP à OR de *Copaifera* spp., pois a OR de copaíba frente aos SCN apresentou atividade fraca e inativa em 31,8% e 27,3 % das amostras, respectivamente (Figura 22).

Atualmente há estudos voltados para os SCN, no intuito de diminuir as linhagens resistentes a antibióticos utilizados na terapêutica de mastites. Exemplo disso, foi o trabalho desenvolvido por Pereira et al. (2009), que demonstrou boa atividade antimicrobiana do extrato etanólico das cascas de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret- Leguminosae) e das folhas do neem (*Azadirachta indica* A. Juss- Meliaceae), frente aos SCN isolados de casos de mastite subclínica em búfalas.

Tabela 19- Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. frente aos *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.

Micro-organismos	CIM (µg/mL)	
	SCN	OR de <i>Copaifera</i> spp.
(1)	>1000	>1000
(2)	>1000	>1000
(3)	>1000	1000
(4)	>1000	62,5
(5)	>1000	1000
(6)	>1000	>1000
(7)	1000	1000
(8)	>1000	31,25
(9)	>1000	15,62
(10)	>1000	1000
(11)	>1000	>1000
(12)	1000	7,81
(13)	>1000	>1000
(14)	1000	7,81
(15)	1000	3,90
(16)	1000	7,81
(17)	>1000	>1000
(18)	>1000	15,62
(19)	125	1000
(20)	62,5	1000
(21)	125	1000
(22)	15,62	31,25

Figura 34- Atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. frente aos *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.



Na avaliação da atividade antimicrobiana frente às bactérias do gênero *Corynebacterium* spp., foi verificado valores de CIM do OE de *Copaifera* spp. <100µg/mL para a bactéria de número (4). Já as demais, o CIM foi igual 1000µg/mL para 50% (2/4) e >1000µg/mL para 25% (1/4) (Tabela 20).

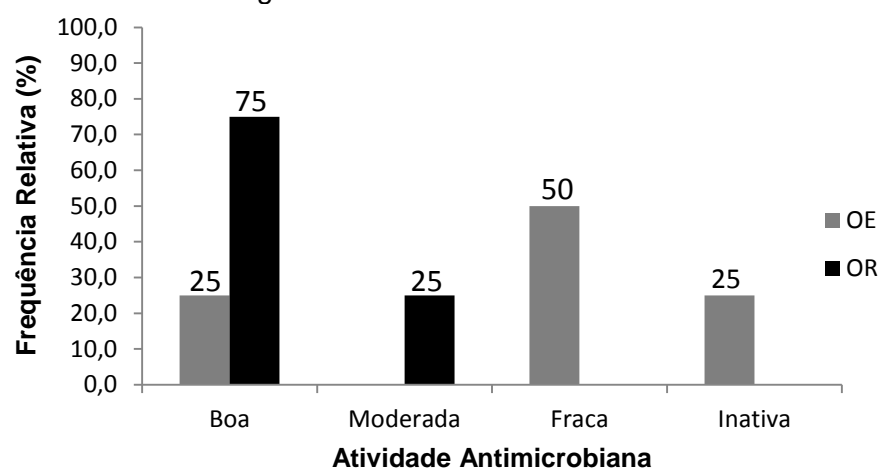
Avaliando as suscetibilidades dessas mesmas bactérias em relação à OR de *Copaifera* spp., o CIM foi <100µg/mL para 75% (3/4). Em relação à de número (3), o CIM foi de 125µg/mL (Tabela 20).

Tabela 20- Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial (OE) e oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. frente aos *Corynebacterium* spp. isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.

Micro-organismos	CIM (µg/mL)	CIM (µg/mL)
<i>Corynebacterium</i> spp.	OE de <i>Copaifera</i> spp.	OR de <i>Copaifera</i> spp.
(1)	>1000	31,25
(2)	1000	31,25
(3)	1000	125
(4)	7,81	15,62

Em relação aos *Corynebacterium* spp., o OE de *Copaifera* spp. apresentou boa atividade antimicrobiana em 25% (01/04) das amostras porém, foi a OR de *Copaifera* spp. que teve um melhor efeito antimicrobiano em 75% (03/04) dos isolados (Figura 35).

Figura 35- Atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. frente aos *Corynebacterium* spp. isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.



Nas buscas bibliográficas realizadas, não foi encontrado teste antimicrobiano com OE e OR de *Copaifera* spp. frente ao *Corynebacterium* spp. Mas, como se pode observar, os mesmos tiveram uma sensibilidade maior frente a OR do que ao OE de *Copaifera* spp.

Em relação à avaliação da atividade antimicrobiana frente aos *Streptococcus* do grupo C, F, G, foi verificado valores de CIM do OE de *Copaifera* spp. de 1000µg/mL para 33,3% (01/03) das amostras e >1000µg/mL para 66,7% (02/03) (Tabela 21).

A suscetibilidade dessas mesmas bactérias em relação à OR de *Copaifera* spp. mostrou CIM <100µg/mL para 66,7% (02/03) das bactérias e de 1000µg/mL para 33,3% (01/03) (Tabela 21).

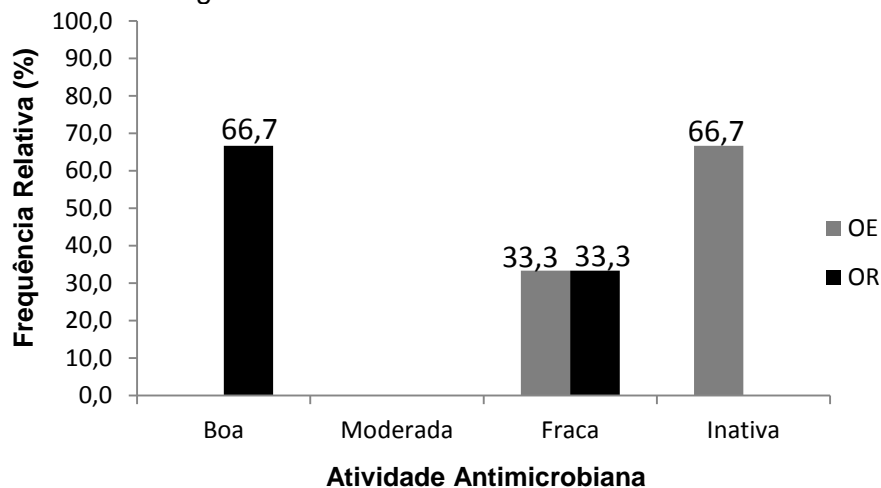
Tabela 21- Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. frente aos *Streptococcus* do grupo C, F, G isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.

Micro-organismos	CIM (µg/mL)	CIM (µg/mL)
<i>Streptococcus</i> do grupo C, F, G.	OE de <i>Copaifera</i> spp.	OR de <i>Copaifera</i> spp.
(1)	1000	31,25
(2)	>1000	1000
(3)	>1000	31,25

Com relação aos *Streptococcus* do grupo C, F, G, a OR de *Copaifera* spp. também apresentou boa atividade antimicrobiana em 66,7% (02/03) das amostras, ao contrário do OE de *Copaifera* spp., o qual foi inativo em 66,7% (02/03) dos isolados.

Logo, os *Streptococcus* do grupo C, F, G tiveram uma sensibilidade maior frente a OR do que ao OE de *Copaifera* spp. (Figura 36).

Figura 36- Atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. frente aos *Streptococcus* do grupo C, F, G isolados de amostras de leite de vacas com mastite bovina grau III.



Há outro estudo que já verificou a atividade da OR de copaíba frente às bactérias do gênero *Streptococcus*, como no trabalho de Pieri et al. (2010a), que demonstraram atividade antimicrobiana *in vitro* da solução de copaíba (*Copaifera officinalis*) frente aos micro-organismos orais *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*. Logo, esse estudo sugere o uso da OR de copaíba como alternativa promissora na terapêutica odontológica.

Com relação à avaliação da atividade antimicrobiana frente à *Escherichia coli* (2/2) isoladas de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III, verificou-se valor de CIM do OE de *Copaifera* spp. igual a 1000µg/mL e >1000µg/mL. A suscetibilidade das mesmas bactérias em relação à OR de *Copaifera* spp. revelou CIM >1000µg/mL (Tabela 22).

Logo, a atividade antimicrobiana do OE e da OR de *Copaifera* spp. frente aos isolados de *Escherichia coli* foi fraca à inativa e inativa, respectivamente (Figura 37).

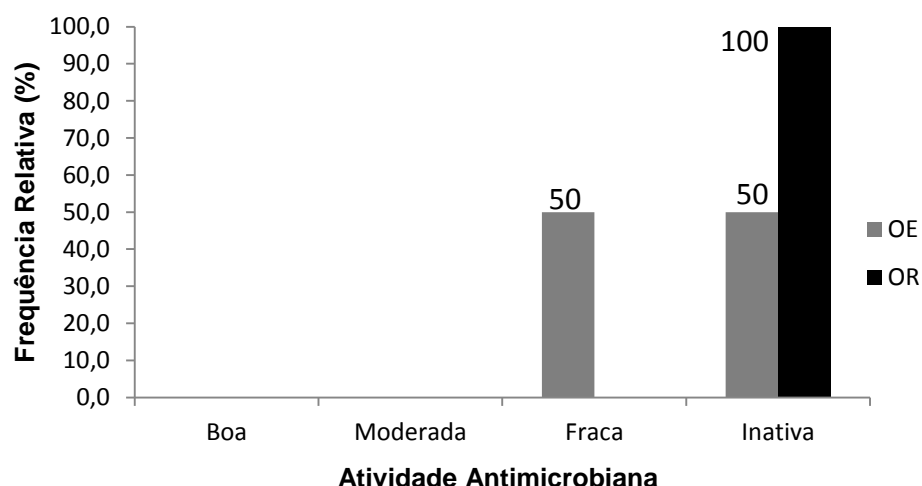
Estudos têm demonstrado resistência de bactérias Gram-negativas, incluindo *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* frente à OR de copaíba (PACHECO; BARATA; DUARTE 2006; PACKER; LUZ, 2007, SANTOS et al. 2008b), o que confirmam os resultados aqui encontrados.

Em contrapartida, no trabalho de Pieri et. al. (2011), as espécies *Copaifera langsdorffii* e *Copaifera officinalis* tiveram atividade antimicrobiana frente aos isolados de *E. coli* de matiste bovina.

Tabela 22- Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. frente às *Escherichia coli* isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.

Micro-organismos	CIM (µg/mL)	CIM (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i>	OE de <i>Copaifera</i> spp.	OR de <i>Copaifera</i> spp.
(1)	>1000	>1000
(2)	1000	>1000

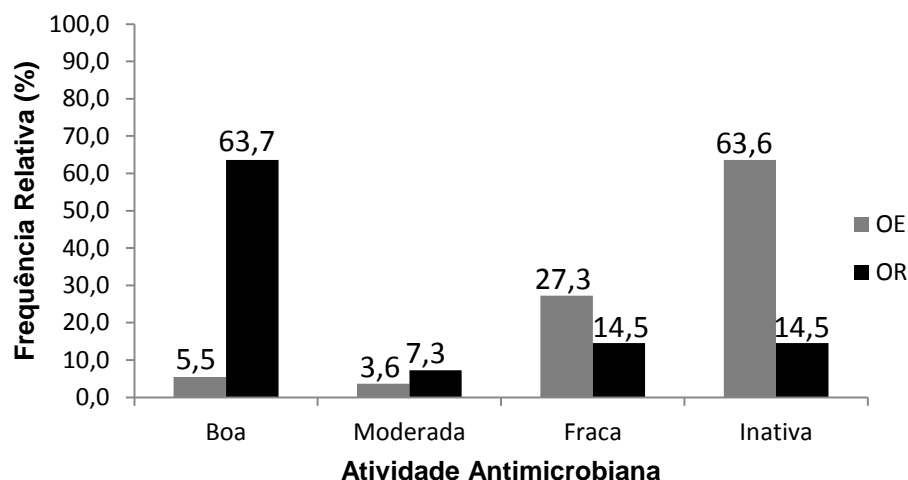
Figura 37- Atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. frente as *Escherichia coli* isoladas de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.



Portanto, conforme mostrado na Figura 38, foi possível verificar que, frente às 55 bactérias identificadas de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina subclínica grau III, a OR de *Copaifera* spp. apresentou melhor atividade antimicrobiana em 63,7% (35/55) das amostras do que o OE, em 5,5% (03/55) dos isolados ($p < 0,0001$).

