



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA

PADRONIZAÇÃO DE ÓLEOS DE *Copaifera multijuga* Hayne POR
MEIO DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

PAULA CRISTINA SOUZA BARBOSA

MANAUS – AM
2012

PAULA CRISTINA SOUZA BARBOSA

PADRONIZAÇÃO DE ÓLEOS DE *Copaifera multijuga* Hayne POR MEIO DE
TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, com área de concentração em Química Analítica.

ORIENTADORA: Dr^a LARISSA SILVEIRA MOREIRA WIEDEMANN
CO-ORIENTADOR: Dr. VALDIR FLORÊNCIO DA VEIGA JUNIOR

MANAUS – AM
2012

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Barbosa, Paula Cristina Souza

B238p Padronização de óleos de *Copaifera multijuga* Hayne por meio de técnicas cromatográficas / Paula Cristina Souza Barbosa. - Manaus: UFAM, 2012.
157 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica) — Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientadora: Prof^a Dra. Larissa Silveira Moreira Wiedemann

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

1. Essências e óleos essenciais 2. Óleo-resina – Composição química 3. Copaíba – Análises cromatográficas 4. Fitoquímica I. Wiedemann, Larissa Silveira Moreira (Orient.) II. Veiga Junior, Valdir Florêncio da (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 665.325.3(043.3)

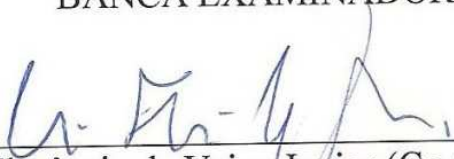
PAULA CRISTINA SOUZA BARBOSA

PADRONIZAÇÃO DE ÓLEOS DE *Copaifera multijuga* Hayne POR MEIO DE
TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Química da Universidade
Federal do Amazonas como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Química, com área de concentração em
Química Analítica.

Aprovada em 25 de junho de 2012.

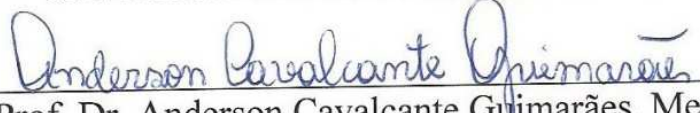
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior (Co-Orientador), Presidente
Universidade Federal do Amazonas – UFAM



Prof. Dr. Jamal da Silva Chaar, Membro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM



Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães, Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

*Dedico esse trabalho a meu pai
Paulo Roberto Barbosa,
Que sempre me considerou uma vencedora.
Saudades eternas.*

AGRADECIMENTOS

- À **Deus**, que me deu forças e condições para concretizar esse trabalho.
- À minha mãe **Aglaís**, aos meus irmãos **Camila Barbosa**, **Rodrigo Barbosa** e **Raphael Barbosa** e à pequena **Julia** pelo amor, carinho, incentivo e por sempre estarem presentes em minha vida.
- Aos meus orientadores **Larissa Silveira Moreira Wiedemann** e **Valdir Florêncio da Veiga Junior** pela confiança em mim, no meu trabalho e pelo incentivo constante à pesquisa científica.
- Aos meus amigos de graduação: **Fabiano Merlotti**, **Luciana Freire**, **Magno Muniz**, **Milena Campelo** e **Rafael Lima** pelos momentos de descontração.
- Aos amigos da turma de mestrado: **Andrea Medeiros** e **Paulo Rennan Ferreira** pelos momentos de apoio e compartilhamento de conhecimentos.
- Aos amigos da família Q-BiomA, por quem tenho muito carinho: **Caroline Mathias**, **Dayana Custódio**, **Igor Medeiros**, **Joelma Alcantâra**, **Klenicy Yamaguchi**, **Milena Campelo**, **Priscila Moraes** e **Priscilla Oliveira**, pelos bons momentos, por me encorajarem sempre e confiarem em mim e no meu trabalho; em especial ao **André Luís Rüdiger**, ao **Fabiano Vargas**, ao **Iuri Barros** e à **Lidiam Leandro** que além dos bons momentos, contribuíram diretamente com meu trabalho, através da experiência, sempre me ajudando nas dificuldades.

- Aos meus amigos: **Ribamar Martins**, **Marcela Barbosa** e **Renato Campelo**. E em especial ao **Paulo Joel Xavier** e ao **Rafael Brito**, que me guiaram até a Química de maneira direta e indireta, sempre incentivando e confiando em mim e na minha capacidade.
- Aos Profs. Drs. **Débora de Almeida Azevedo** e **Raphael Salles Ferreira Silva**, do Laboratório de Pesquisa LAGOA-LADETEC da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pela realização dos ensaios de cromatografia bidimensional abrangente (CGxCG).
- Aos professores Drs. **Jamal Chaar** e **Cecília Nunez** pelas importantes observações e correções durante o Exame de Conhecimento.
- À todos os professores do corpo docente do Programa de Pós-graduação em Química, em especial aos Profs. Drs. **Genilson Santana** e **Saulo Luís da Silva**, por não medirem esforços em repassar seus conhecimentos aos alunos, dando ferramentas valiosas para minha formação profissional.
- À todos que de alguma forma contribuíram para minha formação pessoal e profissional.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Todas as vitórias ocultam uma abdicação.

