

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

MARCOS TÚLIO DA SILVA

**Caracterização Físico-química dos Óleos-resinas de  
*Copaifera multijuga* Hayne e Avaliação da Variabilidade  
Química de sua Fração Volátil**

Goiânia  
2016

MARCOS TÚLIO DA SILVA

**Caracterização Físico-química dos Óleos-resinas de *Copaifera multijuga* Hayne e Avaliação da Variabilidade Química de sua Fração Volátil**

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: Prof. Dr. José Realino de Paula

Co-orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

Goiânia  
2016

MARCOS TÚLIO DA SILVA

**Caracterização Físico-química dos Óleos-resinas de *Copaifera multijuga* Hayne e Avaliação da Variabilidade Química de sua Fração Volátil**

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: Prof. Dr. José Realino de Paula

Co-orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

Aprovado em Goiânia em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. José Realino de Paula

---

Prof. Dra. Joelma Abadia Marciano de Paula

---

Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges

**Principalmente aos meus pais, Marcos Antônio e Ester, e minha irmã Cristiene, exemplos de humildade e determinação e, por sempre me incentivarem em alcançar os meus objetivos. Aos meus familiares e amigos, aos mestres de hoje e de outrora, pelos ensinamentos e dedicação...**

**Dedico com amor este trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

*“Os mortos recebem mais flores do que os vivos porque o remorso é mais forte que a gratidão.”*

*O Diário de Anne Frank*

À Deus, Criador de todo universo e no que nele há. (*Colossenses* 1: 16)

Ser grato é também AMAR... Agradeço....

Com certeza não teria chegado onde cheguei sozinho. A minha vitória ou o meu sucesso não é individual mas, sim coletivo, existem e existiram pessoas que me ajudaram nessa longa jornada chamado Mestrado. Ufa, cheguei ao final de uma etapa.

Àos meus pais, Marcos e Ester, exemplos para mim em todos os aspectos. O que os pais não fazem pelos seus filhos? Sacrificam a si próprio, as suas vontades para ver aquele que é parte literalmente deles, ser bem sucedido e prosperar em tudo o que for fazer. AMO VOCÊS.

À minha irmã Cristiene, caçula, brigamos mas, sempre nos amamos. Acredito que sempre é assim com quem os tem, irmãos. Mesmo nova me dando conselhos. No momento mais difícil da minha vida, quando enfrentei um problema de saúde e passei por cirurgia, venceu o cansaço e não saiu do meu lado, no leito da enfermaria. Obrigado. Te amo “Terezinha” ...

À toda minha BIG FAMILY, minhas sinceras desculpas por estar ausente, em especial aos meus avós Antônio e Terezinha (paterno) e Maria de Fátima e João (materno). A onipresença é um atributo de Deus, só Ele pode estar em todos os lugares ao mesmo tempo. Então, peço perdão por ter faltado a tantos encontros dos Perereiras e Silva... Espero estar mais próximo de vocês... Com amor...

À minha amada e família Igreja Batista em Itatiaia, queridos irmãos em Cristo, amo vocês.

Aos meus amigos do bairro onde moro, Itatiaia: Taiguara (20 anos de amizade, carinho especial), Salmo, Gabriela, Liliane, Bruna, Samara, Priscilla, Fabrine, Alisson, Karla. Vocês pra mim são um tesouro precioso. Obrigado por tudo. Perdoem-me a ausência mas, o carinho continua o mesmo.

*“Aos Mestres ... “Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina” Cora Coralina.*

À pessoa do Prof. Dr. José Realino, que honra foi ter sido orientado pela sua pessoa. Tudo que eu disser aqui será pouco da grandeza e bondade que carrega em sua alma. Tentaram dizer coisas negativas ao meu respeito, contudo, não ouvindo nenhuma delas, me aceitou como seu aluno. Lembranças boas ficarão eternizadas em minha memória, obrigado professor, por cada momento e oportunidade de crescer não só profissionalmente, mas como

pessoa. Errei bastante, mas como carinho o senhor me ensinou o caminho “das pedras” com sua sabedoria e experiência de vida. Tantas coisas aconteceram... Viagens e mais viagens como a de Niquelândia, e durante a volta para casa ouvimos o Brasil, já desacreditado, perder o terceiro lugar para a Holanda... Viagens para Campestre, Goianésia, Mairipotaba. Enfim, em todas o senhor esteve a disposição para ajudar e oferecer do melhor para o bom andamento do trabalho. Deu-me oportunidades de escolhas. Quando precisei escolher onde ficar, me lembro como se fosse hoje: “O que você decidir darei o meu apoio.” Poderia ficar aqui e descrever coisas das quais convivemos e sobre o senhor do tamanho dessa dissertação em forma de gratidão. Serei eternamente grato a sua pessoa. Obrigado pela oportunidade de trabalhar contigo. Ficará registrado em minha memória e em meu coração.

À pessoa do Prof. Dr. Edemilson Cardoso, do qual partiu a ideia de trabalhar com a minha “pedra do sapato” com a qual tenho uma relação de “amor e ódio” – A Copaíba. Mas, brincadeiras à parte, foi através do senhor que pude “desbravar terras manauaras”, porque a ideia de trabalhar com o óleo-resina de copaíba partiu de ti. Deus faz as coisas de uma forma que não conseguimos entender. E que ironia, o “cara” da copaíba Prof. Dr. Valdir, vem a Goiânia e a partir daí minha história tomou outro rumo. Lá vou eu pra Manaus trabalhar com o professor Valdir...Enfim, através de uma ideia sua meus horizontes em todos os sentidos foram abertos. Obrigado.

À pessoa da Profa. Dra. Rosa Helena que coordena o Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental (LabBBEx) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), que me cedeu as amostras de óleo-resina de copaíba. Obrigado pelo excelente trabalho que fizeram e da forma como padronizaram essas amostras. Espero, que o meu trabalho contribua com as cooperativas que tiram seu sustento dessa matéria-prima vegetal.

À pessoa do Prof. Dr. Valdir, gratidão por ter me dado a oportunidade de trabalhar com ele no seu Laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônia (QbiomA). Foi enriquecedor. Quantas experiências vividas e que me fizeram crescer profissionalmente e como pessoa. O quanto aprendi a amar a sua “menina dos olhos” – A copaíba. De coração. Obrigado!

Às professora Tatiana Fuiza e Leonice Manrique. Pela paciência, insistência para fazer com que todo meu trabalho de bancada, chegasse aqui na forma de dissertação. Agradecido pela dicas e correções para que este trabalho estivesse o melhor possível. Agradecido.

Ao amigo MSc. Elvisclay, que contribui muito com meu trabalho. Imensamente grato.

Ao amigo e Prof Dr. Leonardo Luiz que me ajudou muito tanto na parte de correção da dissertação, quanto na estatística do trabalho... “É pra ontem Tulião” como ele diz.... Obrigado Léo.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) e do Laboratório de PD&I de Bioprodutos da FF/UFG, Mariana (minha amiga que me acompanha desde de 2007 no cursinho, antes entramos na UEG e sermos colegas de profissão e amiga de tantos conselhos..rs), Suzana (quantas coisas vivemos, ficará pra história), Fabiolinha rs obrigado pelos conselhos e almoços juntos, Nathalia Pedroso, Luisa, Mythali, Karen, Rejanne, Nayara, Sônia Julia, Aline, Leandra, Rubia, Pollyana. Me perdoem se estiver esquecendo de alguém mas, obrigado por fazer parte dessa família. Amo vocês.

À Prof. Dra. Carla Afonso parceira de leitura de muitos livros. Aprendi muito com a senhora. E aos amigos que fiz no IPTSP, Débora, Veraluce, Nayara, Priscila e Acácio obrigado pela amizade.

À Maria Juiva (Chuchu), obrigado pela grande ajuda com nossa amiga “copaíba”... Obrigado por tudo que você me passou com tanto carinho.

Ao meu amigo Pedro que desde 2009 me acompanha. És um amigo que guardo do lado esquerdo do peito. Passamos por muitas lutas e um sempre ao lado do outro pra dar o apoio necessário. Uma amizade que só pelo olhar já sabia o que que cada um estava dizendo. Te devo muito, te amo meu amigo!

Minha prima Jhéssica e amiga Luane, parceiras de mestrado.

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

À Dona Glórinha, Gisele pelo bom dia e pelo sorriso de todos os dias.

Aos amigos do Laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônia (QbiomA). Gente! O que foi isso? Amei trabalhar com vocês. Altas aventuras. Quanta coisas aprontamos juntos... Minhas mucuras (um tipo de gambá lá do Amazonas) e mucurões como nos chamávamos carinhosamente. Quero agradecer a Jésika (noites sem dormir um ajudando um ao outro), Virlaneeee, Isadora, Orlando, Yasmim, Larissa (Pudim), Alanne, Nathália (Loira), Leandro (Tesouro), Vitória, Simoneeee, Glaucia, Karen's, Fábio (meu parceiro da copaíba, sofremos juntos rs), Priscilla's, Fred, Klenicy, Rosa, Erick, Milena, Davi, Jean, Rosilene, Roseane.. a todos meu muito obrigado.

À Valéria Mourão que me ajudou muito em Manaus a primeira vez que fui...Obrigado.

Ao Weider Seruia. Gratidão por toda ajuda meu amigo!

Ao meu amigo Lamarão, quanta gratidão, palavras não expressam a alegria de ser seu amigo. Sem pesar no coração recebeu de forma tão carinhosa em sua casa e em sua vida. Me levou pra conhecer Manaus (apesar de ser paraense kkkkkk). Também Presidente Figueredo (o paraíso das cachoeiras do Amazonas). Me fez conhecer a titia “Tal Qual dublagens”...Quantas risadas nós demos, neh? “Rente, nor tarra aqui farréatempo, maninho” linguajares que só se aprende vivendo em Manaus. Por tudo, o meu muito obrigado!