Pieri et al. (2011) sugerem que a OR de copaíba contenha diferentes componentes que atuam sinergicamente em várias estruturas e vias metabólicas das células bacterianas, o que pode explicar a boa atividade antimicrobiana encontrada neste trabalho.

Figura 38- Atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) e da oleorresina (OR) de *Copaifera* spp. frente as 55 bactérias isoladas de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III.



A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e de seus constituintes isolados está relacionada com as características químicas, grupos funcionais e estereoquímicas dos constituintes, e com os compostos oxigenados presentes nos óleos essenciais, em particular aqueles com estrutura fenólica (carvacrol, eugenol, timol), terpenóides alifáticos com grupamento éster (acetato de geranila), álcool (linalol) ou aldeído (cinamaldeído), que se destacam por apresentarem potencial efeito antimicrobiano (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2009).

O OE, fração volátil da OR, é constituído por sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). O OE de *Copaifera* spp. deste estudo apresentou como compostos majoritários os sesquiterpenos hidrocarbonetos, com 96,16%. Considerando o trabalho de Henriques, Simões-Pires e Apel (2009) e Chaibub et al. (2013), isso pode justificar a fraca e inativa atividade antimicrobiana do OE.

Veiga Jr et al. (2001) verificaram em seu estudo que os sesquiterpenos hidrocarbonetos possuem maior atividade anti-inflamatória do que as frações de álcoois sesquiterpênicos e ácidos diterpênicos e, esta atividade se associa aos sesquiterpenos α -bergamoteno, β -cariofileno e α - aromadendreno, os quais foram encontrados no OE de *Copaifera* spp. deste estudo. Logo sugere-se que a propriedade farmacológica atribuída ao OE seria mais anti-inflamatória do que antimicrobiana, pois 96,16% dos seus compostos são sesquiterpenos hidrocarbonetos, o que também pode-se justificar a sua atividade antimicrobiana fraca a inativa encontrada no presente estudo.

Segundo Veiga Júnior e Pinto (2002) e Pieri et al. (2009) a atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiedêmica da OR de copaíba é atribuída ao sesquiterpeno β -cariofileno, o qual foi o composto majoritário encontrado na fração volátil do presente estudo. Embora a literatura científica revele que o β -cariofileno apresenta atividade antimicrobiana, Souza et al. (2005) demonstraram que o composto isolado de cariofileno não apresentou atividade antifúngica, os mesmos sugerem que determinados fitoquímicos têm o seu efeito antimicrobiano mostrado apenas quando atua de maneira sinérgica com outros componentes. Dessa forma, as funções sinérgicas dos vários compostos encontrados nos óleos essenciais, em comparação ao efeito de um ou dois compostos isolados do óleo, parece questionável (BAKKALI et al. 2008).

De acordo com Bakkali et al. (2008), a atividade dos principais componentes pode ser modulada por outras moléculas menores. Já segundo Burt (2004), há evidência de que componentes em menores quantidades têm um papel crucial na atividade antibacteriana, possivelmente por meio da produção de um efeito sinérgico com outros componentes, o que talvez tenha acontecido com o β -cariofileno presente na OR de *Copaifera* spp.

Segundo Veiga Jr, Patitucci e Pinto (1997) e Veiga Júnior e Pinto (2002) os ácidos diterpênicos contribuem com a maior parte das propriedades terapêuticas da OR e que a atividade antimicrobiana pode ser justificada pela presença do ácido caurenóico, o qual foi possível identificá-lo na amostra de estudo. Sendo assim, acredita-se que o efeito antimicrobiano da OR talvez esteja também relacionado com os ácidos diterpênicos, os quais podem atuar de forma sinérgica com outros componentes.

Portanto, apesar das diferentes atividades farmacológicas relatadas à OR de copaíba e uma variedade de substâncias que têm sido identificadas, pouco se sabe sobre a relação entre as estruturas químicas e as atividades dos componentes (CASCON; GILBERT, 2000). No entanto, Tappin et al. (2004) afirmam que a OR de copaíba representa um caso em que o perfil químico total, assim como as caracterizações das espécies presentes, são mais importantes do que as substâncias isoladas na determinação das possíveis atividades farmacológicas.

4.3.1.2 Verificação da atividade antimicrobiana *in vitro* de três formulações fitoterápicas à base de *Copaifera* spp.

Com base no teste de CIM foi possível verificar que a OR teve melhor atividade antimicrobiana do que o OE de *Copaifera* spp. frente às bactérias isoladas de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina grau III, portanto foi a matéria-prima vegetal escolhida para produção das formulações fitoterápicas.

Foram preparadas três formulações, as quais tinham veículos diferentes, sendo uma com base catiônica, outra não-iônica e a terceira, aniônica. Foi possível observar que durante a incorporação da OR de copaíba nas bases galênicas, houve uma interação adequada das bases com a mesma, não apresentando separação de fases ou coalescência.

A concentração de um antimicrobiano utilizada para controlar infecções é baseada em testes de CIM. Entretanto, a escolha da concentração da OR de copaíba utilizada nas formulações não foi baseada somente no teste de CIM, tendo sido levado em consideração também o espectro de ação antimicrobiano da OR de copaíba, dados de dois trabalhos científicos (PIERI et al., 2010b; PIERI et al., 2011), e o fato dos animais estarem em lactação.

Segundo Costa et al. (2006), no caso de mastite bovina, é necessário que o antimicrobiano atinja concentrações no úbere maiores ou pelo menos iguais a CIM, para que os principais patógenos da mastite sejam eliminados. Entretanto, foi possível verificar no teste de CIM, do presente trabalho, que para algumas bactérias, como SCN, *Streptococcus* do grupo C, F, G e *E. coli*, a OR de copaíba teve atividade fraca a inativa na concentração de 0,2%.

Considerando que estes agentes etiológicos supracitados são isolados com frequência de casos de mastite bovina no Brasil, bem como em outros países e, baseando-se no estudo realizado por Pieri et al. (2011), que trabalhou com 27 *E. coli* isoladas de leite de vacas com mastite, foi possível observar que do total de 27 *E. coli*, apenas 8 (29,63%) foram inibidas pelas espécies *C. langsdorffii* e, 7 (25,92%) pela *C. officinalis*, ambas na concentração de 10%, o que sugere que talvez em concentrações maiores poderiam inibir maior quantidade de cepas.

De acordo com o trabalho desenvolvido por de Pieri et al. (2010b), os quais trabalharam com seis isolados de *Listeria monocytogenes*, os resultados mostraram sensibilidade apenas de uma cepa à solução de 2,5% de OR de copaíba autoclavada,

quatro a solução de 5% e cinco à 10%. Diante do exposto, conclui-se que a sensibilidade das bactérias aumentaram a medida que houve um aumento da concentração da OR de copaíba.

Outro fator que foi levado em consideração na escolha da dose utilizada para a formulação é que ao realizar tratamento de mastite no período de lactação, a sua efetividade é inferior quando comparada com a terapia no período seco (sem produzir leite). Isso porque vacas em lactação, como precisam ser ordenhadas uma a duas vezes por dia, acabam drenando o princípio ativo via leite e com isso o medicamento não fica o tempo suficiente para combater o agente bacteriano, ao contrário de vacas no período seco, que permanecem com o medicamento por mais tempo no interior da glândula mamária.

Diante de tudo isso, à princípio, optou-se por utilizar uma concentração de 20% de OR de copaíba com a finalidade de verificar se esta dose teria um efeito antimicrobiano de largo espectro durante o curto período de tempo que a formulação fitoterápica iria permanecer no interior da glândula mamária, visto que os animais utilizados estavam em lactação.

Após a preparação das formulações fitoterápicas, foi realizado o teste de antibiograma com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade da atividade antimicrobiana das formulações farmacêuticas contendo OR de *Copaifera* spp. frente aos micro-organismos isolados, bem como verificar a sensibilidade das bactérias frente à gentamicina, antibiótico comercial utilizado no tratamento de mastite bovina, o qual também foi utilizado como controle e confiabilidade da técnica utilizada.

Para o teste de antibiograma utilizou-se 42 micro-organismos, sendo 24 SCP e 18 SCN. Frente às três formulações fitoterápicas 100% dos SCP foram sensíveis (Quadro 2), ou seja, a OR de copaíba reproduziu a sua atividade antimicrobiana do teste de CIM, a qual apresentou-se de boa a moderada (Figura 33).

Em relação aos SCN, do total de 18 bactérias, 100% foram sensíveis frente a formulação fitoterápica utilizando base catiônica. Frente a formulação fitoterápica utilizando base não-iônica 83,33% (15/18) foram sensíveis, exceção das cepas de número (1), (8) e (10). Em relação à formulação fitoterápica utilizando base aniônica 94,44% (17/18) foram sensíveis, exceção do isolado de número (1) (Quadro 3).

Quadro 2- Resultado da sensibilidade dos *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) frente às três formulações fitoterápicas à base de oleorresina de copaíba e à gentamicina.

Micro-organismos	Controles			Formulações Fitoterápicas			Gentamicina
	C	NI	A	C-OR	NI-OR	A-OR	
SCP							
<i>S. aureus</i>							
(1)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(2)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(3)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(4)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(5)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(6)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(7)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(8)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(9)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(10)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(11)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(12)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(13)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(14)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(15)	✓	---	---	✓	✓	✓	R
(16)	✓	---	---	✓	✓	✓	R
<i>S. schleiferi schleiferi</i>							
(1)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(2)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(3)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
<i>S. hyicus</i>							
(1)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(2)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
<i>S. schleiferi coagulans</i>							
(1)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
(2)	✓	---	---	✓	✓	✓	S
<i>S. intermedius</i>							
(1)	✓	---	---	✓	✓	✓	S

Legenda: ✓ → Formação de halo de inibição; --- → Não formação de halo inibição; Controles → C: catiônica; NI: não-iônica; A: aniônica; Formulações Fitoterápicas → C-OR: catiônica com OR de *Copaifera* spp.; NI-OR: não-iônica com OR *Copaifera* spp.; A-OR: aniônica com OR *Copaifera* spp.; Gentamicina → S: Sensível; R: Resistente.

Quadro 3- Resultado da sensibilidade dos *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) frente às três formulações fitoterápicas à base de oleorresina de copaíba e à gentamicina.

Micro-organismos	Controles			Formulações Fitoterápicas			Gentamicina	
	SCN	C	NI	A	C-OR	NI-OR		A-OR
(1)	✓	---	---	---	✓	---	---	S
(2)	✓	---	---	---	✓	✓	✓	S
(3)	✓	---	---	---	✓	✓	✓	S
(4)	✓	---	---	---	✓	✓	✓	S
(5)	✓	---	---	---	✓	✓	✓	S
(6)	✓	---	---	---	✓	✓	✓	S
(7)	✓	---	---	---	✓	✓	✓	S
(8)	✓	---	---	---	✓	---	✓	S
(9)	✓	---	---	---	✓	✓	✓	S
(10)	✓	---	---	---	✓	---	✓	S
(11)	✓	---	---	---	✓	✓	✓	S
(12)	✓	---	---	---	✓	✓	✓	S
(13)	✓	---	---	---	✓	✓	✓	S
(14)	✓	---	---	---	✓	✓	✓	S
(15)	✓	---	---	---	✓	✓	✓	S
(16)	✓	---	---	---	✓	✓	✓	S
(17)	✓	---	---	---	✓	✓	✓	R
(18)	✓	---	---	---	✓	✓	✓	S

Legenda: ✓ → Formação de halo de inibição; --- → Não formação de halo inibição; Controles → C: catiônica; NI: não-iônica; A: aniônica; Formulações Fitoterápicas → C-OR: base catiônica com OR de *Copaifera* spp.; NI-OR: base não-iônica com OR *Copaifera* spp.; A-OR: base aniônica com OR *Copaifera* spp.; Gentamicina → S: Sensível; R: Resistente.

Para as cepas que não foram sensíveis as formulações fitoterápicas (não formação de halo de inibição), comparou-se os resultados do antibiograma com os do teste de CIM e foi possível observar que, a OR de copaíba frente ao SCN de número (1), tanto para a formulação fitoterápica não-iônica, quanto aniônica, continuou sem atividade (Quadro 3 e Tabela 19). Com relação ao SCN de número (10), frente a formulação fitoterápica não-iônica a OR de copaíba também apresentou atividade fraca (Quadro 3 e Tabela 19). Já o SCN de número (8), também frente a formulação fitoterápica não-iônica, a OR de copaíba não reproduziu a sua atividade, pois não

houve formação de halo, porém no teste de CIM apresentou boa atividade (Quadro 3 e Tabela 19).