Simone de Beauvoir

RESUMO

As árvores do gênero *Copaifera* (Leguminosae), conhecidas popularmente como copaibeiras, exsudam um óleo-resina extensamente utilizado na medicina popular e por indústrias farmacêuticas e de cosméticos, devido às suas atividades cicatrizante e anti-inflamatória. Quimicamente, esses óleos se caracterizam pela presença de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados e ácidos diterpênicos. No entanto, a composição química desses óleos-resina é variável e ainda não se tem conhecimento dos fatores que as determinam, embora vários fatores bióticos e abióticos sejam considerados fontes dessa variação. Essa variação dificulta a padronização da composição química desses óleos, comprometendo seu controle de qualidade e consequentemente a qualidade dos produtos a que darão origem, fato que tem causado um grande entrave à sua maior aplicação e comercialização. Essa variabilidade em sua composição química já é bastante conhecida e relatada na literatura, mas a maioria dos estudos realizados têm se restringido a caracterizar quimicamente o óleo-resina e poucos tem se preocupado em estudar as causas dessas variações. O objetivo deste trabalho foi padronizar a composição química dos óleos de copaíba por meio de técnicas de cromatografia em fase gasosa acoplada à detectores de ionização de chama (CG-DIC) e espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente (CGXCG); analisar estatisticamente a influência de fatores abióticos como sazonalidade, tipo de solo e diâmetro à altura do peito (DAP), além da infestação por cupins, sobre a composição química desses óleos. Além disso, foram comparados 5 métodos de esterificação dos ácidos diterpênicos presentes nos óleos de copaíba envolvendo catálise ácida, que utilizam BF_3/MeOH , $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ e HCl/MeOH , levando-se em consideração suas eficiências e frequências analíticas, além do consumo e toxicidade dos reagentes utilizados, relação custo benefício e, principalmente, a possibilidade de alteração/degradação da estrutura dos constituintes quando aplicados em óleos de copaíba. Para isso foram obtidos óleos de copaíba de 3 coletas: em novembro de 2004 e novembro de 2005 (épocas consideradas secas) e em maio de 2005 (época considerada chuvosa). No total, 43 amostras de óleo-resina de copaíba foram coletadas na Reserva Ducke (Manaus-AM), de 33 espécimes diferentes, que possuíam diferentes DAP's e se encontravam em diferentes tipos de solo. As análises por CG-DIC e CG-EM permitiram a identificação de 35 constituintes: sendo 22 hidrocarbonetos sesquiterpênicos, 9 sesquiterpenos oxigenados e 4 ácidos diterpênicos. Enquanto a análise por CGxCG permitiu a identificação de outros 13 sesquiterpenos, além de 7 monoterpenos, inéditos em óleos-resina de copaíba. O β -cariofileno e seu óxido foram os constituintes majoritários em 29 e 11 amostras, respectivamente. As análises hierárquica por agrupamento (HCA) e de componentes principais (PCA) evidenciaram a existência de dois grupos distintos com diferentes perfis cromatográficos, em que foi comprovada apenas a influência do tipo de solo, sobre a composição química desses óleos. Outros fatores analisados como sazonalidade, DAP e infestação por cupins, não tiveram influência sobre a composição química dos óleos-resina de copaíba. Quanto aos métodos de esterificação, as análises das 5 metodologias testadas, apesar de terem sido reprodutíveis, não se mostraram eficientes, ao passo que não permitiram a identificação dos constituintes formados e levaram à formação de artefatos.

Palavras chave: cariofileno, óleo-resina, cromatografia bidimensional, análise hierárquica por agrupamento, análise de componentes principais, monoterpenos.

ABSTRACT

The trees of the genus *Copaifera* (Leguminosae), popularly known as copaibeiras, exude an oilresin widely used in folk medicine and in pharmaceutical and cosmetics industries due to their healing and anti-inflammatory activities. Chemically, these oils are characterized by the presence of sesquiterpene hydrocarbons, oxygenated sesquiterpenes and diterpene acids. However, the chemical composition of oilresin is variable and it's not known the factors that determine them, although several biotic and abiotic factors are considered sources of variation. This variation makes it difficult to standardize the chemical composition of these oils, compromising their quality control and consequently the quality of products that will give rise, a fact that has caused a major obstacle to its wider application and marketing. This variability in its chemical composition is very well known and reported in the literature, but most studies have been restricted to characterize chemically the oilresin and few have bothered to study the causes of these variations. The objective of this study was to standardize the chemical composition of copaiba oils by techniques of gas chromatography coupled with flame ionization detector (GC-FID) and mass spectrometry (GC-MS) and comprehensive two-dimensional gas chromatography (CGXCG); analyze statistically the influence of abiotic factors such as seasonality, soil type and diameter at breast height (DBH), in addition to termite infestation on the chemical composition of these oils. In addition, 5 methods esterification of diterpene acids present in oils copaiba were compared involving acid catalysis, using BF_3/MeOH , $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ and HCl/MeOH , taking into account their effective ness and analytical frequencies, and the consumption and toxicity of reagents, cost effective and, above all, the possibility of alteration/degradation of the structure of the constituents when applied to copaiba oils. For that, copaiba oils were obtained from three collections: in November 2004 and November 2005 (dry seasons) and in May 2005 (rainy period). In total, 43 samples of copaiba oilresin was collected in the Reserva Ducke (Manaus-AM) from 33 different specimens, which had different DBH's and were in different soil types. Analyses by GC-FID and GC-MS allowed the identification of 35 constituents, 22 were sesquiterpene hydrocarbons, 9 oxygenated sesquiterpenes and 4 diterpene acids. While CGxCG analysis allowed the identification of other 13 sesquiterpenes and 7 monoterpenes, unpublished in copaiba oilresin. The β -caryophyllene and its oxide were the major constituents in samples 29 and 11, respectively. The analysis by hierarchical cluster analysis (HCA) and principal components analysis (PCA) showed the existence of two distinct groups with different chromatographic profiles, it was proven only the influence of soil type on the chemical composition of these oils. Other factors analyzed as seasonality, DBH and infestation by termites, had no influence on the chemical composition of oilresin of copaiba. As regards to esterification methods, the analysis of five tested methods, although they were reproducible, they were not efficient, since not allow the identification of the formed and led to the formation of artifacts.