À família da Igreja Batista Regular em Cachoeirinha, que me recebeu de uma forma tão carinhosa, que é inexplicável o quanto o amor de Cristo está presente em cada um. Em especial a família do seu Jetro e Lorema, Davi e André seus filhos, que me receberam e me acolheram como um filho dentro de sua casa. Ao filho deles em especial, Davi, que se tornou para mim um irmão. Quantas coisas pudemos dividir juntos...agústias, dores, alegrias, aprendemos juntos mais de Deus. Momentos de lazer qdo íamos eu você e Isadora comer sushi rrsr... Meu amigo, muitíssimo obrigado...

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

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

*"O verdadeiro ensinamento pode ser terrivelmente perigoso. O Mestre tem nas mãos o mais íntimo dos seus alunos, a matéria frágil e incendiária das suas possibilidades - toca na alma e nas raízes do ser, um ato no qual a sedução erótica, por metafórica que seja, é o aspecto de menor importância. Ensinar sem uma grave apreensão, sem uma reverência perturbada pelos riscos envolvidos, é uma frivolidade. Fazê-lo sem considerar as possíveis consequências individuais e sociais é cegueira. O grande ensino é aquele que desperta dúvidas, que encoraja a dissidência, que prepara o aluno para a partida ("Agora deixa-me" ordena Zarathustra). No final, um verdadeiro Mestre deve estar só."*

**George Steiner, *As Lições dos Mestres*.**

## RESUMO

O gênero *Copaifera* pertence à família Fabaceae e possui 72 espécies distribuídas em regiões de clima tropical da América e África Ocidental. No Brasil existem 16 espécies endêmicas, destacando-se pela maior ocorrência: *Copaifera officinalis* L., *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera confertiflora* Benth., *Copaifera langsdorffi* Desf., *Copaifera coriacea* Mart. e *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke. Do tronco das *Copaiferas* se extrai um óleo-resina a qual se atribuí ações anti-inflamatória, antimicrobiana, cicatrizante de úlceras e feridas em geral. Na composição química do óleo-resina de copaíba destacam-se uma fração volátil composta principalmente por hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados e uma fração resinosa composta por diterpenos ácidos. A carência de parâmetros eficazes para caracterizar e, por conseguinte realizar o controle de qualidade, atrelado à variabilidade química intrínseca do óleo-resina comprometem a comercialização dessa matéria-prima para indústria farmacêutica. Dentre as espécies mais estudadas, a *Copaifera multijuga* Hayne, conhecida como copaíba, mari mari, copaíba roxa, é utilizada pelas suas propriedades anti-inflamatórias e foi objeto desse estudo. Este trabalho teve como objetivos caracterizar óleos-resinas de *C. multijuga* por métodos físicos e químicos, visando parâmetros que possam ser utilizados no controle de qualidade. O capítulo 1 apresenta a variabilidade química do óleo essencial obtido do óleo-resina de 11 espécimes de *C. multijuga* coletados em Santarém/Pará, analisados por CG-EM; a análise de parâmetros físicos (densidade, índice de refração e viscosidade) e químicos (identificação e quantificação do marcador  $\beta$ -cariofileno por CLAE) bem como análise do óleo essencial, o isolamento e identificação de diterpenos de uma amostra de óleo-resina de *C. multijuga*. A densidade e o índice de refração se mantiveram constantes enquanto que a viscosidade variou entre os espécimes. O teor de  $\beta$ -cariofileno identificado e quantificado por CLAE variou de 22,4 a 75,1%. No óleo essencial, os compostos majoritários foram o  $\beta$ -cariofileno, o  $\alpha$ -humuleno e as análises estatísticas multivariadas agruparam os 11 espécimes em dois clusters em relação aos compostos  $\delta$ -elemeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, *trans*-cadina-1(6),4-dieno, *trans*-muurolo-4(14),5-dieno. As análises estatísticas realizadas mostraram uma alta variabilidade química entre indivíduos da mesma espécie de *C. multijuga*, mesmo as amostras tendo sido coletadas próximas uma das outras e na mesma época do ano. Os diterpenos isolados do óleo-resina de *C. multijuga* foram o ácido copálico, 3-hidróxi-copálico, o 3-acetóxi-copálico e o *ent*-agático.

**Palavras-chave:** *Copaifera multijuga*. CLAE.  $\beta$ -cariofileno. Diterpenos. Óleo essencial.

## ABSTRACT

The genus *Copaifera* it belongs to the family Fabaceae, this genus it has 72 species distributed in tropical regions of America and West Africa. In Brazil there are 16 endemic species, highlighting: *Copaifera officinalis* L., *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera confertiflora* Benth., *Copaifera langsdorffi* Desf., *Copaifera coriacea* Mart. and *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, as the most studied. Of The trunk of *Copaiferas* extracted an oil-resin which is attributed anti-inflammatory actions, antimicrobial, healing ulcers and wounds in general. In the chemical composition of copaiba oil-resin stand out a volatile fraction mainly composed of sesquiterpene and sesquiterpene hydrocarbons and oxygenates a resinous fraction consisting of diterpene acids. The lack of effective parameters to characterize and therefore realize the quality control, linked to the intrinsic chemical variability of oil-resin undertake the commercialization of this raw material for pharmaceutical industry. Among the most studied species, the *Copaifera multijuga* Hayne, known as copaíba, mari mari, purple copaíba, is used for its anti-inflammatory properties and was the subject of this study this work. This study aimed to characterize oils-resins of *C. multijuga* through physical and chemical methods, aiming at quality control parameters. The Chapter 1 presents the chemical variability of the essential oil obtained from 11 specimens of oil-resin of *C. multijuga* collected in Santarém / Pará, analyzed by GC-MS; analysis of physical parameters (density, refractive index and viscosity) and chemical (identification and quantification of  $\beta$ -caryophyllene marker HPLC) in the oils-resins samples, essential oil analysis from oil-resin as well as the isolation and identification of diterpenes in a sample oil-resin of *C. multijuga*. The density and the refractive index remained constant while the viscosity ranged between specimens. The  $\beta$ -caryophyllene content identified and quantified by HPLC ranged from 22.4 to 75.1%. In the essential oil, the major compounds were  $\beta$ -caryophyllene, the  $\alpha$ -humuleno and multivariate statistical analyzes grouped the 11 specimens in two clusters in relation to compounds,  $\delta$ -elemene,  $\alpha$ -copaene,  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -humuleno, *trans*-cadinane-1(6),4-diene and *trans*-4-muurolo(14),5-diene. Statistical analysis realized out showed a high chemical variability between individuals of the same species of *C. multijuga* even the samples have been collected close to each other and in the same period of year. The diterpenes isolates of oil-resin of *C. multijuga* were the copalic acid, 3-hydroxy-copalic, 3-acetoxy-copalic and *ent*-agático.

**Keywords:** *Copaifera multijuga*. HPLC.  $\beta$ -caryophyllene. Diterpenes. Essential oil

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução Geral

**Figura 1.** Em destaque as regiões do mundo onde é encontrado o gênero *Copaifera*.....15

### Capítulo 1

**Figura 2.** Localização geográfica dos 11 espécimes de *Copaifera multijuga*. .....33

**Figura 3.** Fluxograma da cromatografia em coluna aberta com sílica impregnada com KOH 10%.....37

**Figura 4.** Análise de agrupamento hierárquico (HCA). Dendrograma dimensional representando a similaridade entre a composição química dos óleos essenciais dos onze óleos-resinas de *Copaifera multijuga* coletados em Santarém/PA. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 5.** Distribuição das amostras de *Copaifera multijuga*, em relação aos compostos encontrados no óleo essencial do óleo-resina ( $\delta$ -elemeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, *trans*-cadina-1(6),4-dieno e *trans*-muurolo-4(14),5-dieno). **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 6.** Perfil cromatográfico 2D da amostra de óleo-resina de *Copaifera multijuga* (preto) e do padrão  $\beta$ -cariofileno (azul) a  $\lambda$  210 nm. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 7.** Perfil cromatográfico 2D da amostra de óleo-resina de *Copaifera multijuga* (azul) e da solução diluente acetonitrila 75% (v/v) (preto) em a  $\lambda$  210 nm. **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 8.** Espectro de absorção no ultravioleta do  $\beta$ -cariofileno no padrão e na amostra de óleo-resina de *Copaifera multijuga*. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 9.** Curva analítica do padrão  $\beta$ -cariofileno e gráfico da normalidade de resíduos da análise do padrão  $\beta$ -cariofileno. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 10.** Curva linear e gráfico da normalidade de resíduos da análise do óleo-resina de *Copaifera multijuga*..... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 11.** Teor de  $\beta$ -cariofileno nas amostras de óleo-resina de *Copaifera multijuga*. **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 12.** Perfil cromatográfico dos diterpenos isolados de *Copaifera multijuga* por CLAE utilizando as condições cromatográficas do  $\beta$ -cariofileno: (A) ácido *ent*-agático; (B) ácido 3-hidróxi-copálico; (C) ácido 3-acetóxi-copálico; (D) ácido copálico; (E)  $\beta$ -cariofileno; (F) Sobreposição dos cromatogramas (A - E)..... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 13.** Análise de regressão exponencial entre viscosidade e teor de  $\beta$ -cariofileno (CLAE). .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 14.** Viscosidade e Teor de  $\beta$ -cariofileno por CLAE das 11 amostras de óleos-resinas **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 15.** Correlação do teor de  $\beta$ -cariofileno por CLAE e por CG-EM.**Erro! Indicador não definido.**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Coordenadas geográficas, datas e histórico das coletas dos 11 espécimes de *Copaifera multijuga* coletados em Santarém/PA. ....32

**Tabela 2.** Sistema cromatográfico sob condição gradiente utilizado na revalidação do método para quantificação do marcador  $\beta$ -cariofileno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). ....38

**Tabela 3.** Volume, coloração dos óleos-resina coletados de *Copaifera multijuga***Erro! Indicador não definido.**

**Tabela 4.** Viscosidade, densidade e índice de refração das 11 amostras de óleo-resina de *Copaifera multijuga* (valores médios e desvios-padrão). .... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 5. Compostos químicos identificados nos óleos essenciais extraídos dos óleos-resinas de 11 espécimes de *Copaifera multijuga* coletados em Santarém /PA**Erro! Indicador não definido.**