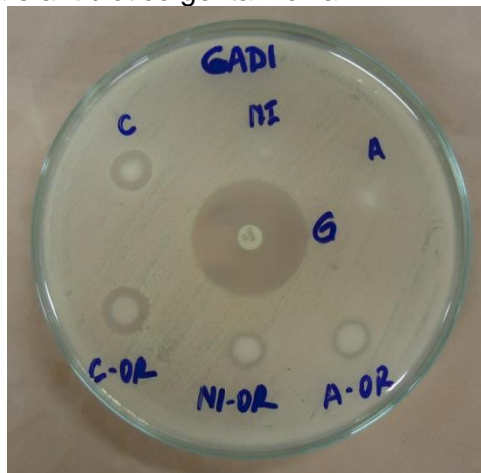
Segundo Lambert et al. (2001) e Nascimento et al. (2007), as técnicas de difusão em disco e difusão em ágar, apesar de muito utilizadas, fornecem somente dados qualitativos, pois a característica hidrófoba da maioria dos óleos essenciais de plantas impede a difusão uniforme destas substâncias através do meio contendo ágar, o qual tem característica hidrofílica, o que resulta em concentrações desiguais do óleo no ágar e formação de regiões com atividade antimicrobiana variável. Este fato pode justificar a ausência de formação de halo de inibição das formulações fitoterápicas com OR de copaíba frente às três cepas supracitadas. Sendo assim, dependendo do método utilizado, pode dificultar a verificação da atividade antimicrobiana dos óleos medicinais.

Com relação aos controles (bases galênicas sem OR de *Copaifera* spp.), não houve formação de halos para as bases não-iônica (NI) e aniônica (A), o que permite inferir que a formação de halo nas formulações fitoterápicas utilizando-se estes veículos esteja relacionada com a atividade antimicrobiana da OR de copaíba.

Em contrapartida, houve formação de halo para todos os micro-organismos testados frente ao controle da base catiônica (C) (Quadro 2, Quadro 3 e Figura 39). Sugere-se que a formação de halo do veículo catiônico esteja relacionada com o seu pH de 4,5, pois segundo Baptista e Linhares (2005) a maioria das bactérias não se multiplica em pH inferior a 4,6. Devido à isso, não se pode afirmar que o halo de inibição formado com a formulação fitoterápica utilizando veículo catiônico frente aos SCP e SCN esteja relacionado somente à atividade antimicrobiana da OR de copaíba, pois pode ter tido influência do pH da base galênica catiônica ou ainda, do tensoativo catiônico, pois segundo Thompson (2006), o mesmo possui ação antimicrobiana.

Apesar da formulação fitoterápica utilizando veículo catiônico (pH 4,5) ter inibido o crescimento bacteriano, segundo Thompson (2006) para as formulações destinadas à aplicação em membranas sensíveis ou aplicadas em lesões é desejável ajustar seu pH em nível próximo ao pH fisiológico. Esse ajuste é realizado objetivando evitar a dor ou desconforto do paciente. Por esse motivo, optou-se por não utilizar esta base nos testes *in vivo*, já que o pH do tecido glandular mamário é de 6,4- 6,8 (COSTA, 2006).

Figura 39- Antibiograma: Resultado da sensibilidade das bactérias isoladas de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica grau III frente à três formulações à base de oleorresina (OR) de copaíba e antibiótico gentamicina.



Legenda: Controles → C: catiônica; NI: não-iônica; A: aniônica; Formulações Fitoterápicas → C-OR: base catiônica com OR de *Copaifera* spp.; NI-OR: base não-iônica com OR *Copaifera* spp.; A-OR: base aniônica com OR *Copaifera* spp.; Gentamicina → G.

Com relação ao antibiótico gentamicina, 92,86% (39/42) das bactérias testadas foram sensíveis, com exceção do *S. aureus* de número (15) e (16) e SCN de número (17), os quais foram resistentes (R) (Quadro 2 e 3). Segundo Sabour et al. (2004) e Zafalon et al. (2008), o conhecimento dos padrões de resistência antimicrobiana dos patógenos da mastite bovina é necessário e fundamental para o desenvolvimento de métodos preventivos que sejam efetivos no tratamento, pois assim, se reduz as perdas na produção de leite, além de evitar o aparecimento de estirpes resistentes.

De acordo com Trabulsi e Alterthum (2008), os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias contra antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, como a gentamicina, envolve alterações de permeabilidade, modificações ribossômicas e produção de enzimas inativantes. Os dois primeiros são mediados por mutação e o último, por plasmídeos.

Ao analisar os dados do Quadro 2, observa-se que os *S. aureus* de número (15) e (16) resistentes a gentamicina foram sensíveis frente a OR de copaíba, a qual demonstrou boa atividade antimicrobiana ($CIM \leq 100 \mu\text{g/mL}$), como pode-se observar na Tabela 17. Esses dados corroboram com o estudo desenvolvido por Santos et al. (2008b), em que as espécies *C. martii*, *C. officinalis* e *C. reticulata* exibiram boa atividade antibacteriana (CIM de $62,5-125 \mu\text{g/mL}$) contra *S. aureus* resistente a meticilina.

4.4 TESTE *IN VIVO*

4.4.1 Aplicação intramamária e avaliação preliminar de formulação fitoterápica contendo *Copaifera* spp.

Após o teste de antibiograma, duas formulações farmacêuticas com OR de copaíba a 20%, utilizando-se base galênica aniônica (pH 6,5) e não-iônica (pH 6,5), foram manipuladas.

De acordo com o planejamento experimental submetido ao Comitê de Ética, 30 vacas leiteiras seriam submetidas a aplicação intramamária durante sete dias, uma aplicação por dia, após a última ordenha e, o parâmetro que iria indicar a eficácia ou não da formulação farmacêutica à base de *Copaifera* spp. seria a cura ou não cura microbiológica, com coletas de amostras de leite nos dias 0 (antes da 1ª aplicação intramamária), 14 (pós-tratamento) e 30 (pós-tratamento) para avaliação microbiológica conforme o item 3.3.3 e avaliação clínica dos animais.

Entretanto, apenas quatro animais chegaram a participar das análises. Destes quatro, dois receberam aplicação intramamária com a formulação contendo OR de *Copaifera* spp. utilizando a base galênica aniônica e, os dois restantes com o controle (base galênica aniônica sem a OR de copaíba). Os resultados obtidos podem ser observados nos Quadros 4 e 5. O resultado da avaliação microbiológica no dia 0 (antes da 1ª aplicação intramamária) está na Tabela 23.

Quadro 4- Aplicações intramamárias de formulação fitoterápica à 20% de oleorresina de copaíba utilizando base galênica aniônica.

Animal	Teto	Dias aplicados
DP171	PD	04 dias
DP204	AE	01 dia

Legenda: PD- teto posterior direito; AE- teto anterior esquerdo

Quadro 5- Aplicações intramamárias do controle (base galênica aniônica).

Animal	Teto	Dias tratados
AA70	AE	05 dias
DP128	PD	05 dias

Legenda: AE- teto anterior esquerdo; PD- teto posterior direito;

Tabela 23- Bactérias isoladas de amostras de leite de vacas diagnosticas com mastite subclínica grau III no dia 0 (antes da 1ª aplicação intramamária), como parâmetro para indicar a eficácia ou não da formulação farmacêutica à base de *Copaifera* spp.

MICRO-ORGANISMOS	FA	FR
Gênero <i>Staphylococcus</i>		
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (SCN)	04	40%
<i>Corynebacterium</i> spp.	04	40%
<i>Escherichia coli</i>	02	20%
TOTAL	10	100%

Legenda: FA- Frequência Absoluta; FR- Frequência Relativa.

Após 12 horas da primeira aplicação, o animal DP204 já apresentou reação inflamatória intensa, que pode ser verificada no momento em que se procedeu o teste da caneca de fundo telado, com a presença de grande quantidade de grumos, ao ponto do leite perder sua característica fluida. Diante deste quadro, a aplicação foi suspensa e o animal foi tratado com medicamento comercial. Esse mesmo quadro se repetiu com os outros animais, nos dias 4 e 5. Assim, as aplicações intramamárias foram suspensas antes de se completar os sete dias propostos. Estes animais também receberam medicamento comercial, e todos se recuperaram.

Com a piora do quadro clínico do presente estudo houve a necessidade de interromper o protocolo proposto para preservar a saúde dos animais. Logo, optou-se também por não testar a formulação fitoterápica utilizando-se base galênica não-iônica.

De acordo com os dados obtidos pode-se concluir que a formulação fitoterápica com OR de copaíba proposta não foi eficaz e nem segura, pois a mesma intensificou o processo inflamatório e não sendo possível avaliar seu efeito antimicrobiano.

Portanto, há necessidade de testes futuros, como de citotoxicidade e de irritabilidade, para verificar qual a concentração segura de OR de copaíba utilizada na formulação, a qual não agrida a mucosa interna e o tecido glandular, e que proporcione efeito anti-inflamatório local e antimicrobiano frente aos micro-organismos causadores da mastite.

Segundo os estudos de Veiga Júnior et al. (2007), as espécies *Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke foram citotóxicas na concentração de 500µg/mL, reduzindo o número de células viáveis (macrófagos) em 95 e 94%, respectivamente. Ao contrário da oleorresina de *Copaifera reticulata*, que

não alterou a viabilidade dos macrófagos em três concentrações testadas (500, 50 e 5µg/mL).

Lorca et al. (2007) ressaltam que os tensoativos, substâncias presentes nas formulações fitoterápicas testadas, possuem propriedades físico-químicas cruciais para o aparecimento de edema e irritabilidade (reações inflamatórias) na pele de humanos. Logo, sugere-se também que se realize testes de citotoxicidade e irritabilidade dos veículos farmacêuticos antes da aplicação intramamária, ou que utilizem veículos mais apropriados para mucosas (GALENA, 2013), ou ainda veículos isentos de etoxilados, parabenos e petrolados, os quais possam ser aplicados em regiões lesadas (FAGRON, 2013). Já que, segundo Thompson (2006) os parabenos quando aplicados sobre membranas mucosas podem causar sensibilização ou reações alérgicas.

4.4.2 Determinação do teor de β -cariofileno na formulação fitoterápica à base de *Copaifera* spp.

Apesar dos resultados *in vivo* não terem sido satisfatórios, realizou-se a co-validação dos parâmetros especificidade, linearidade e, precisão ao nível de repetibilidade e precisão intermediária com o objetivo de quantificar o composto β -cariofileno na formulação farmacêutica com OR de *Copaifera* spp. utilizando a base galênica aniônica.

Os resultados da avaliação dos parâmetros de *system suitability* (resolução-Rs; fator de cauda- FT e número de pratos teóricos da coluna- N) referentes a co-validação da metodologia nesta matriz estão presentes na Tabela 24.

Os dados encontrados sugerem que o sistema está apto a gerar resultados com exatidão e precisão aceitáveis, visto que os mesmos estão de acordo com as especificações da FDA (1994) (CDER, 1994; RIBANI et al., 2004).

Tabela 24- Parâmetros de *system suitability* obtidos para os cromatogramas do padrão β -cariofileno e da formulação fitoterápica aniônica.