Keywords: caryophyllene, oleoresin, comprehensive two-dimensional gas chromatography, analysis by hierarchical clustering, principal components analysis, monoterpenes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da espécie <i>Copaifera multijuga</i> Hayne.	13
Figura 2. Tronco de <i>Copaifera multijuga</i> com perfuração para extração do óleo-resina.....	14
Figura 3. Folha do indivíduo adulto de <i>Copaifera multijuga</i>	15
Figura 4. Fruto, semente e arilo de <i>Copaifera multijuga</i>	16
Figura 5. Principais sesquiterpenos encontrados em óleos de copaíba.	20
Figura 6. Numeração e estereoquímica normal dos esqueletos diterpênicos: caurano, clerodano e labdano. Sistema decalínico representado pelos anéis A e B.	23
Figura 7. Principais diterpenos encontrados em óleos de copaíba.	23
Figura 8. Dendrograma correspondente à classificação das vinte e três amostras de óleos-resina de copaíba (<i>C. multijuga</i>), coletadas em novembro de 2004 (1ª coleta).....	63
Figura 9. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IA, referente as amostras da 1ª coleta (novembro de 2004).	63
Figura 10. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IB, referente as amostras da 1ª coleta (novembro de 2004).....	64
Figura 11. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IIA, referente as amostras da 1ª coleta (novembro de 2004).....	65
Figura 12. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IIB, referente as amostras da 1ª coleta (novembro de 2004).....	65
Figura 13a e 13b. Gráficos de a) <i>scores</i> e b) <i>loadings</i> para Dim 1 versus Dim 2, correspondente à classificação das vinte e três amostras de óleos-resina de copaíba (<i>C. multijuga</i>), coletadas em novembro de 2004 (1ª coleta)	66
Figura 14. Dendrograma correspondente à classificação das doze amostras de óleos-resina de copaíba (<i>C. multijuga</i>), coletadas em maio de 2005 (2ª coleta).	72

Figura 15. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IA, referente as amostras da 2ª coleta (maio de 2005).	72
Figura 16. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IB, referente as amostras da 2ª coleta (maio de 2005).	73
Figura 17. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IIA, referente as amostras da 2ª coleta (maio de 2005).	74
Figura 18. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IIB, referente as amostras da 2ª coleta (maio de 2005).	74
Figura 19. Cromatograma da amostra M07-C2, referente as amostras da 2ª coleta (maio de 2005).	75
Figura 20a e 20b. Gráficos de a) <i>scores</i> e b) <i>loadings</i> para Dim 1 versus Dim 2, correspondente à classificação das doze amostras de óleos-resina de copaíba (<i>C. multijuga</i>), coletadas em maio de 2005 (2ª coleta).	76
Figura 21. Dendrograma correspondente à classificação das oito amostras de óleos-resina de copaíba (<i>C. multijuga</i>), coletadas em novembro de 2005 (3ª coleta).	81
Figura 22. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster I, referente as amostras da 3ª coleta (novembro de 2005).	82
Figura 23. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IIA, referente as amostras da 3ª coleta (novembro de 2005).	82
Figura 24. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IIB, referente as amostras da 3ª coleta (novembro de 2005).	83
Figura 25a e 25b. Gráficos de a) <i>scores</i> e b) <i>loadings</i> para Dim 1 versus Dim 2, correspondente à classificação das oito amostras de óleos-resina de copaíba (<i>C. multijuga</i>), coletadas em novembro de 2005 (3ª coleta).	84

Figura 26. Dendrograma correspondente à classificação das quarenta e três amostras de óleos-resina de copaíba (<i>C. multijuga</i>).....	87
Figura 27a e 27b. Gráficos Gráficos de a) <i>scores</i> e b) <i>loadings</i> para Dim 1 versus Dim 2, correspondente à classificação das quarenta e três amostras de óleos-resina de copaíba (<i>C. multijuga</i>).	89
Figura 28. Dendrograma correspondente à classificação das dezesseis amostras de óleos-resina de copaíba (<i>C. multijuga</i>), coletadas em novembro de 2004 (1ª coleta) e maio de 2005 (2ª coleta).....	94
Figura 29. Perfil cromatográfico das amostras do cluster I, localizadas em solos arenosos...	95
Figura 30. Perfil cromatográfico das amostras do Cluster II, localizadas em solos argilosos..	96
Figura 31. Gráficos de a) <i>scores</i> e b) <i>loadings</i> para Dim 1 versus Dim 2, correspondente à classificação das dezesseis amostras de óleos-resina de copaíba (<i>C. multijuga</i>), coletadas em novembro de 2004 (1ª coleta) e maio de 2005 (2ª coleta).....	97
Figura 32. Dendrograma correspondente à classificação das quarenta e três amostras de óleos-resina de copaíba (<i>C. multijuga</i>).....	100
Figura 33. Gráficos de a) <i>scores</i> e b) <i>loadings</i> para Dim 1 versus Dim 2, correspondente classificação das quarenta e três amostras de óleos-resina de copaíba (<i>C. multijuga</i>).....	101
Figura 34. Diagrama de cores da amostra M13-C1.....	106
Figura 35. Diagrama de cores da amostra M20-C1.....	106
Figura 36. Diagrama de cores da amostra M43-C1.....	106
Figura 37. Cromatograma da amostra M43-C1 esterificada com diazometano, analisada recentemente para a comparação das metodologias de esterificação.	108
Figura 38. Cromatograma da amostra M43-C1 esterificada com BF ₃ /MeOH - Bannon, analisada recentemente para a comparação das metodologias de esterificação.	108