**Tabela 6.** Média e desvio-padrão da porcentagem dos compostos de *Copaifera multijuga* para o cluster I e cluster II. .... **Erro! Indicador não definido.**

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	22
2.1 Objetivo Geral .....	22
2.2 Objetivos Específicos .....	22
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	23
<b>CAPÍTULO 1: Caracterização Físico-química dos Óleos-resinas de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne e Avaliação da Variabilidade Química de sua Fração Volátil</b> .....	28
<b>RESUMO</b> .....	29
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	29
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	31
2.1 Coleta do material vegetal .....	32
2.2 Determinação de parâmetros físicos dos óleos-resinas de <i>C. multijuga</i> .....	33
2.2.1 Densidade Relativa.....	33
2.2.2 Índice de Refração.....	33
2.2.3 Viscosidade .....	34
2.3 Análise da composição química dos óleos essenciais dos óleos-resinas de <i>C. multijuga</i> .....	34
2.4 Isolamento e identificação de diterpenos do óleo-resina de <i>C. multijuga</i> .....	35
2.5 Identificação e quantificação do marcador $\beta$ -cariofileno nos óleos-resinas de <i>C. multijuga</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	37
2.5.1 Adequabilidade do sistema ( <i>system suitability</i> ) .....	38
2.5.2 Revalidação da Metodologia Analítica .....	38
2.5.2.1 Seletividade .....	39
2.5.2.2 Precisão.....	39
2.5.2.2.1 Repetibilidade.....	39
2.5.2.2.2 Intermediária.....	39

2.5.2.3 Exatidão .....	40
2.5.2.4 Linearidade e Intervalo .....	40
2.5.2.5 Quantificação do $\beta$ -cariofileno nas amostras de <i>C. multijuga</i> por CLAE.....	41
2.6 Análise do perfil cromatográfico dos diterpenos isolados do óleo-resina de <i>C. multijuga</i> ....	41
2.7 Análise Estatística .....	41
<b>3 RESULTADOS</b> .....	41
3.1 Determinação dos parâmetros físicos: densidade, índice de refração e viscosidade para os óleos-resinas de <i>C. multijuga</i> .....	42
3.2 Análise da composição química dos óleos essenciais dos óleos-resinas de <i>C. multijuga</i> .....	43
3.3 Análise Estatística .....	46
3.4 Isolamento e identificação de diterpenos do óleo-resina de <i>C. multijuga</i> .....	47
3.5 Identificação e quantificação do marcador $\beta$ -cariofileno nos óleos-resinas de <i>C. multijuga</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	49
3.5.1 Adequabilidade do sistema ( <i>system suitability</i> ) .....	49
3.5.2 Revalidação da Metodologia Analítica.....	49
3.5.2.1 Seletividade .....	49
3.5.2.2 Precisão.....	51
3.5.2.2.1 Repetibilidade.....	51
3.5.2.2.2 Intermediária.....	51
3.5.2.3 Exatidão .....	51
3.5.2.4 Linearidade e intervalo .....	52
3.5.2.5 Quantificação do $\beta$ -cariofileno nas amostras de <i>C. multijuga</i> por CLAE.....	53
3.6 Análise do perfil cromatográfico dos diterpenos isolados do óleo-resina de <i>C. multijuga</i> ....	53
3.7 Análise Estatística .....	54
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	56
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	64
<b>APÊNDICE</b> .....	69

APÊNDICE A – Espectros de massas (APCI-MS) de diterpenos isolados de <i>Copaifera multijuga</i> A – Ácido copálico; B – Ácido 3-hidróxi-copálico .....	70
APÊNDICE B – Espectros de massas (APCI-MS) de diterpenos isolados de <i>Copaifera multijuga</i> C – Ácido 3-acetóxi-copálico; D – Ácido <i>ent</i> -agático .....	71
APÊNDICE C – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz) do ácido copálico em $\text{CDCl}_3$ .....	72
APÊNDICE D – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz) do ácido copálico em $\text{CDCl}_3$ .....	73
APÊNDICE E – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) do ácido 3-hidróxi-copálico em $\text{CDCl}_3$ .....	74
APÊNDICE F – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125MHz) do ácido 3-hidróxi-copálico em $\text{CDCl}_3$ .....	75
APÊNDICE G – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) do ácido 3-hidróxi-copálico em $\text{CDCl}_3$ .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
APÊNDICE H – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz) do ácido 3-hidróxi-copálico em $\text{CDCl}_3$ .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
APÊNDICE I – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) do ácido <i>ent</i> -agático em $\text{CDCl}_3$ .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
APÊNDICE J – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz) do ácido <i>ent</i> -agático em $\text{CDCl}_3$ .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>



Destas, 16 espécies de *Copaifera* são endêmicas no Brasil, especialmente nas regiões Amazônica e Centro-oeste destacando-se sete, pela maior ocorrência: *Copaifera officinalis* L., *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera confertiflora* Benth., *Copaifera langsdorfii* Desf., *Copaifera coriacea* Mart., *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke (ANDRADE et al., 2000).

De crescimento lento, as espécies de *Copaifera* possuem porte arbustivo a arbóreo podendo atingir até 40 metros de altura e viver até 400 anos. O tronco é de aspecto áspero, coloração escura, medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro. As folhas são alternas, pecioladas. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e dispostas em panículas axilares. Os frutos contêm semente ovoide envolvida por um arilo abundante variando do branco ao amarelado (CORRÊA, 1984; VAN DEN BERG, 1982).

As espécies arbóreas de *Copaifera* são conhecidas popularmente no Brasil por bálsamo, caobi, copaíba, copaúba (MS); copai (SP); copaíba-preta, copaíba-da-várzea, copaíba-vermelha (BA, MG); copaiqueira, copaiqueira-de-minas, copaúba (SP); copaúva, cupiúva, oleiro, (MG, PR); 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) (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002; BIAVATTI et al., 2006; BARBOSA; SCUDELLER, 2009).

Etimologicamente o termo copaíba vem do tupi “*cupa-yba*”, que significa árvore de depósito de seiva ou que tem jazida (reserva de óleo no seu interior). Dos troncos das copaiqueiras é extraído o óleo-resina líquido transparente, de viscosidade variável, cuja coloração pode variar do amarelo ao marrom. O óleo-resina de copaiqueiras pode ser extraído por meio de uma incisão com trado no tronco a uma altura de 1 a 1,5 metros do solo. O trado perfura o caule com uma profundidade de até 45 cm e aos poucos o óleo-resina escoar pelo furo (BIAVATTI et al., 2006).

Segundo Corrêa (1984) , em todas as espécies, os canais secretores estão na região cortical dos caules, porém dispostos de modo que se prolonguem até o lenho, formando bolsas. Os canais de uma zona não têm comunicação com outras e, por isso, os extrativistas podem retirar o óleo de diversos pontos. Essa informação foi retransmitida por outros autores (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002; OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006). Entretanto, Alencar (1982) afirma que para *C. multijuga* esses canais secretores longitudinais comunicam entre si, necessitando de apenas um furo para escoar todo o óleo-resina.

O óleo-resina é um produto de excreção da planta, que funciona como defesa contra animais, fungos e bactérias, atrai insetos polinizadores, além de regular o metabolismo do

vegetal. (ALENCAR, 1982; BRAGA et al., 1998; CASCON; GILBERT, 2000, MOURA, 2010; SOUSA, 2011).

A quantidade e a composição química do óleo-resina produzida por espécies de *Copaifera* é muito variável e ainda não se tem conhecimento exato dos fatores que a determinam. Estudos relatam que a quantidade e composição química podem ser influenciadas pelas condições ambientais do local de crescimento das árvores, pelo estágio de desenvolvimento da planta e por fatores genéticos (ALENCAR, 1982; FERREIRA; BRAZ, 2001; LEITE et al., 2001; VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002; PLOWDEN, 2003; RIGAMONTE-AZEVEDO, 2004, MEDEIROS, 2006).

O óleo-resina de copaíba tem uma grande variedade de aplicações, sendo encontrado nos mercados municipais das cidades da região amazônica e comercializado para os mercados nacionais e do exterior (ALENCAR, 1982), tendo ocupado o segundo lugar nas exportações brasileira de drogas medicinais no século passado (SIMONSEN, 1944 apud TAPPIN et al. 2004) e ainda hoje possui grande interesse comercial principalmente como matéria-prima para a indústria farmacêutica e de cosméticos (CASCON; GILBERT, 2000; BIAVATTI et al., 2006). As espécies *C. reticulata*, *C. langsdorffii* e *C. multijuga* são as que possuem óleos-resinas de maior interesse comercial devido a maior produção (LEITE et al., 2002; VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002).

Há relatos do uso do óleo-resina como matéria-prima para a produção de vernizes, tintas, e como comburente em lâmparas na iluminação doméstica. A utilização medicinal do óleo-resina de copaíba é muito antigo destacando-se suas aplicações entre os indígenas como cicatrizante de feridas e úlceras e para curar o umbigo de recém-nascido. Os primeiros colonos do Brasil o empregavam contra catarros vesicais e pulmonares, disenteria, bronquites rebeldes e dermatose, inclusive psoríase. Entretanto, seu emprego mais específico era como antiséptico das vias urinárias, nas blenorragias e leucorreias (CÔRREA, 1984; VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002).

O uso popular do óleo-resina de copaíba ainda é muito grande, principalmente como anti-inflamatório, cicatrizante local e internamente, como diurético, expectorante e antimicrobiano nas afecções urinárias e da garganta (misturado ao mel de abelhas e limão), leishmanicida, larvicida, antitumoral e no tratamento da dor (LORENZI; MATOS, 2002; LEANDRO et al., 2012). O óleo-resina de copaíba possui diversas atividades biológicas relatadas na literatura científica. Os efeitos anti-inflamatório, gastroprotetor, analgésico e antitumoral já foram comprovados (FERNANDES et al., 1992; OHSAKI et al., 1994; PAIVA et al., 1998). Óleos-resinas de espécies sem identificação (*Copaifera* sp.) vendidos

comercialmente foram estudados e relatados na literatura por possuir atividade anti-inflamatória (BASILE et al., 1988; VEIGA-JUNIOR et al., 2001).