Amostras	Rs	FT	N
Padrão β -cariofileno	----	1,11	53.025
Formulação Fitoterápica	2,690	1,08	52.002
Especificação da literatura*	> 2	\leq 2	> 2000

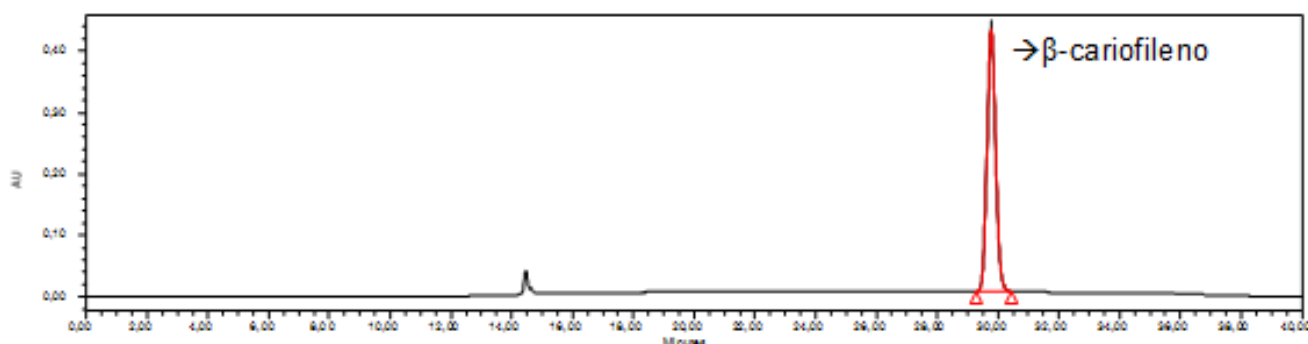
Legenda: Rs-resolução; FT-fator de cauda; N-número de pratos teóricos da coluna.

Fonte: CDER (1994); RIBANI et al. (2004).

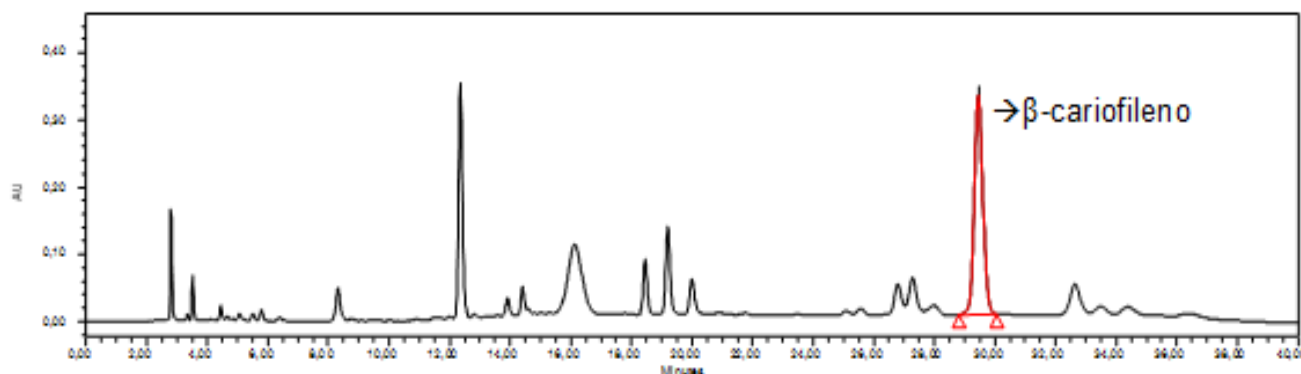
Com relação a especificidade, de acordo com a Figura 40-C, o cromatograma referente a base galênica aniônica dissolvida no diluente ACN 75% (v/v) grau HPLC demonstrou ausência de qualquer pico interferente no tempo equivalente ao tempo de retenção do marcador β -cariofileno (Figura 40-A e 40-B), o que indica que o método pode ser considerado específico e seletivo. Os picos que se vê no início do cromatograma deve-se às substâncias químicas presentes nos veículos, que absorvem no comprimento de onda usado.

Figura 40- Perfil cromatográfico 2D a 210nm do padrão β -cariofileno, da amostra (formulação fitoterápica aniônica) e do veículo (base galênica aniônica).

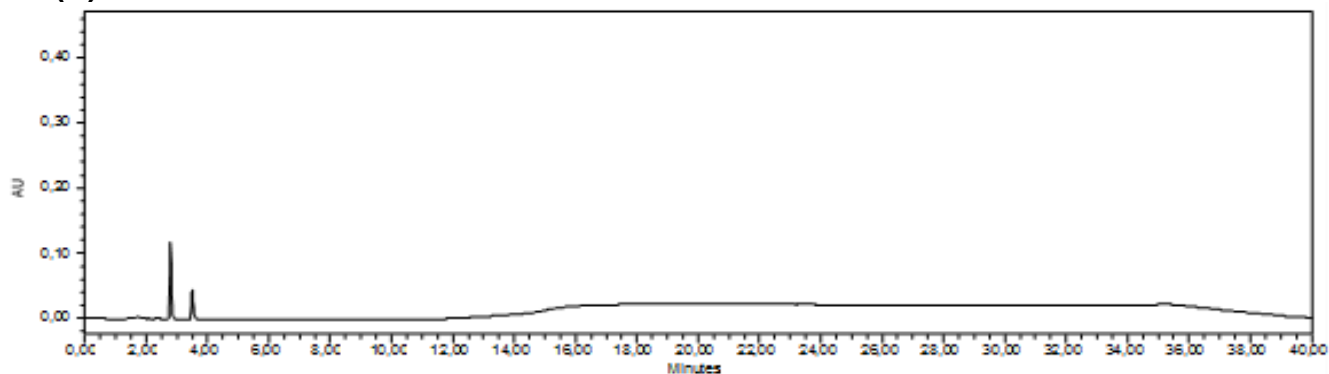
(A)



(B)



(C)

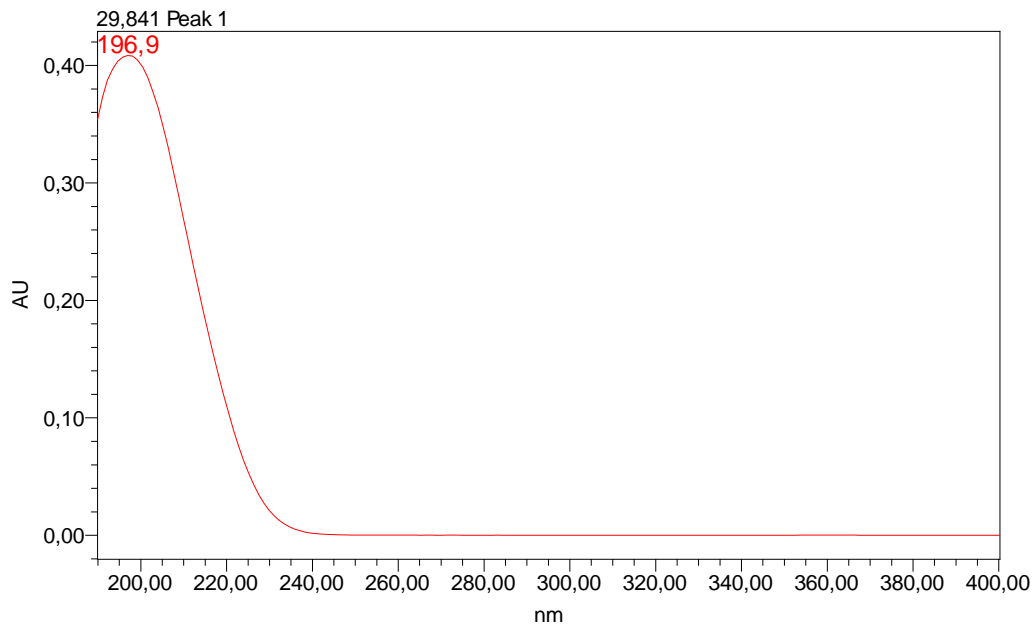


Legenda: (A)- Padrão β -cariofileno; (B)- Amostra (formulação fitoterápica aniônica); (C)- Veículo (base galênica aniônica).

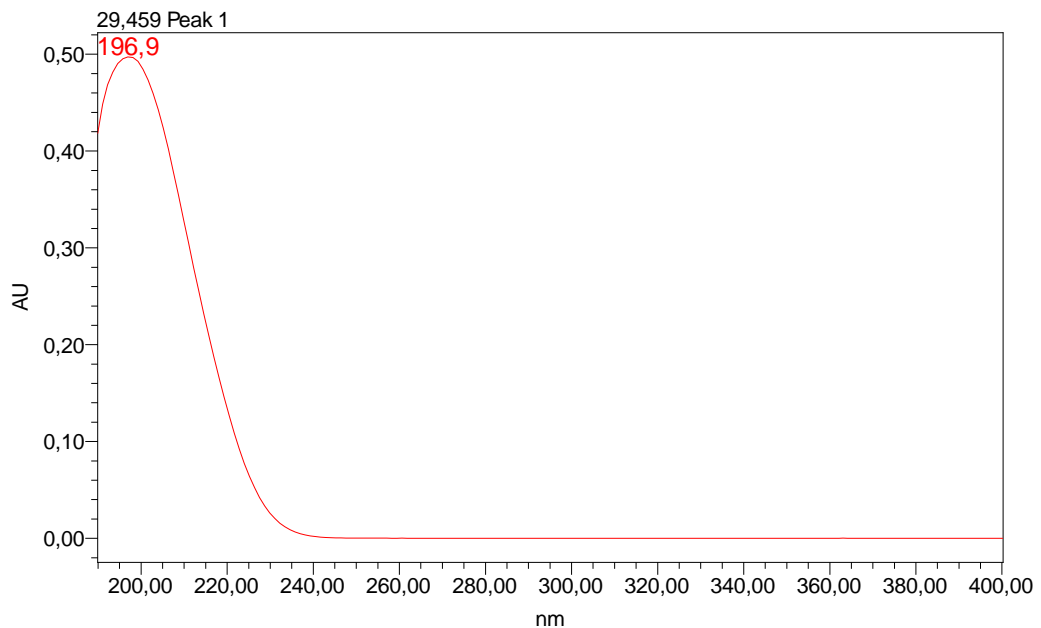
Outro indicativo da especificidade do método é a semelhança entre os espectros UV dos picos de cada analito, comparando-se padrão e amostra e isso pode ser observado na Figura 41, a qual demonstra que o método proposto pode ser considerado específico e seletivo para formulação fitoterápica à 20% de OR de copaíba utilizando-se base galênica aniônica.

Figura 41- Espectro de absorção do β -cariofileno no padrão e na formulação fitoterápica à 20% de oleorresina de copaíba utilizando-se base galênica aniônica.

(A)



(B)

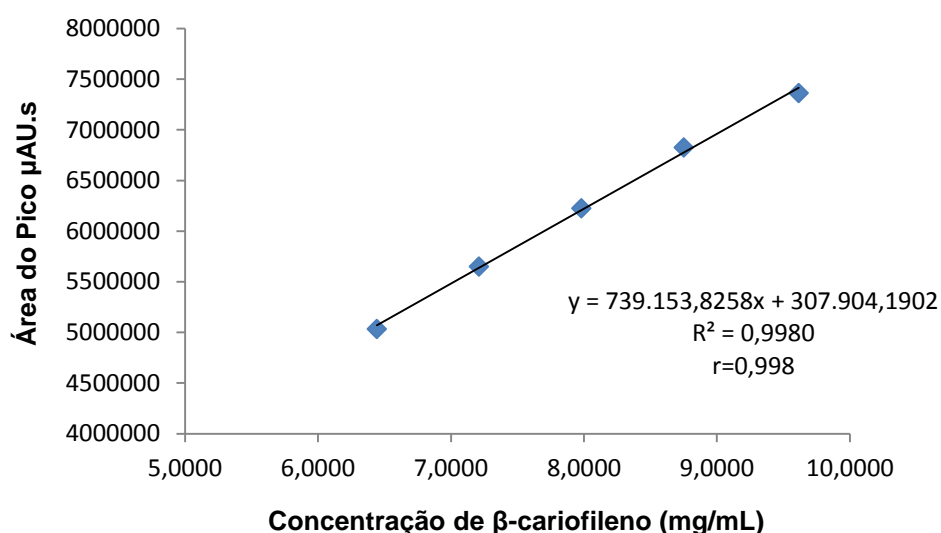


Legenda: (A)- β -cariofileno no padrão; (B)- β -cariofileno na formulação fitoterápica.

Para formulação fitoterápica com OR de *Copaifera* spp., em que utilizou-se base galênica aniônica, um teste adicional de linearidade foi realizado, com o intuito de verificar se diferentes quantidades de amostra levariam a uma variação linear da resposta.

Contudo, o método para formulação farmacêutica com OR de *Copaifera* spp., utilizando-se a base galênica aniônica, mostrou-se linear, dentro do intervalo de concentração de 6,43 a 9,6mg/mL. A curva padrão média da amostra é mostrada na Figura 42, com o coeficiente de correlação (r) de 0,998, o qual está de acordo com as especificações da ANVISA (BRASIL, 2003) e, a equação da reta obtida foi: $y = 739.153,8258x + 307.904,1902$.