- Figura 39.** Cromatograma da amostra M43-C1 esterificada com BF_3/MeOH - Metcalf, analisada recentemente para a comparação das metodologias de esterificação.. 108
- Figura 40.** Cromatograma da amostra M43-C1 esterificada com BF_3/MeOH – Joseph & Ackman analisada recentemente para a comparação das metodologias de esterificação..... 108
- Figura 41.** Cromatograma da amostra M43-C1 esterificada com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$, analisada recentemente para a comparação das metodologias de esterificação.. 108
- Figura 42.** Cromatograma da amostra M43-C1 esterificada com HCl/MeOH , analisada recentemente para a comparação das metodologias de esterificação..... 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de espécies e distribuição das copaíbas que ocorrem no Brasil.....	11
Tabela 2. Nomes comuns para copaibeiras na América Latina e Europa	13
Tabela 3. Atividades biológicas testadas em diversas espécies de óleos de copaíba.	25
Tabela 4. Dados de DAP, infestação por cupins, teor de argila e tipo de solo para cada matriz fornecedora das amostras de óleos de copaíba.	56
Tabela 5. Percentual relativo dos constituintes dos óleos-resina de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne coletados em novembro de 2004 (1ª coleta - época seca).....	58
Tabela 6. Percentual relativo dos constituintes dos óleos-resina de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne coletados em maio de 2005 (2ª coleta - época chuvosa).....	69
Tabela 7. Percentual relativo dos constituintes dos óleos-resina de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne coletados em novembro de 2005 (3ª coleta - época seca).....	79
Tabela 8. Percentual relativo dos constituintes dos óleos-resina das dezesseis amostras de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne coletados em novembro de 2004 (época seca) e maio de 2005 (época chuvosa).	92
Tabela 9. Percentual relativo dos constituintes dos óleos-resina de três amostras de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne coletados em novembro de 2004 (época seca) e analisados por cromatografia bidimensional abrangente.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAN – Bannon

BF₃ – Trifluoreto de boro

BF₃/MeOH – Trifluoreto de boro em metanol

C1 – 1ª coleta

C2 – 2ª coleta

C3 – 3ª coleta

CG – Cromatografia em fase gasosa

CG-DIC – Cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização por chama

CG-EM – Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas

CGxCG – Cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente

CO₂ – Dióxido de carbono

¹D – Primeira dimensão

²D – Segunda dimensão

DAP – Diâmetro à altura do peito

DIC – Detector de ionização por chama

Dim – Dimensão

g - gramas

H₂O – Água

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

H₂SO₄/MeOH – Ácido sulfúrico em metanol

HCA – Análise de agrupamento hierárquico

HCl – Ácido clorídrico

HCl/MeOH – Ácido clorídrico em metanol

HLA – Hartman & Lago

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

IR – Índice de retenção

JAC – Joseph & Ackman

JHA - Jham

KOH – Hidróxido de potássio

L – Litro

m – metros

mg – miligramas

min – minutos

mL – mililitros

mm – milímetros

μm – micrometros

μL – microlitros

MeOH – Metanol

MET – Metcalf

NaOH – Hidróxido de sódio

NaOCH₃ – Metóxido de sódio

PCA – Análise de componentes principais

PVC – Polivinil cloreto

R_t (s) – Tempo de retenção em segundos

s - segundos

SFC-FT-IR – Cromatografia com fluído super-crítico com detector de infravermelho

SO₂ – Dióxido de nitrogênio

TMS – Trimetilsilil

LISTA DE SÍMBOLOS

α - alfa

β - beta

δ – delta

γ – gama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1. OBJETIVO GERAL.....	7
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
3. REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1. FAMÍLIA LEGUMINOSAE	9
3.2. O GÊNERO <i>Copaifera</i>	10
3.3. A ESPÉCIE <i>Copaifera multijuga</i> HAYNE	12
3.3.1. ASPECTOS BOTÂNICOS	13
3.3.1.1. FOLHAS.....	14
3.3.1.2. FLORES	15
3.3.1.3. FRUTOS	16
3.3.1.4. ÓLEO-RESINA.....	17
3.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS DE COPAÍBA.....	18
3.5. ATIVIDADE BIOLÓGICA	24
3.6. VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA	27
3.7. PADRONIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA	32
3.8. CROMATOGRAFIA	35
3.8.1. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA (CG-DIC)	36
3.8.2. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM)	38

3.8.3. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE (CG x CG)	39
3.9. DERIVATIZAÇÃO	40
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4. METODOLOGIA	44
4.1. COLETA DAS AMOSTRAS	45
4.2. EXTRAÇÃO DO ÓLEO-RESINA	45
4.3. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	46
4.3.1. DERIVATIZAÇÃO DAS AMOSTRAS COM DIAZOMETANO EM ÉTER ETILÍCO	46
4.3.2. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA (CG-DIC)	47
4.3.3. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM)	47
4.3.4. IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES	48
4.3.5. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE (CG x CG)	48
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4.5. ESTERIFICAÇÃO	50
4.5.1. MÉTODO DE ESTERIFICAÇÃO DE CATÁLISE ÁCIDA EMPREGANDO TRIFUORETO DE BORO EM METANOL	50
4.5.1.1. MÉTODO DESCRITO POR METCALF <i>et al.</i> , 1966 (MET).....	50
4.5.1.2. MÉTODO DESCRITO POR BANNON <i>et al.</i> , 1982 (BAN)	51
4.5.1.3. MÉTODO DESCRITO POR JOSEPH & ACKMAN, 1992 (JAC).....	51