O óleo-resina é quimicamente definido por duas classes de metabólitos secundários, os sesquiterpenos que compõe a fração volátil, e os diterpenos compondo a fração fixa (CASCON; GILBERT, 2000, MOURA, 2010; SOUSA, 2011).

No Brasil, das espécies encontradas somente dez tiveram seus óleos-resinas estudados: *C. cearensis*, *Copaifera duckei* Dwyer, *Copaifera guianensis* Desf., *C. langsdorffii*, *Copaifera martii* Hayne, *C. multijuga*, *C. officinalis*, *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer, *C. reticulata* e *C. trapezifolia*. Dentro dessas espécies foram identificados mais de 100 sesquiterpenos e 40 diterpenos, alguns estudados, testados e comprovados como compostos biologicamente ativos (FERNANDES; FREITAS, 2007; CURIO et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2011; LEANDRO et al., 2012; GELMINI et al., 2013).

Os principais sesquiterpenos encontrados nos óleos-resinas de copaíba são:  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ - e  $\beta$ -selineno,  $\beta$ -elemeno,  $\alpha$ -copaeno, trans- $\alpha$ -bergamoteno e  $\beta$ -bisaboleno. Quanto aos diterpenos, os mais citados são os ácidos: copálico, polialtico, hardwickiico, caurenóico e *ent*-caurenóico, juntamente com os seus derivados, os ácidos: 3-hidróxi-copálico, 3-acetóxi-copálico, e *ent*-agático (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002, LEANDRO, 2012).

Apesar da variação na composição química dos óleos-resinas em geral, o  $\beta$ -cariofileno, o principal constituinte da fração volátil e o ácido copálico, o principal constituinte da fração resinosa são considerados os marcadores químicos dos óleos-resinas da copaiba (VEIGA-JUNIOR et al., 1997; CASCON; GILBERT, 2000). Soares et al. (2003) sugerem que o ácido copálico, encontrado em todos os óleos-resinas de copaíba, até hoje estudados, possa vir a ser usado como um marcador da autenticidade desses derivados vegetais.

Segundo Saad et al. (2009) essa matéria-prima estava inscrita na Farmacopeia Britânica (1677), Farmacopeia Americana (1820). Também fez parte da Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil (BRASIL, 1926). Atualmente, o óleo-resina extraído de *Copaifera* está registrado na Farmacopeia Argentina e no Formulário Nacional dos Estados Unidos da América. A FDA (Food and Drug Administration) a contempla como suplemento dietético e ocasionalmente como saborizante, mas o nível permitido em alimentos é muito baixo (0,002%) (ALONSO, 2007).

Os produtos florestais não-madeireiros (PFNM's) constituem importante fonte de renda para a população amazônica e a forma mais comum de aproveitamento desses produtos

é o extrativismo, ou seja, uma colheita arbitrária do material de acesso mais fácil na floresta, sem nenhuma previsão técnica ecológica de seu efeito sobre as populações e sem uma estimativa de sua capacidade produtiva sustentável (DE BEER, 1989; PETERS, 1989).

Se manejados corretamente, a estrutura e a função da floresta não são alteradas, e sua extração não envolve a destruição dos recursos naturais. Assim, o uso desses produtos aparece como uma estratégia de conservação da floresta e manutenção de sua biodiversidade (NEPSTAD; SCHWARTZMAN, 1992).

A falta de conhecimento do mercado para esses produtos apresenta-se como um fator limitante para seu desenvolvimento, assim como para uma maior geração de renda para as comunidades, uma vez que a maior parte da produção é comercializada por empresas privadas e não pela associação comunitária. Além disso, a falta de controle de qualidade dos óleos-resinas tem sido uma barreira de aceitação de alguns fornecedores dos óleos no mercado nacional e no exterior (SANTOS; GUERRA, 2010).

O óleo-resina de copaíba tem muito valor comercial para a região amazônica. Entre 1974 e 1979, somente o estado do Amazonas comercializou para o mercado nacional 101 toneladas. No mesmo período foram exportadas 433 toneladas. Supõe-se que produção de óleo-resina de copaíba na Amazônia Brasileira seja de 200 toneladas/ano (ALENCAR, 1982).

Durante muito tempo o óleo-resina foi adquirido pelos laboratórios Farmacêuticos sem grandes preocupações quanto a qualidade, em especial, a sua composição química. Entretanto, com o passar dos anos a indústria farmacêutica e de cosméticos vem sofrendo uma forte pressão dos órgãos regulatórios que exigem produtos dentro de estritos padrões de qualidade, inclusive com definição e quantificação de marcadores visando garantir a segurança e a eficácia das preparações contendo esses produtos naturais (BRASIL, 2014).

Assim, visando garantir esse mercado, as cooperativas que comercializam o óleo-resina de copaíba, principalmente na região Norte do Brasil, tem buscado compreender se essas variações ocorrem por fatores naturais (genética, sazonalidade, estágio de desenvolvimento da planta) e que poderiam ser minimizados por condições padronizadas; como detectar problemas ocasionados por erro na identificação da espécie e por misturas de óleos-resina de espécies distintas.

Por outro lado, as adulterações do óleo-resina com óleos vegetais como o de soja e milho, água e até com óleo diesel comprometem a qualidade e diminui ainda mais o valor comercial do óleo-resina (VEIGA-JUNIOR et al., 1997; VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002). Os problemas relatados tem levado a busca de métodos analíticos que possibilitem o controle de qualidade de óleos-resinas de copaiba.

Portanto, fazem-se necessários estudos que descrevam a composição química do óleo-resina de uma espécie definida de *Copaifera*, considerando uma área delimitada de coleta e durante o mesmo período do ano, definindo parâmetros para o controle de qualidade do óleo-resina dessa espécie.

Não há atualmente uma metodologia padrão para análise do óleo-resina de copaíba. Logo a falta de parâmetros eficazes para caracterizar e realizar o controle de qualidade do óleo-resina atrelada à variabilidade intrínseca dessa matéria-prima comprometem a qualidade de produtos à base do óleo-resina de copaíba (CASCON; GILBERT, 2000; BIAVATTI et al., 2006).

Veiga-Junior et al. (1997) utilizaram cromatografia à gás para verificar adulteração em óleos-resinas de copaíba comerciais e concluíram que amostras comerciais estavam constituídas por misturas de óleos-resinas de copaíba de espécies diferentes e adulteradas com óleos vegetais. Entretanto, nesse trabalho os autores não definiram compostos químicos que pudessem ser utilizados como marcadores para o óleo-resina de copaíba.

Cascon e Gilbert (2000) sugeriram padronização quantitativa e qualitativa por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). Tappin et al. (2004), também propuseram um método para a padronização química quantitativa do óleo de copaíba, por meio da normalização externa em cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização em chama (CG-DIC) usando o *trans*-(-)-cariofileno e o ácido copálico como padrões de referência.

Biavatti et al (2006) pesquisaram diversas metodologias para o preparo das amostras de óleo-resina para a análise por cromatografia em fase gasosa, como a metilação por diazometano e transesterificação com hidróxido de potássio em metanol (KOH/MeOH). Estes autores observaram que, apesar da metodologia de transesterificação com KOH/MeOH ser rápida e de baixo custo, não é eficiente para os ácidos diterpênicos pois, alguns compostos como o ácido hardwíckiico não foram detectados no CG. Em comparação com a metodologia clássica de índice de acidez proposta por Vasconcelos e Godinho (2002) com óleos autênticos e comerciais, Biavatti et al. (2006) concluíram que o método apesar de ser acessível sob o ponto de vista econômico, conduz a resultados equivocados o que contradiz a conclusão dos autores, que o avaliaram como eficiente.

Independentemente da técnica cromatográfica ou do método aplicado, uma metodologia analítica é segura dentro de limites previamente estabelecidos, logo para um método ser seguro, este precisa ser definido por sua validação (GIL, 2007). A validação

precisa garantir, por meio de estudos experimentais, que a metodologia atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

Para metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada desde que sejam avaliados os parâmetros requeridos pela RE nº 899 de 29 de maio de 2003 de acordo com a categoria em que a substância de análise se enquadre (BRASIL, 2003).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral:

➤ Definir parâmetros físicos, químicos (marcadores) e métodos analíticos que possam ser utilizados como referência no controle de qualidade dos óleos-resinas de *C. multijuga*.

### 2.2 Objetivos Específicos:

➤ Determinar alguns parâmetros físicos (densidade, índice de refração e viscosidade) dos óleos-resinas de 11 espécimes de *C. multijuga*;

➤ Analisar a composição química dos óleos essenciais dos óleos-resinas de 11 espécimes de *C. multijuga* coletados em Santarém-Pará para verificar a variabilidade química;

➤ Isolar ácidos terpênicos (diterpenos) do óleo-resina de *C. multijuga* que possam ser utilizados como padrões de referência (marcadores) para essa espécie;

➤ Revalidar uma metodologia por CLAE para quantificar o teor de  $\beta$ -cariofileno nas amostras de óleo-resina de *C. multijuga*;

➤ Comparar os teores de  $\beta$ -cariofileno no óleo essencial obtidos por CG-EM e no óleo-resina obtidos por CLAE;

➤ Verificar a correlação entre teor de  $\beta$ -cariofileno e os parâmetros físicos;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALONSO, J. **Tratado de fitofarmacos y nutracéuticos**. Rosário (Argentina): Corpus Editorial, 2007.

ANDRADE JUNIOR, M. A.; FERRAZ, I. D. K.; VEIGA-JUNIOR, V.; FERREIRA, R. L. Distribuição geográfica de *Copaifera officinalis* L. (Caesalpinaceae) e registros de ocorrência de *Copaifera* spp. em Roraima. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTANICA, 51., Brasília, DF. Resumos. Brasília: **Sociedade de Botânica do Brasil**, p. 152, 2000.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

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 Edição, 2009.

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

BASILE, A. C.; SERTIE, J. A. A.; FREITAS, P. C. D.; ZANINI, A. C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from brazilian *Copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 1, p.101-109, 1988.