Figura 42- Linearidade: curva padrão média da formulação fitoterápica à 20% de oleorresina de copaíba utilizando-se base galênica aniônica.



O resultado obtido comprova a capacidade da metodologia utilizada em demonstrar que as áreas obtidas são diretamente proporcionais à concentração de β-cariofileno na amostra e, os dados referentes à triplicata dos pontos da curva padrão estão dispostos na Tabela 25.

Tabela 25- Áreas dos picos da formulação fitoterápica à 20% de oleoresina de copaíba utilizando-se base galênica aniônica obtidas para a construção da curva padrão média.

Concentração teórica (mg/mL)	Área 1 (μAU.s)	Área 2 (μAU.s)	Área 3 (μAU.s)	Área média (μAU.s)	DP (%)	CV (%)
6,43	4793414	5268415	5044637	5035488,667	237632,6	4,7192
7,20	5392632	5889697	5671956	5651428,333	249167,5	4,4089
7,97	5952253	6489285	6237147	6226228,333	268682,4	4,3153
8,74	6561568	7115241	6803401	6826736,667	277573,2	4,0660
9,60	7210371	7510957	7373387	7364905	150472,4	2,0431

Legenda: DP- Desvio padrão; CV (%) - Coeficiente de Variação.

Para a formulação farmacêutica com OR de *Copaifera* spp., utilizando-se a base galênica aniônica, a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficiente de variação (CV%) de 1,3482 e 4,0409 respectivamente, os quais podem ser visualizados nas Tabelas 26 e 27. Os valores obtidos comprovam a precisão do método desenvolvido tanto em nível de repetibilidade quanto em nível de precisão intermediária, uma vez que o coeficiente de variação entre os resultados das replicatas realizadas foram <5%, conforme especificação da ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 26- Repetibilidade do método analítico para doseamento de β-cariofileno na formulação fitoterápica à 20% de oleoresina de copaíba utilizando-se base galênica aniônica.

Análise	Concentração experimental (mg/mL)	Área (μAU.s)	Teor (%)	Teor Médio (%)	DP (%)	CV (%)
1	0,2746	5867503	3,5718			
2	0,2700	5771268	3,5127			
3	0,2754	5885063	3,5824	3,5839	0,0483	1,3482
4	0,2737	5849728	3,5609			
5	0,2792	5964236	3,6309			
6	0,2805	5993065	3,6449			

Legenda: DP- Desvio padrão; CV (%) - Coeficiente de Variação.

Tabela 27- Precisão intermediária do método analítico para doseamento de β -cariofileno na formulação fitoterápica à 20% de oleorresina de copaíba utilizando-se base galênica aniônica.

Análise	Concentração experimental (mg/mL)	Área (μ AU.s)	Teor (%)	Teor Médio (%)	DP (%)	CV (%)
1	0,2746	5867503	3,5718			
2	0,2700	5771268	3,5127			
3	0,2754	5885063	3,5824			
4	0,2737	5849728	3,5609			
5	0,2792	5964236	3,6309			
6	0,2805	5993065	3,6449			
7	0,2711	5794040	3,4071	3,5979	0,1454	4,0409
8	0,2740	5856179	3,4441			
9	0,3043	6494320	3,8227			
10	0,3021	6447069	3,7945			
11	0,2716	5805265	3,4137			
12	0,3016	6437822	3,7890			

Legenda: DP- Desvio padrão; CV (%) - Coeficiente de Variação.

Enfim, a co-validação da metodologia foi específica, linear e precisa aos níveis de repetibilidade e precisão intermediária, e o teor médio de β -cariofileno encontrado na amostra testada foi de 3,59% (m/m). Sendo assim, a técnica CLAE para sesquiterpenos, em especial para β -cariofileno, pode ser utilizada no controle de qualidade de formulações fitoterápicas utilizando-se OR de *Copaifera* spp. como matéria-prima vegetal.

O teor médio de β -cariofileno encontrado na formulação fitoterápica foi de 3,59% (m/m), o que equivale em μ g/mL o valor de 275,69. SILVA et al (2008) demonstraram que os compostos β -cariofileno e α -humuleno, os quais estão presentes nessa matéria-prima vegetal, apresentam citotoxicidade em macrófagos a partir de 107,3 e 159,0 μ g/mL, respectivamente. Estes dados também demonstram a necessidade de se testar a citotoxicidade da OR de copaíba previamente, para que se possa propor uma concentração mais segura, sem comprometer a integridade celular.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

Diversas etapas foram executadas para alcançar os objetivos propostos e, a partir delas foram obtidas as seguintes conclusões:

- ✓ Os resultados obtidos na caracterização da matéria-prima vegetal revelaram que as propriedades intrínsecas da OR de *Copaifera* spp. confirmam sua autenticidade e qualidade, sendo assim, esta foi considerada adequada para o uso a qual se destinava.
- ✓ As análises realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (ESI FT-ICR MS) identificaram os sesquiterpenos e diterpenos presentes na fração volátil e na OR de *Copaifera* spp., respectivamente.
- ✓ A técnica CLAE para sesquiterpenos, em especial para β -cariofileno, pode ser utilizada no controle de qualidade de OR e OE de *Copaifera* spp., bem como em formulação fitoterápica utilizando OR de *Copaifera* spp. como matéria-prima vegetal.
- ✓ Os resultados obtidos na caracterização fenotípica demonstram a importante participação do gênero *Staphylococcus* na etiologia da mastite subclínica grau III na região estudada, sendo as bactérias SCN e *S. aureus* as mais frequentes. Devido à alta patogenicidade desses micro-organismos, tanto para o animal quanto para o homem, ressalta-se que é importante realizar estudos acerca do controle da doença, visto que, o leite é um veículo destes micro-organismos para o homem, o que pode ser prejudicial à sua saúde.
- ✓ Frente aos principais patógenos causadores da mastite bovina, a OR apresentou melhor atividade antimicrobiana do que OE de *Copaifera* spp. ($p < 0,0001$). Porém, há necessidade de mais estudos, principalmente para se conhecer melhor a relação entre as estruturas químicas e as atividades biológicas dos seus componentes.

- ✓ O teste de antibiograma das três formulações fitoterápicas mostraram que a OR de *Copaifera* spp. reproduziu a sua atividade antimicrobiana frente aos microorganismos isolados.

- ✓ A formulação fitoterápica com OR de copaíba à 20% não foi eficaz e nem segura, pois a mesma intensificou o processo inflamatório, não sendo possível avaliar seu efeito antimicrobiano.

Perspectivas

6 PERSPECTIVAS

O presente trabalho abre perspectivas para que trabalhos futuros visem:

- ✓ Isolar componentes químicos da OR de copaíba e verificar se estão relacionados com a sua atividade antimicrobiana;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade e irritabilidade da OR de *Copaifera* spp. bem como, do veículo farmacêutico destinado à aplicação intramamária;
- ✓ Verificar qual a dose ideal de OR de *Copaifera* spp. para aplicação *in vivo*, a qual proporcione efeito anti-inflamatório local e antimicrobiano frente aos microorganismos causadores da mastite bovina, e que não agrida o tecido glandular mamário do animal;
- ✓ Testar novas formulações;
- ✓ Desenvolver e validar métodos para outros marcadores.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th ed. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007. 469 p.

ALENCAR, E. N. **Avaliação da atividade antimicrobiana de sistemas emulsionados contendo óleos naturais para o tratamento de infecções cutâneas**. 2013. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

ALENCAR, J. C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne- Leguminosae, na Amazônia Central. 2- Produção de óleo-resina. **Acta Amazonica**, v.12, n.1, p. 75-89, 1982.

ALMEIDA, A. C. et al. Tratamento de mastite subclínica em bovinos utilizando bioterapia. **Revista da Universidade de Alfenas**, v. 5, p.199-203,1999.

ALVES, T. M. A. et al. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.3. p.367-373, 2000.

AMARAL, A. C. F.; SIMÕES, E. V.; FERREIRA, J. L. P. **Coletânea científica de plantas de uso medicinal**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2005. 220 p.

AMARAL, F.; PAULA, J.; PAULA, J. R. **Protocolo experimental- atividade antibacteriana. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)- método da microdiluição em caldo**. Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009. 5p.

ANDRADE, M. A. et al. Prevalência e etiologia de mastite bovina subclínica em propriedades do Estado de Goiás que utilizam ordenhadeiras na obtenção do leite. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, v. 28, n.1, p. 29-42, 1998.

ARAÚJO, W. P. Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**,v.35, n.4, p.161-165, 1998.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils- A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.

BAPTISTA, P.; LINHARES, M. **Higiene e Segurança Alimentar na Restauração**. v.1. 1 ed. Editora Forvisão-Consultoria em Formação Interação, 2005. 128p. Disponível em:<http://www.esac.pt/noronha/manuais/restaura%C3%A7%C3%A3o_VOL_1.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2013.

BARBALHO, T. C. F.; MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.2, n.2, p.31-36, 2001.

BARBOSA, K. S.; SCUDELLER, V. V. Distribuição das espécies do gênero *Copaifera* L. na Amazônia Legal e aspectos morfológicos de *C. multijuga* Hayne da Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé, Manaus-Am. In: SANTOS-SILVA, E. N.; SCUDELLER, V. V. **Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central**. v.2, Manaus: UEA Edições, 2009.

BARDAL, D. **Atividade antimicrobiana de barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (MARTIUS) COVILLE em agentes causadores da mastite**. 2011. 181 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claro, 2011.

BARON, E. J.; PETERSON, L. R.; FINEGOLD, S. M. **Diagnostic microbiology**. 7. ed. Missouri: Editora Mosby, 1994. 914p.

BIAVATTI, M. W. et al. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.230-235, 2006.

BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 453 p.

BRAGA, M. D.; SILVA, C. C. M. Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Copaifera langsdorffii* Desf. sobre *Staphylococcus aureus*. **Unimontes Científica**, v.9, n.1, p.91-97, 2007.

BRANCHER, C. C.; FAGUNDES, C. M. Adaptação do método da redutase para detectar antibióticos no leite. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.2 n.2, p.80-84, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Deteção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. Módulo V, 2004. 93p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/microbiologia/mod_5_2004.pdf>. Acesso em: 15 set. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**, 5 ed., v.1, Brasília, 2010. 524p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. 1 ed. Brasília, 2011. 126p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf>. Acesso em 20 set. 2013.

BRASIL. **Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. 1 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926. Disponível em: <http://www.crf-mt.org.br/arqs/materia/1468_a.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução 899**, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 25 jun. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS- Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais**. Brasília, 2009. 2p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=3078>. Acesso em 20 set. 2012.

BRITO, J. R. F.; SALES, R. O. Saúde do Úbere. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.01, n.01, p.67-87, 2007.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. E.; MENDONÇA, L. C. Mastite e Qualidade do Leite. In: CAMPOS, O. F.; MIRANDA, J. E. C. Coleção 500 perguntas e 500 resposta. Gado de leite. O produtor pergunta, a Embrapa responde. **Embrapa**. 3 edição revista e ampliada, Brasília, 2012. p.314. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/929737/4/gadodeleite.pdf>>. Acesso em: 05 set. 2013.

BRITO, M. A. V. P.; CAMPOS, G. M. M.; BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para identificação de Estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.79-82, 2002.

BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C. Resíduos de antibióticos no leite. Comunicado Técnico. **Embrapa**. Juiz de Fora, 2005. Disponível em: <<http://people.ufpr.br/~freitasjaf/artigos/antibioticoleite.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2012.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; DIAS FILHO, F. C. *Prototheca zopfii*: importante patógeno na etiologia da mastite bovina no Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.3, p.273- 283, 2006.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

CARVALHO, L. A. et al. Manejo Sanitário. **Embrapa Gado de Leite Sistema de Produção**, 2. 2002. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/manejo/mamite.html>>. Acesso em: 12 maio 2012.

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

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

CASTRO, J. A. M., et al. Variabilidade do perfil dos óleos de copaíba comercializado nas feiras de São Luís. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA (CBQ)-QUÍMICA E INOVAÇÃO: CAMINHO PARA A SUSTENTABILIDADE, 52°. **Anais...** Recife, 2012. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/7/394-13969.html>>. Acesso em: 10 maio 2013.

CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH- CDER (U.S. *Food and Drug Administration*). **Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods**. Rockville, MD: FDA, 1994. 30p. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2012.

CHAIBUB, B.A. et al. Composição química do óleo essencial e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.2, p.225-229, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Approved Standard- Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. NCCLS, Pennsylvania USA, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals**. Approved Standard-Third Edition. CLSI document M31-A3. Pennsylvania USA, 2008.

COLOMBO, M. et al. Otimização da extração de β -cariofileno a partir de nanoemulsões contendo óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) por meio de microextração em fase sólida acoplada à cromatografia gasosa (SPME-GC). In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (SIC- UFRGS), XXIII, 2011, Porto Alegre. **Resumo...** Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/48218/Poster_11087.pdf?sequence=2>. Acesso em: 12 set 2012.

COSTA, C. A. S. et al. Estudo preliminar da compatibilidade biológica dos cimentos de óxido de zinco e copaíba e óxido de zinco e eugenol. Avaliação histológica de implantes subcutâneos em ratos. **Revista de Odontologia**, v.25, n.1, p.19-26, 1996.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNADI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

CROTTI, A. E. M., et al. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n.2, p.287-292, 2006.

DALMASCHIO, G. P. **Caracterização de Compostos Polares no Petróleo por Espectrometria de Massas de Altíssima Resolução e Exatidão- ESI(±)-FT-ICR MS**. 2012. 87p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.

DANTAS, S. A. F. et al. Avaliação de plantas medicinais no combate a mastite bovina. **Holos**, ano 25, v.4, p.96-102, 2009.

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.

DINIZ, M. E. R. **Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas**. 2011. 108p. Dissertação (Mestrado em Química-Química Analítica). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

FACHIN, A. L. et al. Associação Farmacêutica Fitoterápica, Composição Farmacêutica Fitoterápica, Processo de Preparação de Composição Farmacêutica Fitoterápica e seus usos veterinários. Depósito de Patente- PI 1005541-0 A2, 2012. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/portal/>>. Acesso em: 02 jul. 2013.

FAGRON. Pytobase™ Base Premium para Peles lesadas. 2013. Disponível em: <<http://www.fagron.com.br/>>. Acesso em: 17 set. 2013.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1102 p.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.3, 2006.

FERREIRA, J. F. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.2, p.261-266, 2007.

FIGUEIREDO, E. A. P. Pecuária e Agroecologia no Brasil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v.19, n.2, p.235-265, 2002.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. p. 175.

FREIRE, A. P. F. Utilização do óleo-resina de copaíba (*Copaifera paupera*) no tratamento preservativo da espécie sumaúma (*Ceiba pentandra*). **Revista Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, v.7, n.13, p.19-31, 2011.

FREITAS, M. F. L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no Agreste do Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

GALENA QUÍMICA E FARMACÊUTICA LTDA (GALENA®). Xalifin 15®. 2013. Disponível em: <<http://www.galena.com.br/>>. Acesso em 17 set. 2013.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.353-358, 2005.

GUIMARÃES, F. F.; LANGONI, H. Leite: alimento imprescindível, mas com risco para saúde pública. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p.38-51, 2009.

HECK, M. C.; VIANA, L. A.; VICENTINI, V. E. P. Importância do óleo de *Copaifera* sp. (Copaíba). **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.1, p.82-90, 2012.

HENRIQUES, A. T.; SIMÕES-PIRES, C. A.; APEL, M. A. Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CECHIMEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2 ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2003. 446p.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa Pecuária Municipal. 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 12 abr. 2012.

INJEBLOW INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA. 2013. Disponível em: <<http://www.injeblow.com.br/index.php>>. Acesso em: 15 set. 2013.

JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J. C.; BAERHEIM SVENDSEN, A. Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. **Planta medica**, p. 395-398, 1987.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 453 p.

LAFFRANCHI, A. et al. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p.1027-1032, 2001.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453-462, 2001.

LANGONI, H. et al. Aspectos etiológicos na mastite bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, n.5, p.204-210, 1998.

LARANJA, L. F.; MACHADO, P. F. Avaliação da efetividade de um programa de controle de mastite bovina em fazendas produtoras de leite B do Estado de São Paulo. **Scientia Agricola**, v.51, n.2, p.569-577, 1994.

LORCA, B. S. S. et al. Análise “in vitro” e “in vivo” do potencial irritante de tensoativos derivados de aminoácidos. **Revista Analytica**, v.32, p.80-83, 2007.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MARTINS, I. F. B.; SILVA, A. 2010. Influência do óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) no tratamento de ferida cutânea infeccionada. **Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental Online**, v.2 (Ed. Supl.), p.526-529, 2010. Disponível em: <<http://www.seer.unirio.br/index.php/cuidadofundamental/article/viewArticle/97>>. Acesso em: 15 jun. 2012.

MARTINS, R. P. et al. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.181-187, 2010.

MEDEIROS, E. S. et al. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.7, p.569-574, 2009.

MEDEIROS, R. S. **Sustentabilidade de extração, produção e características químicas do óleo-resina de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne), Manaus-AM.** 2006. 83 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba- *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2B, p.577-581, 2009.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v.26, n.4, p.556-563, 2003.

MOREAU, R. A.; PREISIG, C. L.; OSMAN, S. F. A rapid quantitative method for the analysis of sesquiterpene phytoalexins by high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.3, p.125-128, 1992.

MOTA, R. A. et al. Participação dos *Staphylococcus* spp. na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no Estado de Pernambuco (Brasil). **Ciência Animal Brasileiro**, v.13, n.1, p.124-130, 2012.

NADER FILHO, A. et al. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, n.1, p.1-4, 2007.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.108-113, 2007.

OHSAKI, A. et al. The isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, Copaiba. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.4, p.2889-2892, 1994.

OLIVEIRA, B. R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera* sp. e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti***. 2008. 128 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

OLIVEIRA, C. M. C. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.2, p.104-110, 2011.

OLIVEIRA, G. A. R. **Otimização dos processos de obtenção e secagem do extrato de alecrim**. 2013. 77 p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

OLIVEIRA, L. A. R. et al. Isolamento de marcadores químicos de *Pterodon* spp. por CLAE preparativa e validação de método analítico para sua quantificação. In: X CONPEEX- Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão. **Resumo...Goiânia**, 2013. Disponível em: <<http://eventos.ufg.br/certificado/visualizar/5D39F4ACAED7049B8460B46C6B96D025>>. Acesso em 12 nov. 2013.

OLIVEIRA, M. C. S. Doenças Infecciosas em sistema intensivo de produção de leite. **Embrapa Pecuária Sudeste**, São Carlos, p. 34, dez., 2006. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br/sites/default/files/principal/publicacao/Documentos50.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2012.

OLIVEIRA, U. V. et al. Ocorrência, etiologia infecciosa e fatores de risco associados à mastite bovina na microrregião Itabuna-Ilhéus, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, n.3, p.630-640, 2010.

OYARZABAL, M. E. B. **Aplicação do óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare*) no tratamento da mastite bovina e presença de fungos no leite bovino *in natura***. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

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, n. esp., p.123-124, 2006.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.102-107, 2007.

PAIVA, L. A. F. et al. Anti inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v.39, p.303-307, 2002a.

PAIVA, L. A. F. et al. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.62, p.73-78, 1998.

PAIVA, L. A. F. et al. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**, v.16, p.737-739, 2002b.

PAIVA, L. A. F. et al. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.51-56, 2004.

PEREIRA, A. V. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de jurema preta e nem sobre amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite em búfalas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.3, p.341-346, 2009.

PEREIRA, T. M. C. **Aplicações da Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier (FT-ICR MS) em Petrolômica**. 2013. 136p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

PERES NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras- revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano IX, n.16, 2011. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria16/revisao/RV17.pdf>>. Acesso em: 26 jul. 2012.

PIERI, F. A. et al. Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.1, p.241-244, 2012.

PIERI, F. A. et al. Efeitos clínicos e microbiológicos do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dental em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.3, p.578-585, 2010a.

PIERI, F. A. et al. Inhibition of *Escherichia coli* from mastitic milk by copaiba oil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, (Supl. 1), p.1929-1934, 2011.

PIERI, F. A., et al. Antimicrobial activity of autoclaved and non autoclaved copaiba oil on *Listeria Monocytogenes*. **Ciência Rural**, v.14, n.8, p.1797-1801, 2010b.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p.465-472, 2009.

PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam- uma revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia Veterinária e Agronomia**, v.9, n.1, p.118-132, 2002.

RADOSTITS O. M. et al. **Clínica Veterinária**: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002.1737p.

REGULAMENTO DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO relativo aos aditivos destinados à alimentação animal. N. 1831/2003. **Jornal Oficial da União Européia**, 2003.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO JÚNIOR, E. et al. Califórnia mastitis test (CMT) e whiteside como métodos de diagnóstico indireto da mastite subclínica. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.4, p.680- 686, 2008.

RIBEIRO, M. E. R. et al. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.3, p.287-290, 2003.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C. et al. 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.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C.; WADT, P. G.; WADT, L. H. O. Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina. **Embrapa**. Rio Branco, 2004. Disponível em: <<http://iquiri.cpaifac.embrapa.br/pdf/doc91.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2012.

SÁ, M. E. P. et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas 2004. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n.5, p.320-326, 2004.

SABOUR, P.M. et al. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.8, p.3449-3455, 2004.

SANTOS, A. O. et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.108, n.1, p.59-64, 2013.

SANTOS, A. O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.3, p.277-281, 2008b.

SANTOS, A. O. et al. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonenses*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.204-208, 2008a.

SCHUCH, L. F. D. **Plantas medicinais em atenção primária veterinária**: atividade antimicrobiana frente a bactérias relacionadas com mastite bovina e a dermatófitos. 2007. 206 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). **Boletim Setorial do Agronegócio-Bovinocultura leiteira**. Recife, 2010. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/setor/leite-e-derivados/Boletim%20Bovinocultura.pdf>>. Acesso em: 03 maio 2012.

SILVA, E. P. S. **Estudos dos óleos essenciais extraídos de resinas de espécies *Protium* spp.** 2006. 161p. Dissertação (Mestrado em Ciências- Química Analítica). Universidade de São Carlos, São Carlos, 2006.

SILVA, E. S. et al. Análise físico-química do óleo-resina e variabilidade genética de copaíba na Floresta Nacional do Tapajós. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.11, p.1621-1628, 2012.

SILVA, M. V. M.; NOGUEIRA, J. L. Mastite: controle e profilaxia no rebanho bovino. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano VIII, n.15, 2010. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria15/revisao/ANOIIIEDI15RL05.pdf>>. Acesso em: 24 mar. 2012.

SILVA, S. L., et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, v.38, n.1, p. 107- 112, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1102 p.

SOUZA, E. L. et al. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology and Technology- an International Journal**, v.48, n.2, p.245-250, 2005.

SOUZA, F. D. R. **O manejo do óleo-resina de *Copaifera* spp. realizado pelas etnias Arara (Karo rap) e Gavião (Ikolen) na Terra Indígena Igarapé Lourdes, Rondônia**. 2010. 86 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2010.

TAPPIN, M. R. R. et al. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v.27, n.2, p.236-240, 2004.

TEIXEIRA, P.; RIBEIRO, C.; SIMÕES, J. Prevenção de mamites em explorações de bovinos leiteiros- da teoria à prática. **Um ebook para veterinários, produtores e estudantes**. 2008. Disponível em: <<http://www.veterinaria.com.pt/>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

THOMPSON, J. E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 575p.

TRABULSI, L. R; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 718 p.

VASCONCELOS, A. F. F.; GODINHO, O. E. S. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. **Química Nova**, v.25, n.6B, p.1057-1060, 2002.

VASCONCELOS, K. R. F. et al. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18 (supl.), p.733-738, 2008.

VEIGA JR, V. F. et al. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. **Phytotherapy Research**, v.15, p.476-480, 2001.

VEIGA JR, V. F.; PATITUCCI, M. L. P.; PINTO, A. C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v.20, n.6, 1997.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne- A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p. 248-254, 2007.

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

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n.3, p.519-528, 2005.

VIANA, K. F. et al. Comparação da contagem de células somáticas em leite cru por quatro métodos de coloração. **Acta Veterinária Brasília**, v.4, n.1, p.59-63, 2010.