4.5.2. MÉTODO DE ESTERIFICAÇÃO DE CATÁLISE ÁCIDA EMPREGANDO ÁCIDO SULFÚRICO EM METANOL.....	52
4.5.2.1. MÉTODO DESCRITO POR HARTMAN & LAGO, 1973 (HLA)	52
4.5.3. MÉTODO DE ESTERIFICAÇÃO DE CATÁLISE ÁCIDA EMPREGANDO ÁCIDO CLORÍDRICO EM METANOL	53
4.5.3.1. MÉTODO DESCRITO POR JHAM <i>et al.</i> , 1982 (JHA).....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1. COLETA DAS AMOSTRAS E DADOS DE DAP, TIPO DE SOLO E INFESTAÇÃO POR CUPINS	55
5.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA	57
5.2.1. PRIMEIRA COLETA (C1)	57
5.2.2. SEGUNDA COLETA (C2)	68
5.2.3. TERCEIRA COLETA (C3)	77
5.2.4. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DAS TRÊS COLETAS	85
5.3. AVALIAÇÃO DOS FATORES DE INFLUÊNCIA SOBRE A VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA	91
5.3.1. SAZONALIDADE	91
5.3.2. TIPO DE SOLO.....	99
5.3.3. DAP	102
5.3.4. INFESTAÇÃO POR CUPINS	103
5.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE (CGxCG).....	103
5.5. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE ESTERIFICAÇÃO ENVOLVENDO CATÁLISE ÁCIDA	107

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	111
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114



1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que no planeta Terra existam aproximadamente 298 mil espécies de plantas terrestres e 16,6 mil espécies de plantas aquáticas, das quais apenas 215,6 mil espécies de plantas terrestres e 8,6 mil espécies de plantas aquáticas já estão catalogadas (MORA *et al.*, 2011). Mas apesar do aumento de estudos na área de produtos naturais, estima-se que apenas 5-15% dessas espécies de plantas já foram investigadas (BRAZ-FILHO, 2010).

O Brasil com uma extensa área territorial e vários biomas (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal), apresenta uma grande diversidade de solos e climas que favorece a riqueza e variedade de tipos de vegetação, distribuídas nos diversos ecossistemas brasileiros. Possuindo entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o país com maior número de espécies endêmicas, abrigando aproximadamente 55 mil espécies de plantas (BARREIRO & BOLZANI, 2009). Toda essa biodiversidade é considerada uma potencial fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental, tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos.

A Floresta Amazônica, maior reserva de diversidade biológica do mundo, é também o maior bioma brasileiro em extensão e ocupa quase metade do território nacional (49,29%) (IBGE, 2012). Mesmo possuindo uma grande diversidade biológica, verifica-se que existem poucos estudos em relação à quantidade de espécies presentes nessa floresta (NODORI & GUERRA, 2004). A comunidade científica está empenhada na descoberta de produtos naturais biologicamente ativos. Excelentes pesquisas demonstram que as plantas medicinais, na sua forma *in natura* ou como extratos, apresentam potenciais terapêuticos para o desenvolvimento de novos produtos (BALUNAS & KINGHORN, 2005; NEWMAN & GRAGG, 2007).

Entre as inúmeras espécies vegetais da flora brasileira que apresentam substâncias químicas biologicamente ativas, destaca-se o gênero *Copaifera*, compreendendo diversas espécies produtoras de um óleo-resina que se caracteriza pela presença de uma importante classe de metabólitos que são os terpenos, responsáveis por diversas atividades terapêuticas. Além da produção do óleo-resina que tem grande aplicação para fins medicinais e cosméticos, as árvores deste gênero, também conhecidas como copaibeiras, destacam-se pelo uso de seu tronco pela indústria madeireira que ocorre em função de características como alta resistência a ataque de fungos xilófagos, baixa permeabilidade, e alta durabilidade da madeira, que também apresenta superfície lisa e lustrosa, e uma textura média e uniforme (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002).

Apesar da extensa literatura sobre os óleos-resina de copaíba, poucas referências discriminam a espécie de *Copaifera* que está sendo estudada. Somente dez espécies encontradas no Brasil tiveram seus óleos-resina estudados: *C. cearensis*, *C. duckei*, *C. guianensis*, *C. langsdorffii*, *C. martii*, *C. multijuga*, *C. officinalis*, *C. paupera*, *C. reticulata* e *C. trapezifolia*; tendo sido identificados mais de 100 sesquiterpenos e 40 diterpenos, alguns com atividades biológicas já testadas e comprovadas (LEANDRO *et al.*, 2012).

Já existe evidência da correlação entre a atividade antiinflamatória com os óleos que apresentam maiores teores de ácidos diterpênicos (FERNANDES *et al.*, 1992). Enquanto a fração sesquiterpênica é responsável pelo aroma do óleo-resina de copaíba. Seu concentrado é bastante procurado pelas indústrias de perfumes e cosméticos, podendo chegar a ser 600 vezes mais caro que o óleo bruto. No entanto, frações ricas em hidrocarbonetos sesquiterpênicos também são reputadas como importantes no efeito antiinflamatório, no entanto com prováveis efeitos sinérgicos (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2001). Dentre as atividades biológicas mais citadas destacam-se a antiinflamatória, antimicrobiana, antileishmanial, analgésica e antitumoral.

Mesmo apresentando diversas aplicações nas indústrias farmacêutica e de cosméticos, a comercialização do óleo de copaíba vem diminuindo devido a variação na composição química que esses óleos costumam apresentar. Esta variação é muitas vezes atribuída à mistura de óleos de diferentes espécies botânicas, ou ainda, de espécimes de idades e locais diferentes; má identificação das espécies; falta de padronização do óleo-resina ou ainda a problemas de falsificação/adulteração (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 1997; VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002). Além disso, a presença de substâncias químicas em uma determinada espécie tem sido atrelada ao período e modo de extração na coleta; sazonalidade, diâmetro à altura do peito (DAP), tipo de solo e tamanho da copa (ALENCAR, 1982; FERREIRA & BRAZ, 2001; VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002; PLOWDEN, 2003; RIGAMONTE-AZEVEDO *et al.*, 2004; MEDEIROS, 2006).