BIAVATTI, M. W.; DOSSIN, D.; DESCHAMPS, F. C.; LIMA, M. P. 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.

BRAGA, W.F. Terpenoids from *Copaifera cearensis*. **Phytochemistry**, v.49, n.1, p.263-264, 1998.

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](http://www.crf-mt.org.br/arqs/materia/1468_a.pdf)>. Acesso em: 12 set. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, 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](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: 16 out. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação**

**de produtos tradicionais fitoterápicos, 2014.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/10f7288044703a8bbbf8fffe3a642e80/Guia+final+dicol+180614.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 12 nov. 2015.

CARVALHO, J. C. T. Constituintes de plantas com atividade anti-inflamatória. In: \_\_\_\_\_ **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.** São Paulo: Tecmedd, 2004.

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.

CORRÊA, P.M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, v.6, p.612-615, 1984.

CURIO, M.; JACONE, H.; PERRUT, J.; PINTO, A.C.; VEIGA-FILHO, V.F.; SILVA, R.C.B. Acute effect of *Copaifera reticulata* Ducke copaiba oil in rats tested in the elevated plus-maze: An ethological analysis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.61, n.8, p.1105–1110, 2009.

DE BEER, J. H.; MCDERMOTT, M. J. **Economic value of non-timber forest products in Southeast Asia.** Amsterdam: The Netherlands Committee for IUCN, 1989.

FERNANDES, R.M.; PEREIRA, N.A.; PAULO, L.G. Anti-inflammatory activity of copaiba balsam (*Copaifera cearensis*, Huber). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.73, n.3, p.53-56, 1992.

FERNANDES, F. F.; FREITAS, E.P.S. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 150–154, 2007.

FERREIRA, L.; BRAZ, E. M. Avaliação do Potencial de Extração e Comercialização do Óleo-Resina de Copaíba (*Copaifera* spp.). **Advances in Economic Botany**. New York, p.1-22, 2001.

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

GIL, E. S. Assuntos regulatórios e sistemas de qualidade. In: GIL, E.S.(Org.) **Controle de Qualidade Físico-químico de Medicamentos.** 2 ed. São Paulo: Editora Pharmabooks, p. 44-48, 2007.

INDEX KEWENSIS, suppl. XX; **Claredon Press: Oxford**, 346 p., 1996. Disponível em: <<http://www.ipni.org/>>. Acesso em: 12 set. 2015

KOBAYASHI, C.; FONTANIVE, T.O.; ENZWEILER, B.G.; BONA, L.R.; MASSONI, T.; APEL, M.A.; HENRIQUES, A.T.; RICHTER, M.F.; ARDENGHI, P.; SUYENAGA, E.S.

Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. **Pharmaceutical Biology**. v. 49, n. 3, p. 306–313, 2011.

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

LEITE, A. **Recomendações para o manejo sustentável do óleo de copaíba**. Série: Manejo sustentável de florestas tropicais por populações tradicionais. UFAC, 2001.

LEITE, A.; ALEXANDRE, A.; RIGAMONTE-AZEVEDO, C.; CAMPOS, C.A.; OLIVEIRA, A. **Recomendações para o manejo sustentável do óleo de copaíba**. Rio Branco: UFAC/SEFE, 38 p., 2002.

LORENZI H.F.; MATOS F. J. A. **Plantas Medicinais do Brasil, nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum. 2002, 544 p.

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

MOBOT. Missouri Botanical Garden Tropicos.org. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/17600864>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

MOURA, W. R. A. **Ensaio farmacológico das atividades antiinflamatória, citotoxicidade e toxicidade aguda da *Copaifera luetzelburgii*, harm e Sida santaremnensis, monteiro**. Teresina: UFPI, 2010. 83 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.

NEPSTAD, D. C.; SCHWARZMAN S. (Eds). **Non-timber products from tropical forests: evaluation of a conservation and development strategy**. New York: New York Botanical Garden, 1992.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v.70, n.3, p.461-477, 2007.

OHSAKI A.; YANA, L.T.; ITOA, S.; EDATSUGIB, H.; IWATAB, D.; KOMODA, Y. The Isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the brazilian medicinal plant, *Copaifera Langsdorfii* Desf. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**. v. 4, n. 24, p. 2889-2892, 1994.

OLIVERIA, E.C.P.; LAMEIRA, O. A.; ZOGHBI, M.G.B. Identificação da época de coleta de copaíba (*Copaifera* spp) no município de Moju,PA. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais de Botucatu**, v. 8, n.3, p.14-23, 2006.

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

PETERS, C. M.; GENTRY, A. H.; MENDELSON, R. O. **Valuation of an Amazonian Rainforest.** Nature, London, v. 339, p. 655-656, 1989.

PLOWDEN, C. Production ecology of copaíba (*Copaifera* spp.) oleoresin in the eastern Brazilian Amazon. **Economic Botany**, v.57, n.4, p.491-501, 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 Fibras**, v.8, n.2/3, p.851-861, 2004.

SAAD, G. A.; LÉDA, P. H. O.; SÁ, I. M.; SEIXLACK, A. C. C. **Fitoterapia contemporânea: tradição e ciência na prática clínica.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

SIMONSEN, T. C. **Historia Econômica do Brasil (1500-1820)**, 2.ed. São Paulo: Nacional, 1944.

SANTOS, A. J.; GUERRA, F. G. P. Q. Aspectos econômicos da cadeia produtiva dos óleos de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) na Floresta Nacional do Tapajós-Pará. **Floresta**, v. 40, n. 1, p. 23-28, 2010.

SOARES, J. G.; VAREÃO, M. J. C.; WOLTER, F. W.; MOURÃO, A. P.; CRAVEIRO, A. A. R.; ALENCAR, J. C. Estudo químico de óleos essenciais, oleaginosas e láticas da Amazônia I. Composição e oxidação do óleo de uma espécie de *Copaifera*. **Acta Amazonica**, v. 9, p. 65-59, 2003.

SOUZA, A. B. ; MARTINS, C. H. ; SOUZA, M. G.; FURTADO, N. A. ; HELENO, V. C.; DE SOUSA, J. P. ; ROCHA, E. M.; BASTOS, J. K., CUNHA, W. R., VENEZIANI, R. C., AMBROSIO, S. R. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 215-220, 2011.

TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, J. F. G.; LIMA, L. A.; SIANI, A. C.; MAZZEI, J. L.; RAMOS, M. F. S. 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.

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas Medicinais na Amazônia- Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático.** Gráfica Editora Falangola: Belém, 1982.

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

VEIGA-JUNIOR, 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.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J.B.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 476-480, 2001.

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

WAGNER, H. Pesquisa fitomédica no novo milênio: tendências e mudanças. In. YUNES, R. A.; CECHIMEL FILHO, V. (Org.) **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2. ed. Itajaí: Univale, 2009, 319 p.

# CAPÍTULO 1

**Caracterização Físico-química dos Óleos-resinas de  
*Copaifera multijuga* Hayne e Avaliação da Variabilidade  
Química de sua Fração Volátil**

# Caracterização Físico-química dos Óleos-resinas de *Copaifera multijuga* Hayne e Avaliação da Variabilidade Química de sua Fração Volátil

## RESUMO

*Copaifera multijuga* Hayne, conhecida popularmente como mari mari, copaíba roxa, é utilizada pelas suas propriedades anti-inflamatórias. Esse trabalho teve como objetivo definir parâmetros físicos, químicos e métodos analíticos que possam ser utilizados no controle de qualidade dos óleos-resinas de *Copaifera multijuga* Hayne. Óleos-resinas de 11 espécimes de *C. multijuga* foram coletados em Santarém/Pará. Foi feita a determinação dos parâmetros físico-químicos do óleo-resina (viscosidade, densidade e índice de refração); identificação e quantificação do marcador  $\beta$ -cariofileno por CLAE; isolamento e identificação de diterpenos do óleo-resina; Análise do óleo essencial para identificação dos compostos químicos por CG-EM. Foram extraídos de 70 a 2000 mL de óleo-resina. A densidade variou de 0,955 a 0,923g/cm<sup>3</sup>, o índice de refração de 1,500 a 1,508 ( $\eta_D$ ) e a viscosidade de 9,46 a 92,62 mPa.s. Na análise do teor de  $\beta$ -cariofileno por CLAE, os valores de adequabilidade do sistema ficaram dentro das especificações, certificando a adequada separação do pico de interesse. O teor de  $\beta$ -cariofileno nas 11 amostras de óleo-resina variou de 22,4% a 75,1%. Nos óleos essenciais observou-se uma predominância de hidrocarbonetos sesquiterpenos, variando de 93,48 a 99,67%. Os compostos majoritários encontrados em todas as amostras foram o  $\beta$ -cariofileno e o  $\alpha$ -humuleno e análise estatística multivariada agrupou os 11 espécimes de *C. multijuga* em dois clusters em relação aos compostos  $\delta$ -elemeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, *trans*-cadina-1(6),4-dieno and *trans*-muurolo-4(14),5-dieno. Foram isolados por técnicas cromatográficas e identificados por APCI-EM e RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C da fração ácida (ou resinosa do óleo) os ácidos 3-hidróxi-copálico, 3-acetóxi-copálico, *ent*-agático e copálico. Esses ácidos foram analisados em CLAE nas mesmas condições cromatográficas do  $\beta$ -cariofileno para verificar o perfil cromatográficos dos mesmos. Os resultados das análises deste estudo contribuem para o controle de qualidade de óleos-resinas desta espécie. Foi possível observar uma alta variabilidade na composição química das onze amostras de *C. multijuga*.