VIEIRA, J. N. et al. Ação de *Jatropha dioica* sobre bactérias isoladas de mastite bovina. In: XIX CIC, XII ENPOS, II MOSTRA CIENTÍFICA. **Anais...** Pelotas, 2010. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/cic/2010/cd/pdf/CB/CB_01170.pdf>. Acesso em: 05 maio 2012.

VILELA, D.; LEITE, J. L. B.; RESENDE, J. C. Políticas para o leite no Brasil: passado presente e futuro. In: ANAIS DO SUL- LEITE: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2002, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO- NUPEL, 2002. p. 1-26.

VOLTOLINI, T. V. et al. Influência dos estádios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 961- 966, 2001.

WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F. Emergence and transfer of antibacterial resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 84, E. Suppl., p.151-155, 2001.

WINN, W. et al. **Diagnóstico microbiológico- texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565 p.

ZAFALON, L. F. et al. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.1, p.56-65, 2008.

Anexo

ANEXO

ANEXO A- Nota fiscal da oleorresina (OR) de copaíba adquirida na Nutragyn Indústria de Alimentos LTDA

RECUEBIMOS DE NUTRAGYN INDUSTRIA DE ALIMENTOS LTDA OS PRODUTOS/SERVIÇOS CONSTANTES DA NOTA FISCAL INDICADA AO LADO		NF-e
		Nº 000.000.016
DATA DE RECEBIMENTO	IDENTIFICAÇÃO E ASSINATURA DO RECEBEDOR	SÉRIE: 1

 <p align="center">NUTRAGYN INDÚSTRIA DE ALIMENTOS LTDA</p> <p>RUA PAULO AFONSO, 609 - QUADRA 15 LT 03 - SÃO FRANCISCO, Goiânia, GO - CEP: 74455200 - Fone/Fax: 6230952999</p>	<p>DANFE Documento Auxiliar da Nota Fiscal Eletrônica</p> <p>0 - Entrada 1 - Saída</p> <p align="center">1</p> <p>Nº 000.000.016 SÉRIE: 1 Página 1 de 1</p>	<p>CONTROLE DO FISCO</p>  <p>CHAVE DE ACESSO 5212 0615 1004 0600 0113 5500 1000 0000 1610 0210 3308</p> <p>Consulta de autenticidade no portal nacional da NF-e www.nfe.fazenda.gov.br/portal ou no site da Sefaz Autorizadora</p>
	<p>NATUREZA DA OPERAÇÃO VENDA</p> <p>INSCRIÇÃO ESTADUAL 105271381 INSCRIÇÃO ESTADUAL DO SUBST. TRIB. CNPJ 15.100.406/0001-13</p>	

NATUREZA DA OPERAÇÃO VENDA		PROTÓCOLO DE AUTORIZAÇÃO DE USO 152120262968802 - 04/06/2012 16:19	
INSCRIÇÃO ESTADUAL 105271381	INSCRIÇÃO ESTADUAL DO SUBST. TRIB.	CNPJ 15.100.406/0001-13	

DESTINATÁRIO/REMETENTE			
NOME RAZÃO SOCIAL JOSE REALINO DE PAULA		CNPJ/CPF 762.141.176-72	DATA DA EMISSÃO 04/06/2012
ENDEREÇO UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, S/N -		BAIRRO/DISTRITO SETOR UNIVERSITÁRIO	DATA DE ENTRADA/SAÍDA 04/06/2012
MUNICÍPIO Goiania	FONE/FAX	UF GO	HORA DE ENTRADA/SAÍDA

FATURA
PAGAMENTO À VISTA

CÁLCULO DO IMPOSTO									
BASE DE CÁLCULO DO ICMS	0,00	VALOR DO ICMS	0,00	BASE DE CÁLCULO DO ICMS ST	0,00	VALOR DO ICMS ST	0,00	VALOR TOTAL DOS PRODUTOS	1.800,00
VALOR DO FRETE	0,00	VALOR DO SEGURO	0,00	DESCONTO	0,00	OUTRAS DESPESAS ACESSÓRIAS	0,00	VALOR DO IPI	0,00
								VALOR TOTAL DA NOTA	1.800,00

TRANSPORTADOR/VOLUMES TRANSPORTADOS						
RAZÃO SOCIAL	PRETE POR CONTA 9 - Sem Frete	CÓDIGO ANTT	PLACA DO VEÍCULO	UF	CNPJ/CPF	
ENDEREÇO	MUNICÍPIO		UF	INSCRIÇÃO ESTADUAL		
QUANTIDADE	ESPÉCIE	MARCA	NUMERAÇÃO	PESO BRUTO	PESO LÍQUIDO	

DADOS DO PRODUTO/SERVIÇO													
CODIGO	DESCRIÇÃO DO PRODUTO/SERVIÇO	NCM/SH	CST	CFOP	UNID.	QTD.	VLR. UNIT.	VLR. TOTAL	BC ICMS	VLR. ICMS	VLR. IPI	ALIQ. ICMS	ALIQ. IPI
012	ÓLEO VEGETAL DE COPAÍBA IN NATURA	1240006	0101	5101	LT 1	30,0000 30,0000	60,0000 60,0000	1.800,00					

CÁLCULO DO ISSQN			
INSCRIÇÃO MUNICIPAL 0000000	VALOR TOTAL DOS SERVIÇOS	BASE DE CÁLCULO DO ISSQN	VALOR DO ISSQN

DADOS ADICIONAIS	
<p>INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES</p> <p>EMPRESA OPTANTE PELO SIMPLES NACIONAL. NÃO GERA DIREITO DE IPI E ISS. CRÉDITO DE ICMS DE R\$ 22,50.</p>	RESERVA DO FISCO

Anexo B- Creme emulsão do tipo aniônica (Lanette®)



CERTIFICADO DE ANÁLISES

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.05486-1

PAG: 1

PRODUTO: 2573-LANETTE N
 LOTE FABRICANTE: 0008195784
 FABRICANTE: BASE THE CHEMICAL COMPANY
 PAIS DE ORIGEM: BRASIL
 PROCEDENCIA: BRASIL
 CLIENTE: THERAPEUTICA PHARMACIA DE MA
 C.A.S.: 67762-27-0 / 68955-20-4
 D.C.B.: N/A
 D.C.I.: N/A
 DATA DE ANÁLISE: 15/10/2012

LOTE_INTERNO: 044790

GRUPO.....: COSMETICO
 FABRICACAO: 23/02/2012 N.FISC: 74559
 VALIDADE...: 22/02/2014 QTD: 7,000

ENSAIOS REALIZADOS PELO FABRICANTE*

TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
Indice de hidroxila	187 a 205 mg/KOHg	200
pH (1% sol.)	6,5 a 8,0	6,7
Ativo anionico (PMM 360)	8,70 a 10,0%	10,0
Aparencia	Solido Pellets	De acordo
Cor	Branco a levemente amarelado	De acordo

ENSAIOS REALIZADOS PELA VIA FARMA-ORDEM DE FRACIONAMENTO: 44807*

TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
pH (1% sol.)	6,5 a 8,0	7,0
Aparencia	Solido Pellets	De acordo
Cor	Branco a levemente amarelado	Branco

REF.BIBLIOGRAFICA: O PRODUTO SEGUE METODOLOGIA DO FABRICANTE

REF.BIBL.VIA FARMA: FABRICANTE

ARMAZENAMENTO: MANTER HERMET.FECHADO/LOCAL SECO E AREJADO.
 ADV.SEGURANCA: NAO SE APLICA
 CONCLUSAO.: APROVADO

ESTE DOCUMENTO E UMA COPIA DO ORIGINAL !
 SE HOVER DUVIDA ENTRE EM CONTATO C/ NOSSO DEPTO.TECNICO.

Karina Pontes Marinho

Farmacêutica - Responsável CRF-SP: 30.263

A assinatura é válida somente quando o mesmo estiver acompanhado da nota fiscal.

É importante manter este certificado em seus arquivos para eventuais consultas. Dúvidas e informações complementares, favor contatar nosso Controle de Qualidade pelo telefone: (11) 2067-5713

Anexo C- Creme emulsão do tipo não-iônica (Polowax®)



CERTIFICADO DE ANÁLISES

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.05486-1

PAG: 1

PRODUTO: 937-POLAWAX NF-PA-(BR) (CRODA)

LOTE FABRICANTE: 0000675046

LOTE_INTERNO: 043598

FABRICANTE: CRODA

PAIS DE ORIGEM: BRASIL

GRUPO.....: COSMETICO

PROCEDENCIA: BRASIL

FABRICACAO: 20/06/2012 N. FISC: 68347

CLIENTE: TERAPEUTICA PHARMACIA DE MA

VALIDADE...: 20/06/2014 QTD: 5,000

D.C.B.: N/A

D.C.I.: N/A

DATA DE ANALISE: 12/07/2012

ENSAIOS REALIZADOS PELO FABRICANTE:

TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
Cor	Branco a creme	De acordo
Odor	Caracteristico	De acordo
Indice de acidez	Max. 1,0 mg KOH/g	0,15
Indice de hidroxila	178 a 192 mg KOH/g	185,32
Indice de iodo (Wij's)	Max. 3,5 g I2/100g	0,12
Indice de saponificacao	Max. 14 mg KOH/g	9,97
Ponto de fusao	50 a 54 °C	53,0
Aspecto	Pastilhas	De acordo
pH (Sol. 3%)	5.50 a 7.00	6,23

ENSAIOS REALIZADOS PELA VIA FARMA-ORDEM DE FRACIONAMENTO: 44395:

TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
Cor	Branco a creme	Branco
Indice de acidez	Max. 1,0 mg KOH/g	0,16
Indice de iodo (Wij's)	Max. 3,5 g I2/100g	0,04
Indice de saponificacao	Max. 14 mg KOH/g	10,7
Ponto de fusao	50 a 54 °C	52
Aspecto	Pastilhas	De acordo
pH (Sol. 3%)	5.50 a 7.00	6,27

REF. BIBLIOGRAFICA: O PRODUTO SEGUE METODOLOGIA DO FABRICANTE

REF. BIBL. VIA FARMA: FABRICANTE

ARMAZENAMENTO: MANTER HERMET. FECHADO / MANTER EM LOCAL SECO E AREJADO

ADV. SEGURANCA: NAO SE APLICA

CONCLUSAO.: APROVADO

ESTE DOCUMENTO E UMA COPIA DO ORIGINAL !
SE HOVER DUVIDA ENTRE EM CONTATO C/ NOSSO DEPTO. TECNICO.

Karina Pontes Martinho

Farmacêutica - Responsável CRF-SP: 30.263

A assinatura é válida somente quando o mesmo estiver acompanhado da nota fiscal.

É importante manter este certificado em seus arquivos para eventuais consultas. Dúvidas e informações complementares, favor contatar nosso Controle da Qualidade pelo telefone: (11) 2067-5713

Anexo D- Conservante antimicrobiano (Nipagin®)



CERTIFICADO DE ANÁLISES

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.05486-1

PAG: 1

PRODUTO: 164-NIPAGIN (METILPARABENO)
 LOTE FABRICANTE: M110813
 FABRICANTE: TAIZHOU NUERCHENG
 PAIS DE ORIGEM: CHINA
 PROCEDENCIA: BRASIL
 CLIENTE: THERAPEUTICA PHARMACIA DE MA
 NOME QUIMICO: METILPARABENO
 FORMULA MOLECULAR: C8H8O3
 PESO MOLECULAR: 152,15
 C.A.S.: 99-76-3
 D.C.B.: 05809
 D.C.I.: N/A
 DATA DE ANALISE: 16/02/2012

LOTE_INTERNO: 041914

GRUPO.....: INSUMO FARM.
 FABRICACAO: 13/08/2011 N. FISC: 66591
 VALIDADE...: 12/08/2014 QTD: 2,001

ENSAIOS REALIZADOS PELO FABRICANTE:

TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
Aparencia	Po cristalino	De acordo
Cor	Branco	De acordo
Aparencia da solucao	Limpida	De acordo
Identificacao	Passa teste BP 2002	De acordo
Ponto de fusao	125 a 128 °C	125,8-126,
Acidez	Max. 0,1 mg/g	<0,1
Cinzas sulfatadas	Max. 0,1%	0,05
Substancias relatadas	Passa teste (UV em 254 nm)	De acordo
Teor	99,0 a 101,0%	99,31
Solubilidade	Facilmente soluvel em alcool, eter, acetona e levemente soluvel em agua	De acordo

ENSAIOS REALIZADOS PELA VIA FARMA-ORDEM DE FRACIONAMENTO: 43848:

TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
Aparencia	Po cristalino	De acordo
Cor	Branco	De acordo
Aparencia da solucao	Limpida	De acordo
Identificacao	Passa teste BP 2002	De acordo
Ponto de fusao	125 a 128 °C	126
Acidez	Max. 0,1 mg/g	<0,1
Cinzas sulfatadas	Max. 0,1%	0,0
Teor	99,0 a 101,0%	100,6
Solubilidade	Facilmente soluvel em alcool, eter, acetona e levemente soluvel em agua	De acordo

REF. BIBLIOGRAFICA: O PRODUTO SEGUE METODOLOGIA BP 2002

REF. BIBL. VIA FARMA: BP 2002

ARMAZENAMENTO: MANTER HERMET. FECHADO/LOCAL SECO/AREJADO/ABRIGO DA LUZ

ADV. SEGURANCA: NAO SE APLICA

CONCLUSAO.: APROVADO

ESTE DOCUMENTO E UMA COPIA DO ORIGINAL
 SE HOVER DUVIDA ENTRE EM CONTATO C/ NOSSO DEPTO. TECNICO.