Assim, a falta de parâmetros efetivos para caracterizar e consequentemente realizar o controle de qualidade dos óleos de copaíba, aliada à variabilidade natural inerente a esta matéria-prima e à crescente demanda do mercado, podem comprometer a qualidade dos produtos que utilizam esses óleos-resina como matéria-prima, já que a variação na composição química pode influenciar a ação farmacológica e a toxidez dos produtos que o utilizam em suas composições, gerando um grande entrave econômico para a região (CASCON & GILBERT, 2000; BIAVATTI *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos analíticos têm sido realizados buscando técnicas para a padronização de óleos de copaíba, apesar de suas variações naturais. Vasconcelos & Godinho (2002), propuseram um método titulométrico simples para padronização do óleo de copaíba. No entanto, a cromatografia em fase gasosa têm sido a técnica mais empregada. Mas esta técnica apresenta certos inconvenientes, pois só pode ser empregada na análise de substâncias voláteis e termicamente estáveis; caso contrário, há necessidade de se formar um derivado com essas características, o que nem sempre é viável.

Por isso, o presente trabalho visa analisar estatisticamente possíveis influências da sazonalidade, tipo de solo, diâmetro a altura do peito (DAP) e infestação por cupins, na composição química dos óleos de copaíba (*Copaifera multijuga*), para posterior padronização da composição química orgânica utilizando técnicas de cromatografia em fase gasosa acoplada à detectores de ionização de chama (CG-DIC), à espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente (CGxCG). Pretende ainda comparar métodos de esterificação envolvendo catálise ácida, normalmente utilizados na transesterificação de ácido graxos, quando aplicados em óleos de copaíba.



2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Definir o padrão de composição química orgânica de óleos de copaíba obtidos da espécie *Copaifera multijuga* Hayne por meio de técnicas de cromatografia em fase gasosa e verificar a eficiência de diferentes métodos de esterificação dos ácidos terpênicos presentes nos óleos de copaíba.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a composição química dos óleos de copaíba desta espécie por meio de técnicas de cromatografia em fase gasosa acoplada à detectores de ionização de chama (CG-DIC), cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente (CGxCG);
- Verificar e analisar estatisticamente a influência da sazonalidade, do tipo de solo, do diâmetro a altura do peito e da infestação por cupins na composição química desses óleos;
- Comparar métodos de esterificação envolvendo catálise ácida quando aplicados em óleos de copaíba, levando-se em consideração a eficiência, frequência analítica, consumo e toxicidade dos reagentes utilizados, relação custo benefício e, principalmente, a possibilidade de alteração/degradação da estrutura dos constituintes.



3. Revisão da Literatura

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. FAMÍLIA LEGUMINOSAE

A família Leguminosae Juss. é uma das maiores famílias botânicas, considerada a de maior riqueza de espécies arbóreas nas florestas neotropicais, sendo representadas por grandes árvores, ervas e trepadeiras; compreende 727 gêneros e cerca de 19.000 espécies. Está dividida em quatro sub-famílias: Faboideae (ou Papilionoideae), Caesalpinioideae (ou Caesalpinaceae), Mimosoideae (ou Mimosaceae) e Cercideae (SOUZA & LORENZI, 2005). As leguminosas apresentam vasta distribuição geográfica, ocorrendo em quase todas as regiões do mundo, excetuando-se as regiões árticas e antárticas e algumas ilhas. No Brasil, ocorrem aproximadamente 178 gêneros e 3.200 espécies (BARROSO *et al.*, 1991), e muitas destas espécies são exclusivas de ecossistemas brasileiros.

O potencial econômico dessa família é incontestável, pois seus frutos e sementes são consumidos como alimento (LEWIS, 1987; LEWIS & OWEN, 1989). Além disso, fornece madeiras, resinas e óleos de boa qualidade, matéria-prima para perfumes, tinturas e fármacos. Uma característica típica dessa família é a ocorrência do fruto do tipo legume, também conhecido como vagem, exclusivo desse grupo.

É importante lembrar que as leguminosas eram anteriormente denominadas como pertencentes à família Fabaceae. Segundo a nomenclatura botânica atual, Fabaceae Lindley dá lugar a Leguminosae Juss.. Todavia, a classificação referindo-se a apenas como Fabaceae ainda pode ser encontrada em alguns livros e publicações (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002).

3.2. O GÊNERO *Copaifera*

O gênero *Copaifera* pertence à família Leguminosae Juss., subfamília Caesalpinoideae Kunth.. As copaibas ou copaibeiras (do tupi *cupa-yba*, que significa “árvore com depósito”), como são vulgarmente chamados os espécimes desse gênero, são árvores nativas da região tropical da América Latina e também da África Ocidental (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002). Segundo Dwyer (1954), este gênero reúne 28 espécies válidas, sendo 16 endêmicas do Brasil (Tabela 1), das quais pelo menos 11 ocorrem na Amazônia brasileira: *C. duckei* Dwyer, *C. glycyarpa* Ducke, *C. guianensis* Desf., *C. langsdorffii* Desf., *C. martii* Hayne, *C. multijuga* Hayne, *C. officinalis* (Jacq.) L., *C. paupera* (Herzog) Dwyer, *C. piresii* Ducke, *C. publiflora* Benth. e *C. reticulata* Ducke. Além disso, a espécie *C. langsdorffii* é particularmente importante por estar distribuída em todo o território brasileiro e por possuir 4 variedades: *C. langsdorffii* var. *grandifolia*, *grandiflora*, *laxa* e *glabra* (LEITE & LLERAS, 1993).