**Palavras-chave:** *Copaifera multijuga*. CLAE.  $\beta$ -cariofileno. Diterpenos. Óleo essencial

## ABSTRACT

*Copaifera multijuga* Hayne, is known as mari mari, purple copaiba, is used for its anti-inflammatory properties. This work aimed to evaluate physical-chemicals methods, chemicals, chromatographics and markers for future studies of standardization the *C. multijuga* oil-resin, isolate chemicals compounds the oil-resin and analyze the chemical composition of their essential oils. Eleven oil-resins of 11 specimens of *C. multijuga* were collected in Santarém - Pará. The physicals parameters of the oil-resin were determined, such as viscosity, density and refractive index; identification and quantification of  $\beta$ -caryophyllene by HPLC; isolation and identification of diterpenes in the oil-resin; essential oil analysis for the identification of chemical compounds by GC-MS. Were extracted of the 70 the 2000 mL of oil-resin. The density varied from 0.955 to 0.923 g/cm<sup>3</sup>, the index of refraction was from 1.500 to 1.508 ( $\eta_D$ ) and viscosity from 9.46 to 92.62 mPa.s. In the HPLC analysis of  $\beta$ -

caryophyllene, values of the system suitability were within specifications, which secured separation of the peak of interest. The  $\beta$ -caryophyllene content in the 11 oil-resin samples ranged from 22.4% to 75.1%. In the essential oils there was a predominance of sesquiterpenic hydrocarbons, ranging from 99.67% to 93.48%. The major compounds found in all samples were  $\beta$ -caryophyllene and the  $\alpha$ -humulene. The multivariate statistical analysis grouped the 11 specimens of *C. multijuga* in two clusters in relation to compounds  $\delta$ -elemene,  $\alpha$ -copaene,  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -humulene, *trans*-cadinane-1(6),4-diene and *trans*-muurola-4(14),5-diene. Were isolated for chromatographic techniques and identified by APCI-MS and  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR the acid fraction (or part resinous of the oil) the acids copalic, 3-hydroxy-copalic, 3-acetoxy-copalic, and *ent*-agatic. These acids were analyzed by HPLC under the same chromatographic conditions of the  $\beta$ -caryophyllene to verify the chromatographic profile of these compounds. The analysis results of this study contribute to the quality control of oil-resins of this species. Was possible to observe a high variability in chemical composition of the eleven specimens of *C. multijuga*.

**Keywords:** *Copaifera multijuga*. HPLC.  $\beta$ -caryophyllene. Diterpenes. Essential oil

## 1 INTRODUÇÃO

*Copaifera multijuga* Hayne é uma árvore que pode atingir 36 metros de altura (LEITE, 2001). Ocorre no Brasil desde o médio Tapajós até a Amazônia Ocidental (Amazonas, Acre e Rondônia), nas regiões sul de Roraima e norte de Mato Grosso, além da Bolívia e Peru. É conhecida popularmente como copaíba, mari-mari, copaíba roxa (CASCON, 2004). As folhas são compostas, alternadas, pecioladas, medindo de 12 a 23 cm, com 8 a 20 folíolos elípticos e alternos (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002; BRUM et al., 2009). As flores são brancas, pequenas, apétalas, hermafroditas e arrançadas em panículas axilares, monoperiançada, com quatro sépalas com um tom vermelho-ferrugem (CLEMENT et al., 1999; RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2004). No estado do Amazonas a floração de *C. multijuga* ocorre de janeiro a abril (estação chuvosa) e a frutificação, de março a agosto (ALENCAR et al., 1979). Na região do Tapajós, a floração desta mesma espécie ocorre entre dezembro e janeiro, com frutificação de janeiro a julho (CARVALHO, 1994).

Os frutos de *C. multijuga* são legumes, com formato globóide, tamanho médio de 3,6 x 2,9 x 2,0 cm e peso médio de 8,5 g. No início do desenvolvimento o fruto possui coloração amarela a vermelha, e com a maturação tornam-se marrom-escuro. Em geral, cada fruto apresenta apenas uma semente, entretanto já foram encontradas até três sementes por fruto. A semente apresenta formato elipsóide, tamanho médio de 2,0 x 1,3 x 1,1 cm e peso médio de 1,8 g com coloração preta, opaca e de consistência firme; mais da metade da semente está

envolvida por um arilo abundante, de coloração amarelo intenso (CAMARGO et al., 2008; BRUM et al., 2009).

O tronco produz óleo-resina, viscoso e fluido, com cheiro forte e odor de cumarina, sabor acre e amargo (PLOWDEN, 2003), utilizado pela população amazônica como anti-inflamatório, cicatrizante (SOUZA JUNIOR et al., 2002), para o tratamento de bronquite, úlceras e antitumoral (LIMA et al., 2003).

Estudos científicos do óleo-resina da *C. multijuga* relataram diminuição na permeabilidade vascular aos agentes pró-inflamatórios no rim de ratos (BRITO et al. (2005); propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva em ratos (VEIGA-JUNIOR et al., 2006; GOMES et al., 2010); atividade anti-inflamatória *in vitro* (VEIGA-JÚNIOR et al., 2007) e atividade antimicrobiana para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (MENDONÇA; ONOFRE, 2009).

Veiga-Junior et al. (2006) identificaram no óleo-resina de *C. multijuga* 27 sesquiterpenos, sendo o  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -humuleno os compostos majoritários e 6 diterpenos: ácido copálico, ácido 3-hidróxi-copálico, ácido 3-acetóxi-copálico, ácido *ent*-agático, ácido pinifólico e ácido eperúico. Biavatti et al. (2006) utilizaram o ácido copaiferólico e o cariofilenol como marcadores de amostras de óleo-resina de *C. multijuga*, e verificaram que o primeiro foi encontrado em todas as amostras analisadas por cromatografia à gás.

A quantidade e a composição química dos óleos-resinas produzidos por *Copaifera* variam muito inter e intra espécies e podem ser influenciadas por fatores genéticos e ambientais como tipo do solo e sazonalidade (ALENCAR, 1982; FERREIRA, 1999; LEITE et al., 2001; PLOWDEN, 2003). Estudos que correlacionem parâmetros físicos e químicos, visando o controle de qualidade, podem agregar valor comercial ao óleo-resina de *C. multijuga*, permitindo às comunidades locais, durante a coleta, selecionarem um produto de maior qualidade e com maior valor comercial para as indústrias tanto farmacêuticas quanto cosméticas e para uso da população (BIAVATTI et al., 2006).

O presente trabalho teve como objetivo investigar o óleo-resina da *C. multijuga* coletada em Santarém do Pará nos seguintes aspectos: determinar parâmetros físicos (viscosidade, índice de refração e densidade) dos óleos-resinas; analisar a composição e variabilidade química dos óleos essenciais de 11 espécimes; revalidar a metodologia analítica por CLAE para quantificar o teor de  $\beta$ -cariofileno nos óleos-resinas; comparar os teores de  $\beta$ -cariofileno no óleo essencial obtidos por CG-EM e no óleo-resina obtidos por CLAE; isolar diterpenos do óleo-resina que possam ser utilizados como padrões de marcadores para essa espécie; verificar a correlação entre o teor de  $\beta$ -cariofileno e os parâmetros físicos.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Coleta do material vegetal

A espécie foi identificada e uma exsicata depositada no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi em Belém/PA, sob registro MG 21.3093.

Para determinação dos parâmetros físicos e químicos foram coletados óleos-resinas de 11 espécimes de *C. multijuga* em Santarém/PA, na Floresta Nacional de Saracá-Taquera no período de 21 a 25 de abril de 2013. No momento da coleta dos óleos-resinas, os troncos foram analisados e verificou-se: presença de cicatriz (cicatrizado), com um cano de PVC e torneira (torneado) e sem nenhuma evidência de extração anterior (sólido), ver (Tabela 1).

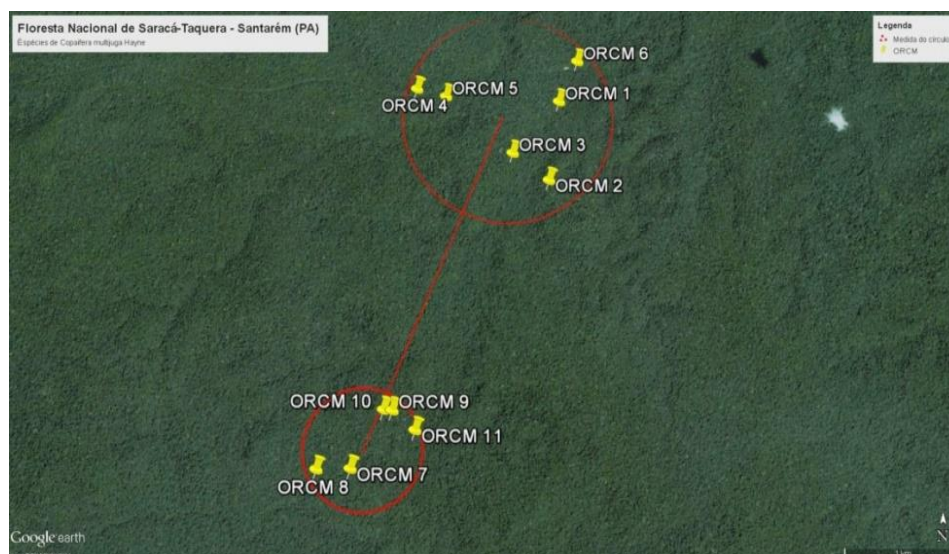
**Tabela 1.** Coordenadas geográficas, datas e histórico das coletas dos 11 espécimes de *Copaifera multijuga* coletados em Santarém/PA.

Amostras	Altitude	Latitude	Longitude	Data	Histórico da Coleta
ORCM 1	307	-01 31' 14,75290"S	-56 38' 26,09202"W	21/04/2013	Cicatrizado
ORCM 2	308	-01 31' 38,43764"S	-56 38' 29,34635"W	21/04/2013	Cicatrizado
ORCM 3	309	-01 31' 30,34840"S	-56 38' 39,96785"W	21/04/2013	Torneado
ORCM 4	312	-01 31' 10,94064"S	-56 39' 08,38398"W	23/04/2013	Sólido
ORCM 5	311	-01 31' 12,73875"S	-56 38' 59,78871"W	23/04/2013	Sólido
ORCM 6	310	-01 31' 01,86468"S	-56 38' 20,28580"W	22/04/2013	Sólido
ORCM 7	316	-01 32' 59,20721"S	-56 39' 25,40671"W	24/04/2013	Sólido
ORCM 8	318	-01 32' 59,39309"S	-56 39' 34,84204"W	24/04/2013	Sólido
ORCM 9	321	-01 32' 43,63374"S	-56 39' 14,10629"W	25/04/2013	Sólido
ORCM 10	322	-01 32' 43,46898"S	-56 39' 16,54591"W	25/04/2013	Torneado
ORCM 11	323	-01 32' 48,94690"S	-56 39' 07,62868"W	25/04/2013	Sólido

**Legenda:** ORCM (Óleo-resina de *Copaifera multijuga*)

Os dados climatológicos foram obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia e verificou-se nesse período um total mensal de precipitação de 527 mm (BRASIL, 2013). Em relação aos espécimes coletados, as coordenadas geográficas mostraram dois grupos populacionais: ORCM de 1 a 6 e ORCM de 7 a 11, distantes entre si por 3,20 quilômetros (Figura 2).