 Karina Pontes Martinho
 Farmacêutica Responsável CRF-SP: 30.263


 Léia Fontes Rios
 Farmacêutica Responsável pela Unidade da
 Qualidade CRF-SP: 49372

As assinaturas são válidas somente quando o mesmo estiver acompanhado da nota fiscal

Anexo E- Conservante antimicrobiano (Nipazol®)



CERTIFICADO DE ANÁLISE DO CONTROLE DA QUALIDADE

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.01284-7
 Autorização Especial de Funcionamento M.S.: 1.20182-2

Página 18/25
 Impressão 19/06/12 17:02
 NF. 262.071 de 19/06/2012

Insumo: NIPAZOL (Propil Parabeno) BP/USP/NF

Lote : 20110219 #6 / Origem : China Fabric : 19/02/2011
 Lote Fab: 20110219 Procedencia : China Validade : 18/02/2014
 Formula : C10 H12 O3 PM : 180,2
 DCB : DCI : N.D. CAS : 94-13-3 Frac: 608273 16/06/2012

Categoria Terapeutica: ADJUVANTE FARMACOTÉCNICO, CONSERVANTE DE FASE OLEOSA EM (COSMETICO)

Ensaio	Especificação	Resultado
* DESCRIÇÃO	PÓ CRISTALINO BRANCO. (BP)	DE ACORDO
* SOLUBILIDADE	- MUITO POUCO SOLÚVEL EM ÁGUA. (USP/ EP) - FACILMENTE SOLÚVEL EM ÁLCOOL, METANOL E ÉTER. (USP/ EP) - POUCO SOLÚVEL EM ÁGUA FERVENTE. (USP)	DE ACORDO
* IDENTIFICAÇÃO	A) PONTO DE FUSÃO: 96°C - 99°C.	99°C
*	A) POR ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO. (USP) D) REAÇÃO DE COR. (BP)	DE ACORDO
* DOSEAMENTO	98,0% - 102,0% (POTENCIOMETRIA)	100,29%
* ACIDEZ	MÁXIMO 0,1 mL NaOH 0,1 M. (USP/BP)	0,1mL NaOH
* DENSIDADE	APARENTE	0,8431 g/mL
* CINZA SULFATADA	MÁXIMO 0,1%. (USP/ BP)	0,03%
* AP. DA SOLUÇÃO	A SOLUÇÃO É CLARA E NÃO MAIS INTENSA QUE A COR DE REFERÊNCIA BY6.	DE ACORDO
	ENSAIOS ADICIONAIS REALIZADOS PELO FABRICANTE	
SUBS. RELATADAS	ULTRAVIOLETA EM 254 nm.	DE ACORDO
IMP.ORG.VOLÁTIL	CUMPRE COM REQUERIMENTO.	DE ACORDO

MONOGRAFIA : BP 2008 PÁG. 1837 E 1838.
 USP 32 PÁGS. 928,1329 E 1330.
 LAUDO ORIGINAL DO FABRICANTE CUMPRE COM BP2000 /USP24 /NF19.
 NOMENCLATURA : NIPAZOL (Propil Parabeno)
 NOME QUÍMICO : Propyl 4-hydroxybenzoate.


Ficha de Segurança

SEGURANÇA : CONSERVAR EM RECIPIENTE BEM FECHADO. ARMAZENAR EM TEMPERATURA ABAIXO DE 40°C, PROTEJA DA LUZ.

Parecer Técnico : DENTRO DOS ITENS PESQUISADOS, O LOTE CUMPRE COM AS ESPECIFICACOES

OBS: (*)Os ensaios assinalados foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade FAGRON e os demais estão em conformidade com o Certif.de Análise do Fabricant.

Fagron Compounding


 Dra. Kelly Cristina de Lima Oliveira
 Farmacêutica Responsável Técnica
 CRF-SP: 52.472

As assinaturas são válidas somente quando acompanhadas de nota fiscal

Fagron do Brasil Farmacêutica Ltda.

Rua: Jurupari, 775 - Jd. Oriental - São Paulo - SP Cep 04348-070
 Tel.:11 5033-3700 - Fax: 11 5033-3711 - fagron@fagron.com.br / www.fagron.com.br / www.compoundingmatters.com

Anexo F- Notificação de aprovação do projeto pela CEUA/ UFG

Prezada Pesquisadora Maria Juíva Marques de Faria,

comunicamos que o Protocolo n. 063/12, intitulado *Extração de Bioprodutos de Plantas do Cerrado e Aplicação na Produção Animal Sustentável (SAPP 036682)*., foi **Aprovado** pela *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-PRPPG-UFG*.

Reiteramos a importância desse Parecer Consustanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFG um *Relatório Final* baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONSEA.

Atenciosamente,

■

--

.....
Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG
Universidade Federal de Goiás/UFG
(62)3521-1215

Apêndice

APÊNDICE

Apêndice A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), preconizado pelo CEUA/ UFG assinado pelo responsável da granja leiteira.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Maria Juíva Marques de Faria, sou Farmacêutica-Bioquímica e aluna no programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas na Universidade Federal de Goiás (UFG), atuo na área de PD&I de bioprodutos.

Após ler com atenção este documento e ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine em todas as folhas, as quais estão em duas vias. Ressaltando que, também será assinado por mim, os pesquisadores. Uma das vias é sua e a outra é dos pesquisadores responsáveis.

Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis, Maria Juíva Marques de Faria (Faculdade de Farmácia/ UFG), Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição (Faculdade de Farmácia/ UFG), Prof. Dr. José Realino de Paula (Faculdade de Farmácia/ UFG) e Prof. Dra. Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga (Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/ UFG). Telefones de contato: 3209-6183 e 3209-6361. Em caso do animal que participará dos experimentos passar por alguma intercorrência nos finais de semana, telefone de contato pessoal: (62) 8301-0803 e (62) 9134- 0977.

Em caso de dúvidas sobre os seus direitos de proprietário (a) dos animais nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: (62) 3521-1215 ou no endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II)- CEP:74001-970, Goiânia – Goiás.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ PRECISA SABER SOBRE A PESQUISA:

- Título: Desenvolvimento de um bioproduto a partir de oleorresina de copaíba (*Copaifera sp*) para o tratamento de mastite bovina.

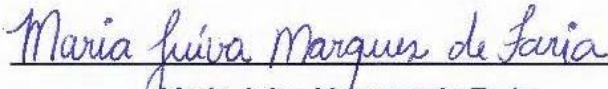
Pesquisadores Responsáveis: Maria Juíva Marques de Faria, Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição, Prof. Dr. José Realino de Paula e Profª Drª Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga. Telefones de contato: 3209-6182; 3209-6361. Em caso do animal que participará dos experimentos passar por

alguma intercorrência nos finais de semana, telefone de contato pessoal: (62) 8301-0803 e (62) 9134- 0977.

- **Objetivos da pesquisa:** Desenvolver um bioproduto a partir da oleorresina de copaíba (*Copaifera sp*) com proposta de tratamento alternativo para mastite bovina.
- **Quem participará do projeto:** Vacas de raças variadas, sem o uso de qualquer tipo de medicação, aparentemente saudáveis, podendo ser primíparas ou pluríparas, de idade variada e no máximo com 2/3 do estágio de lactação.
- **Detalhe do procedimento:** Para iniciar os testes precisará da autorização do (a) proprietário (a). Serão utilizados no total 30 animais, dos quais 10 serão submetidos ao tratamento com a formulação de oleorresina de copaíba, 10 serão tratados com medicamento do mercado (controle positivo) e 10 serão o grupo controle placebo, o qual receberá o veículo do bioproduto sem princípio ativo para verificar que os supostos efeitos são produzidos somente pela oleorresina de copaíba.
- **Métodos empregados para promover o bem-estar físico e mental dos animais:** Os animais serão alojados em locais em que já estão habituados, com alimentação e água à vontade para suprirem suas exigências nutricionais. Os mesmos não serão isolados, tendo próximos e à vista os demais indivíduos de seu grupo. Durante o período de tratamento com o bioproduto, os animais que apresentarem piora no quadro clínico serão retirados do experimento e tratados com produtos do mercado. Todos os colaboradores, assim como o (s) proprietário (s) da granja leiteira, serão instruídos para adotarem práticas de manejo racional na lida com os animais.
- **Destino dos animais após a experimentação:** Os animais não serão eutanasiados e permanecerão nas dependências das propriedades rurais a que pertencem. Logo, os proprietários não terão nenhum prejuízo quanto aos mesmos.
- **Benefícios e riscos que poderão ser obtidos:** Benefício para propriedade leiteira: realizará triagem do leite por meio do teste de *California Mastitis Tests* (CMT) e *Wisconsin Mastitis Test* (WMT) de todas as vacas em período de lactação. Já em relação ao teste com o bioproduto, acredita-se que os riscos

serão mínimos, visto que já se sabe o efeito antimicrobiano da oleoresina de copaíba. Já os benefícios serão imensos, principalmente se o medicamento tiver efeito e não deixar resíduo no leite dos tetos não tratados, se tornando uma excelente opção de tratamento para o produtor.


- Cronograma (Período estabelecido para coleta de dados ou duração do experimento): A parte experimental e as coletas de dados serão realizadas de janeiro a novembro de 2013.
- Não haverá qualquer despesa para o proprietário com a participação nesta pesquisa, nem haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela sua participação na mesma.
- O proprietário (a) da granja leiteira tem a inteira liberdade de não aceitar a participar do projeto, bem como de retirar o consentimento no desenvolvimento da pesquisa.
- Ao término do projeto, o proprietário (a) será informado (a) dos resultados obtidos.



Maria Juíva Marques de Faria



Prof Dr. Edemilson Cardoso da Conceição



Profª Drª Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga



Prof. Dr. José Realino de Paula

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA
PESQUISA**

Eu, Edemilson Cardoso da Conceição,
 RG 4969296, CPF 738 888 443 00, abaixo assinado, por
 concordar em participar do estudo **Desenvolvimento de um bioproduto a
 partir de oleorresina de *Copaifera sp* para o tratamento de mastite bovina**,
 sob a responsabilidade da Maria Juíva Marques de Faria, Prof. Dr. Edemilson
 Cardoso da Conceição e Prof. Dra. Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga,
 como proprietário dos animais utilizados nos estudos. Fui devidamente
 informado (a) e esclarecido (a) pela Maria Juíva Marques de Faria sobre a
 pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e
 benefícios decorrentes da participação dos animais. Foi me garantido que
 posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à
 qualquer penalidade.

Local e data

Goiânia, 10 Janeiro de 2013

Nome e assinatura do proprietário da granja leiteira:

Edemilson Cardoso da Conceição

Nome e assinatura do Pesquisador Responsável:

Maria Juíva Marques de Faria

Maria Juíva Marques de Faria

Edemilson

Prof Dr. Edemilson Cardoso da Conceição


Prof.ª Dr.ª Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga


Prof. Dr. José Realino de Paula

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:

Nathália Rodrigues Santiago

Assinatura:

Nathália Rodrigues Santiago

Nome:

Emanuel Stalo Alves Campos

Assinatura:

Emanuel Stalo Alves Campos

Observações complementares: _____