As copaibeiras se adaptam a uma grande variedade de ambientes, ocorrendo em florestas de terra firme, matas de transição, capoeiras, campos, campinaranas, em áreas alagadas, e/ou nas margens de lagos e igarapés, e até mesmo em dunas (MARTINS-DA SILVA *et al.*, 2008). São encontradas tanto em solos arenosos como argilosos (ALENCAR, 1982), areno-argilosos, pedregosos ou rochosos e salinos do litoral (COSTA NETO, 1991). Seus espécimes adultos ocupam o dossel da floresta ou emergem ocasionalmente (ALENCAR *et al.*, 1979; SAMPAIO, 2000; PLOWDEN, 2004). Segundo Costa Neto (1991), de acordo com a ocorrência dos espécimes é possível observar certa preferência por habitats com áreas úmidas, como margens de rios, igarapés, lagos; áreas periodicamente inundáveis como várzeas e áreas permanentemente inundadas como igapós.

Tabela 1. Relação de espécies e distribuição das copaíbas que ocorrem no Brasil.

Espécie	Local onde é encontrada
<i>C. brasiliensis</i> Dwyer	MT
<i>C. cearensis</i> Huber ex Ducke	CE
<i>C. confertiflora</i> Benth.	PI
<i>C. coriacea</i> Mart.	PI, MA, BA
<i>C. duckei</i> Dwyer	BA, CE, PA, MA
<i>C. elliptica</i> Mart.	MT
<i>C. glycyarpa</i> Ducke	AM, PA, MT
<i>C. guianensis</i> Desf.	AM (Colômbia, Guiana Francesa e Suriname)
<i>C. langsdorffii</i> Desf.	Todo o Brasil, principalmente AM, PA, CE (Argentina e Paraguai)
<i>C. lucens</i> Dwyer	RJ
<i>C. lutxelburgii</i> Harms	PI, PE, BA
<i>C. malmei</i> Harms	MT
<i>C. marginata</i> Benth.	Chapada das Mangabeiras, GO
<i>C. marjorina</i> Dwyer	BA
<i>C. martii</i> Hayne	PA, MA, PI, GO, MT
<i>C. multijuga</i> Hayne	PA, AM, RO, MT (Bolívia e Peru)
<i>C. oblongifolia</i> Mart.	MA, GO, MG
<i>C. officinalis</i> (Jacq.) L.	Norte do AM, RR (Colômbia, San Salvador e Venezuela)
<i>C. paupera</i> (Herzog) Dwyer	AC, AM (Bolívia e Peru)
<i>C. piresii</i> Ducke	AM, PA, RO, MT
<i>C. publiflora</i> Benth.	RR (Colômbia, Guiana e Venezuela)
<i>C. reticulata</i> Ducke	AP, PA
<i>C. rondonii</i> Hoehne	Urupá-RO, Serra da Pacca-Nova, Rio Cautário, MT
<i>C. trapezifolia</i> Hayne	Região Sudeste, sul, BA, PE, MG, MS

Dwyer, 1951; Ducke, 1958; Veiga-Junior & Pinto, 2002; Martins-da-Silva *et al.*, 2008.

A importância das árvores de copaíba se deve à sua madeira de boa qualidade e à produção de seu óleo-resina, que têm sido largamente utilizados pelas populações tradicionais e indústrias farmacêuticas devido às suas propriedades terapêuticas (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002). Embora nem todas as espécies de *Copaifera* sejam capazes de produzir este óleo, todas as espécies que ocorrem no Brasil são consideradas produtoras de óleo-resina. Os óleos obtidos das espécies de *C. reticulata*, *C. langsdorffii* e *C. multijuga* são os mais comercializados por serem espécies abundantes e produzirem maiores quantidades de óleo (ALENCAR, 1982; LEITE *et al.*, 2002; VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002). Além disso, esses óleos estão sendo empregados também pelas indústrias de perfumaria, de cosméticos e de vernizes, como agente fixador (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002).

3.3. A ESPÉCIE *Copaifera multijuga* HAYNE

As espécies do gênero *Copaifera* compartilham muitas características em comum e somente uma análise da morfologia externa não é suficiente para distingui-las (DUCKE, 1958). Sua identificação botânica normalmente é realizada de acordo com as características das flores e dos frutos, mas estes são dificilmente encontrados, pois o período de floração é rápido e nem sempre é anual (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002). De acordo com Alencar (1988), a *C. multijuga* apresenta floração e frutificação em intervalos de dois anos na Reserva Ducke, em Manaus.

Esta espécie ocorre no norte da América do Sul, abrangendo Brasil, Bolívia e Peru. No Brasil, ocorre principalmente nos estados do Amazonas e Pará. Segundo Ducke (1949), esta espécie ocorre na parte ocidental do Estado do Pará e médio Tapajós; em Santa Júlia, no limite com o Estado do Amazonas; em Parintins; em Maués e Manaus. No Herbário do INPA foram registrados materiais botânicos desta espécie em mais cinco municípios do Estado do Amazonas: Borba, Carauari, Itacoatiara, Novo Aripuanã e Tefé. Há ainda descrições mais específicas de distribuição que afirmam que a espécie ocorre também na Bahia, em Rondônia e no Mato Grosso (Figura 1).

No Brasil, os óleos de copaíba são conhecidos por diferentes denominações: bálsamo, bálsamo dos jesuítas, caobi, capaíba, capaúba, coopaíba, copaí, copaibeira, copaibeira-de-minas, copahypa, copaíba, copaíba-angelim, copaíba-branca, copaíba-preta, copaíba-mari-mari, copaíba-de-várzea, copaíba-vermelha, copaíba-roxa, copaibarana, copaibo, copaúba, copaúva, copal, cupaúva, cupiúva, cupiúba, maram, marimari, oleiro, óleo, óleo-amarelo, óleo-óleo-capaíba, óleo-copaíba, óleo-de-copaíba, óleo-pardo, óleo-vermelho, pau-de-óleo, pau-óleo, pau-d'óleo, pau-óleo-de-copaíba, pau-óleo-do-sertão e podói (CLEMENT *et al.*, 1999; VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002).