**Figura 2.** Localização geográfica dos 11 espécimes de *Copaifera multijuga*.



**Fonte:** Google Earth

Para o isolamento de diterpenos uma amostra coletada na reserva Adolpho Ducke (Manaus) em julho de 2013 foi fornecida pelo laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônia (QbiomA).

## 2.2 Determinação de parâmetros físicos dos óleos-resinas de *C. multijuga*

### 2.2.1 Densidade Relativa

A densidade relativa (BRASIL, 2010) foi realizada utilizando um picnômetro com capacidade de 10 mL. As 11 amostras de óleo-resina de *C. multijuga* foram transferidas, separadamente, para o picnômetro, removeu-se o excesso de óleo quando necessário e pesou-se o conjunto. O peso da amostra do óleo-resina foi obtido através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa foi calculada determinando a razão entre a massa do óleo-resina e a massa da água, ambas à 25°C. O experimento foi realizado em triplicata.

### 2.2.2 Índice de Refração

O índice de refração (BRASIL, 2010) foi medido empregando-se o refratômetro digital ABBE de bancada modelo Q767B marca Quimis. O refratômetro foi previamente calibrado com água destilada, a 25°C, cujo índice de refração é 1,3330  $n_D$ . Com o auxílio de uma

pipeta de Pasteur cerca de 0,2 mL de cada amostra foi colocada no local adequado do equipamento e espalhada uniformemente. A refração de cada amostra foi medida de acordo com a escala interna do equipamento. O experimento foi realizado em triplicata.

### **2.2.3 Viscosidade**

As medidas de viscosidade (BRASIL, 2010) foram realizadas em um viscosímetro rotacional, série ONE, Fungilab, com um adaptador do tipo LCP (usado para baixas viscosidades, bem como para amostras de 20 mL), nas configurações de rotações por minuto (RPM), torque (%) particulares de cada amostra e temperatura à 25°C. O experimento foi realizado em quintuplicata.

## **2.3 Análise da composição química dos óleos essenciais dos óleos-resinas de *C. multijuga***

Os óleos essenciais das 11 amostras de óleo-resina de *C. multijuga* coletados no período de 21 a 25 de abril de 2013 foram extraídos no Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental (LabBBEx) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), sob orientação da Profa. Dra. Rosa Helena Veras Mourão.

Para obtenção do óleo essencial 30 mL de cada amostra de óleo-resina foram submetidos a hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por 2 horas. Para o cálculo do rendimento os óleos essenciais foram coletados e seu volume medido no tubo graduado do aparelho.

Os óleos essenciais foram submetidos à análise cromatográfica a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) em aparelho SHIMADZU QP5050A. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (CBP – 5; 30m x 0,25mm x 0,25µm de polidimetilsiloxano 5% fenil), com um fluxo de 1mL/min de Hélio, como gás de arraste, aquecimento com temperatura programada (60 °C/ 2min; 3 °C min<sup>-1</sup>/ 240°C; 10 °C min<sup>-1</sup>/280°C; 280 °C/ 10min), e energia de ionização de 70eV. O volume de injeção foi de 1µL da amostra diluída em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> na proporção de 1:5, com taxa de split 1:20, temperatura do injetor 220°C.

Os componentes químicos dos óleos essenciais foram identificados por comparação dos espectros de massas e índices de retenção com os relatados na literatura para os componentes mais comuns de óleos essenciais (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram

calculados através da coinjeção de uma mistura de hidrocarbonetos, C 9 – C 22, e utilização da equação de Van Den Dool e Kratz (1963).

Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada para analisar as inter-relações entre os constituintes químicos dos óleos essenciais de 11 amostras de óleo-resina de *C. multijuga*. A análise de agrupamento hierárquico (HCA) foi utilizada para estudar a similaridade entre as amostras com base na distribuição dos constituintes, os agrupamentos foram formados de acordo com o método da variância mínima de Ward (WARD, 1963).

Para a análise de componentes principais e agrupamento hiererárquico, os dados originais foram transformados de modo que cada variável passou a apresentar média zero e variância igual a um. Essa transformação foi realizada devido as diferentes medidas experimentais. Para validar a classificação obtida na análise de agrupamento foi realizada uma análise discriminante canônica (DCA). O software STATISTICA 7.0 (STAT SOFT, 2004) foi utilizado para realizar as análises estatísticas.

#### **2.4 Isolamento e identificação de diterpenos do óleo-resina de *C. multijuga***

Foi utilizado um método adaptado a partir dos trabalhos de Pinto et al. (1997) e Barreto Júnior et al. (2005), impregnando KOH (hidróxido de potássio) na sílica de modo simples para separar sesquiterpenos de diterpenos.

A técnica foi desenvolvida utilizando sílica-gel 60 (70-230 mesh) imersa em uma solução aquosa de KOH a 10%, que permitiu uma maior rapidez na obtenção da SiO<sub>2</sub>-KOH. Para cada 100g de sílica-gel 60 (70-230 mesh) utilizou-se 100 mL da solução aquosa de KOH 10%. Após a homogeneização, a sílica foi levada à estufa e seca a 80-100°C por 24 h.

A amostra de óleo-resina (8g) foi cromatografada em coluna de vidro (4 cm de diâmetro) com sílica impregnada com KOH a 10% e utilizando-se como eluentes 800 mL de n-hexano e 400 mL de metanol, respectivamente.

A fração metanólica foi concentrada em rotaevaporador em temperatura  $\leq 40^{\circ}\text{C}$  e submetida a uma partição liquido-liquido em funil de separação empregando água destilada e diclorometano e a uma acidificação seletiva com ácido clorídrico 1 M em pH's determinados 8, 7, 5 e 3 (pH *zone refining*), o que permitiu um pré-fracionamento dos diterpenos extraídos com diclorometano. Os diterpenos precipitados foram recristalizados com sucessivas lavagens e purificações utilizando solventes de diferentes polaridades. As frações com diterpenos e diferentes pH's com diterpenos semipuros foram fracionados em coluna aberta com sílica-gel

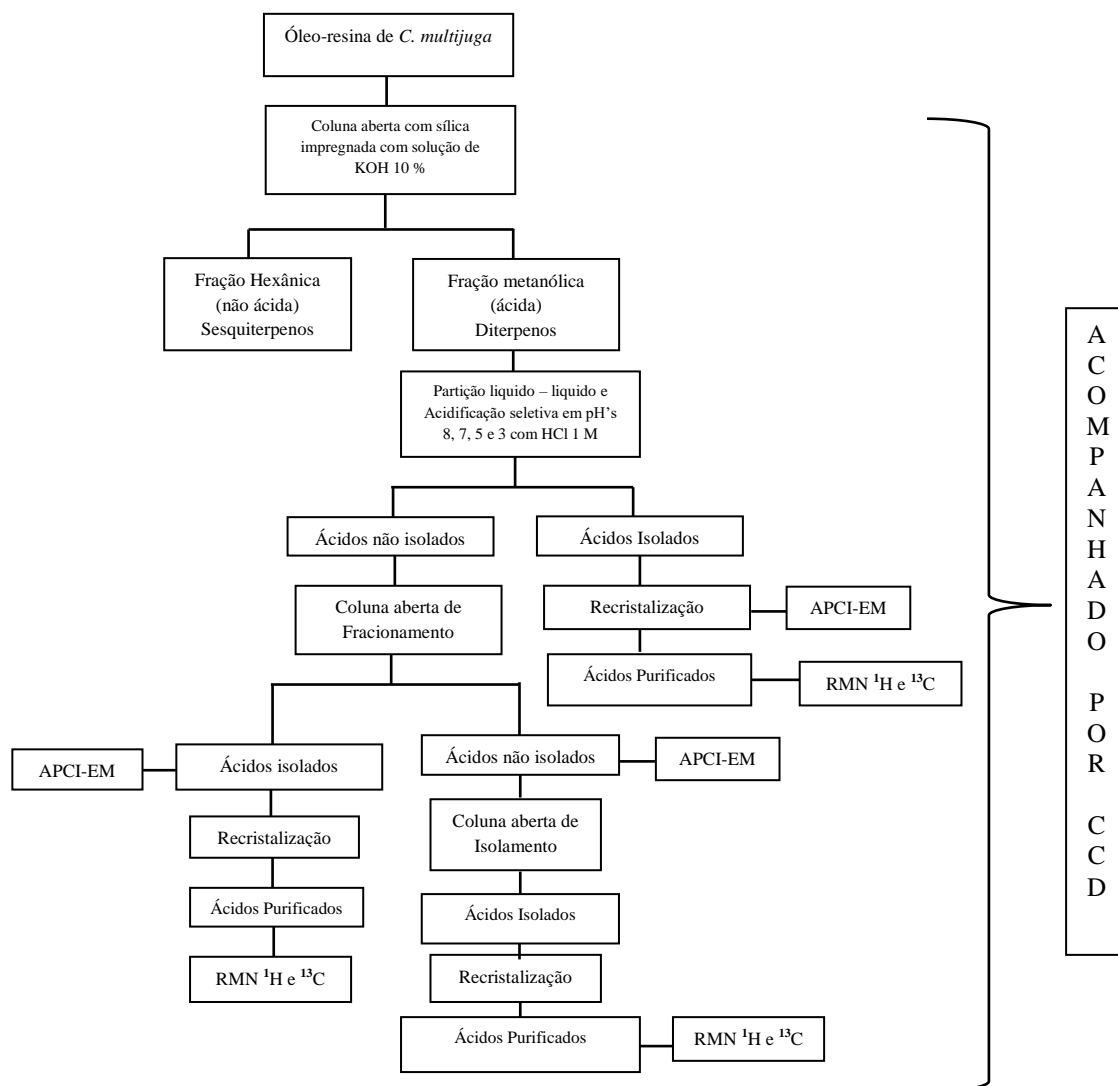
60 (70-230 mesh) utilizando como eluentes hexano e acetato de etila em diferentes proporções.

Em todas as etapas do processo de isolamento e purificação, as frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), usando como fase móvel gradiente de solventes de polaridades distintas: hexano/acetato de etila 6:4; hexano/acetato de etila 7:3; hexano/diclorometano/acetato de etila 5:1:2. As placas foram reveladas com uma solução de vanilina sulfúrica (Figura 3).

Os compostos isolados e purificados foram identificados por APCI-EM (Ionização Química à Pressão Atmosférica acoplada à Espectrômetro de Massas) e RMN (Ressonância Magnética Nuclear)  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os espectros de massas foram obtidos utilizando um espectrômetro de massas do tipo “ion trap” (LCQ-Fleet) da Thermo Scientific equipado com fonte de “APCI”. As amostras foram solubilizadas em MeOH CLAE (1 mg/mL) e injetadas diretamente no aparelho através de seringa fluxo de 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ , com detecção realizada em modo negativo.

As análises de RMN foram realizadas no Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e Carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos em espectrofotômetro da marca Varian modelo INOVA de 11,7T, com amplitude de 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Para solubilização das amostras utilizou-se como solvente clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Os deslocamentos químicos foram expressos em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão interno clorofórmio ( $\delta = 7,27$ ) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hertz (Hz). Levaram-se em consideração as multiplicidades dos sinais segundo a convenção: *s* (simpleto), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (tripleto) e *m* (multiplete). A identificação dos ácidos deu-se por comparação com os dados já publicados na literatura (BRAUN, 1977; ROMERO, 2007).

**Figura 3.** Fluxograma da cromatografia em coluna aberta com sílica impregnada com KOH 10%.



## 2.5 Identificação e quantificação do marcador $\beta$ -cariofileno nos óleos-resinas de *C. multijuga* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

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

O método analítico para quantificação do marcador  $\beta$ -cariofileno no óleo-resina foi realizado de acordo com a metodologia validada por Faria (2014). A fase estacionária utilizada foi uma coluna C18 da ZORBAX Eclipse® (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ 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 (H<sub>2</sub>O Milli-Q®) acidificada com ácido

fosfórico à 0,05% (solvente B), mantidas a uma vazão de 1,0mL/min sob condição gradiente (Tabela 2). O comprimento de onda de leitura foi de 210 nm, o volume de injeção em todas as análises foi de 10 µL e o tempo de análise, 40 min.

**Tabela 2 - Sistema cromatográfico sob condição gradiente utilizado na revalidação do método para quantificação do marcador β-cariofileno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).**

<b>Tempo (min)</b>	<b>Solvente A (%)</b>	<b>Solvente B (%)</b>
<b>0</b>	70	30
<b>8</b>	70	30
<b>12</b>	90	10
<b>32</b>	90	10
<b>36</b>	70	30
<b>40</b>	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 analisadas, foram preparados em ACN (75% v/v) grau HPLC, as quais foram filtradas em membrana de 0,45µm (Millex®- Millipore) antes de serem injetadas. A fase móvel também foi filtrada em membrana fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45µm (Millipore). Os picos cromatográficos correspondentes ao β-cariofileno nas amostras foram identificados por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de UV dos mesmos com o padrão de referência (β-cariofileno, Sigma-Aldrich), e a quantificação ocorreu pela integração das áreas dos picos.

### **2.5.1 Adequabilidade do sistema (*system suitability*)**

Os parâmetros de *system suitability* Fator de Capacidade (K), Resolução (Rs), Fator de Cauda (TF) e Número de Pratos Teóricos (N) foram calculados em relação ao pico de interesse (BRASIL, 2010) pelo software Empower® do equipamento cromatográfico. Como especificações foram utilizados  $R_s > 2$  entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo (impureza, produto de degradação ou outras substâncias);  $TF \leq 2$ ;  $N > 2000$  para CLAE (FDA, 1994).

### **2.5.2 Revalidação da Metodologia Analítica**

O método analítico foi revalidado segundo os parâmetros da Resolução Especial (RE) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nº 899 de 2003 (BRASIL, 2003) e a Resolução da Diretoria Colegiada nº 26 de 2014 (BRASIL, 2014), que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

### **2.5.2.1 Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada por comparação entre os cromatogramas do padrão  $\beta$ -cariofileno (Sigma Aldrich) e das amostras de óleo-resina de *C. multijuga*; pela sobreposição do cromatograma das amostras de óleo-resina com o cromatograma do diluente (ACN 75% v/v grau HPLC) a 210 nm. Também foi realizada a varredura no ultravioleta (190 a 400 nm), do pico de interesse em quatro pontos diferentes, para verificar o grau de pureza em comparação com a varredura do pico do padrão de  $\beta$ -cariofileno nas mesmas condições.

### **2.5.2.2 Precisão**

#### **2.5.2.2.1 Repetibilidade**

A repetibilidade foi verificada por meio de nove determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada, 0,44, 0,56 e 0,63 mg/mL. Foi calculada a média de cada nível e o desvio padrão relativo (DPR) entre as determinações, utilizando o software Excel<sup>®</sup> 2013 (Microsoft Office USA) (BRASIL 2003; BRASIL, 2014). A análise foi realizada em um mesmo dia e por um único analista.

#### **2.5.2.2.2 Precisão Intermediária**

A precisão intermediária foi realizada por outro analista e em dia diferente, observando-se a concordância entre os resultados, a qual foi expressa por meio do coeficiente de variação entre os dezoito resultados obtidos. Foi calculada a média de cada nível e o desvio padrão relativo (DPR) entre as determinações, utilizando o software Excel<sup>®</sup> 2013 (Microsoft Office USA) (BRASIL, 2003; BRASIL, 2014).

Foi feito teste *t* para análise de comparação entre médias e teste F para análise de comparação entre variâncias, utilizando-se o software Action<sup>®</sup> 2.7. Todos estes parâmetros estatísticos foram calculados com intervalo de confiança de 95%.

### 2.5.2.3 Exatidão

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% em triplicata de cada amostra de óleo-resina.

Uma mesma quantidade do padrão de  $\beta$ -cariofileno foi adicionada em três concentrações diferentes da amostra de óleo-resina (baixa, média e alta).

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Equação 1), utilizando o software Excel<sup>®</sup> 2013 (Microsoft Office, USA) (BRASIL, 2014).

$$\text{Equação 1: } \textit{Exatid\~{a}o} = \textit{CME} / \textit{CT} * 100$$

Em que: CME= Concentração Média Experimental;

CT= Concentração Teórica

### 2.5.2.4 Linearidade e Intervalo

A linearidade do método para o padrão  $\beta$ -cariofileno e para o óleo-resina foi verificada pela obtenção de uma curva analítica. A partir da pesagem do padrão, em triplicata (7,16, 7,56 e 7,18 mg/mL) foi preparada uma solução principal, que posteriormente foi diluída para obtenção de cinco soluções de análise, totalizando quinze soluções na faixa de 0,1432 a 0,756 mg/mL. A amostra foi pesada também em triplicata. Logo após a análise cromatográfica destas soluções foi montada a curva de linearidade de concentração (mg/mL) versus AUC (Área Sob a Curva) utilizando o software Excel<sup>®</sup> 2013 (Microsoft Office, USA).

Para o padrão  $\beta$ -cariofileno as concentrações dos pontos da curva analítica foram de 0,146; 0,292; 0,438, 0,584 a 0,730 mg/mL e para o óleo-resina de *C. multijuga* foram de 0,437; 0,560; 0,630; 0,762 e 0,870 mg/mL. O intervalo linear do padrão foi de 30% a 170%

da concentração central (0,438 mg/mL) e da amostra foi de 70% a 140% da concentração central do método (0,630 mg/mL).

Como parâmetros para aceitação da linearidade do método foram calculados o coeficiente de correlação linear ( $r$ ), o coeficiente de determinação ajustado ( $r^2$ ), o coeficiente angular ( $a$ ), o coeficiente linear ( $b$ ), com seus respectivos intervalos de confiança, de normalidade dos resíduos (plotados graficamente), pelo método de Anderson-Darling. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e expressa por  $y = ax + b$ . Realizou-se tratamento estatístico dos dados utilizando-se o software Action® 2.7 em que foram realizados os testes de significância da regressão, por análise de variância (ANOVA), teste de falta de ajuste linear (*Lack of Fit*), todos calculados com intervalo de confiança de 95 %.

#### **2.5.2.5 Quantificação do $\beta$ -cariofileno nas amostras de *C. multijuga* por CLAE**

Após a revalidação da metodologia, as amostras de óleo-resina dos 11 espécimes foram analisadas por CLAE. O procedimento foi realizado em triplicata. O teor de  $\beta$ -cariofileno de cada amostra foi quantificado por meio da equação da reta obtida da curva analítica do padrão.

### **2.6 Análise do perfil cromatográfico dos diterpenos isolados do óleo-resina de *C. multijuga***

Os diterpenos previamente isolados do óleo-resina de *C. multijuga* e identificados por APCI-EM e RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  foram analisados nas mesmas condições cromatográficas para o marcador  $\beta$ -cariofileno descrito no **item 2.5**, para determinar o perfil cromatográfico dos mesmos.

### **2.7 Análise Estatística**

A análise da correlação dos teores de  $\beta$ -cariofileno por CLAE e CG-EM, e entre os parâmetros físicos e o teor de  $\beta$ -cariofileno foram avaliados utilizando a análise de correlação de Pearson (CALLEGARI-JACQUES, 2003).