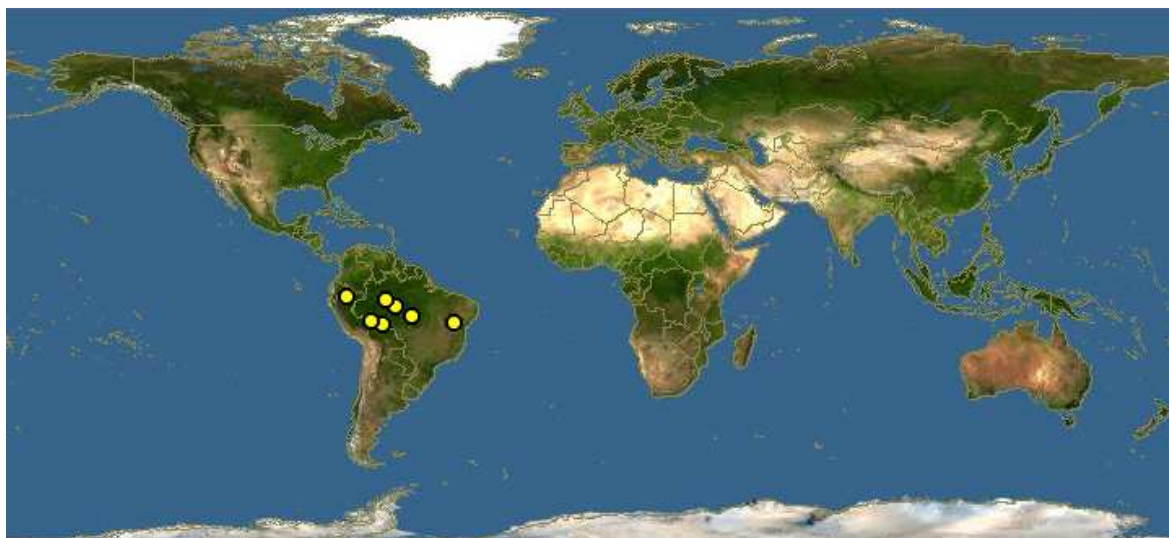


Figura 1. Distribuição da espécie *Copaifera multijuga* Hayne.

Fonte: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Copaifera+multijuga>

Cascon (2004) e Plowden (2004) citam nomes comuns das copaibeiras na América Latina e na Europa (Tabela 2).

Tabela 2. Nomes comuns para copaibeiras na América Latina e Europa.

País	Nome Comum
Colômbia	arbol de aceite, trompo poerco, canime, copaibi, kurma
Chile	bálsamo de copaíba, copaíba del Brasil
França	copayer, copahu, huile de copahu, baume de copahu, huile de copayer, baume de copayer
Guiana	bálsamo, maram
Guiana Francesa	Panchimouti
Inglaterra	copaiba balsam, copaiva balsam, copaiva
Paraguai	cupay, kupa'y
Peru	copaíva, copaíba branca
Suriname	apoewa, hoepelboom, hoepelhout, hoepro
Venezuela	aceite de palo, aceite de zaraza, cabima, cabimba, cabimo, calenibo, balsamo de copaíba, curriçon

Veiga-Junior & Pinto, 2002; Cascon, 2004; Plowden, 2004.

3.3.1. ASPECTOS BOTÂNICOS

As copaibeiras são árvores de crescimento lento e podem viver até 400 anos, podendo alcançar até 60 metros de altura e 120 cm de diâmetro à altura do peito (DAP), sendo mais comum encontrar árvores em torno de 40-50 cm de DAP (ALENCAR, 1981; MARTINS-DA-

SILVA *et al.*, 2008; BRUM *et al.*, 2009). A casca é lisa, persistente, de coloração cinza a cinza-avermelhada (Figura 2), com estrias verticais e superficiais. O tronco é áspero, de coloração escura. A forma do fuste geralmente é cônica, mas podem ocorrer fustes cilíndricos, e os troncos podem apresentar sapopemas discretas. A copa é geralmente circular e irregular (DWYER, 1954; ALENCAR, 1981; VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002; BRUM *et al.*, 2007).



Figura 2. Tronco de *Copaifera multijuga* com perfuração para extração do óleo-resina.
Fonte: Manual de Sementes da Amazônia, fascículo 9, 2009 (BRUM *et al.*, 2009).

3.3.1.1. FOLHAS

As folhas (Figura 3) são compostas, alternadas, pecioladas, medindo de 12 a 23 cm, com 8-20 folíolos elípticos e alternos (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002; BRUM *et al.*, 2009).



Figura 3. Folha do indivíduo adulto de *Copaifera multijuga*.

Fonte: Manual de Sementes da Amazônia, fascículo 9, 2009 (BRUM *et al.*, 2009).

3.3.1.2. FLORES

As flores são brancas, pequenas, apétalas, hermafroditas e arranjadas em panículos axilares (CLEMENT *et al.*, 1999). A polinização é realizada por abelhas, como *Trigona* sp. e *Apis mellifera* (RIGAMONTE-AZEVEDO *et al.*, 2004). A floração e frutificação das copaíbas normalmente ocorrem a partir dos cinco anos de idade (SANTOS, 1979), mas a época de floração e frutificação não é uniforme entre as diferentes regiões ou espécies de copaíba. No Amazonas, a floração e frutificação de *C. multijuga* ocorrem de janeiro a abril (estação chuvosa) e de março a agosto, respectivamente (ALENCAR *et al.*, 1979). Enquanto, a floração desta mesma espécie ocorre entre dezembro e janeiro, com frutificação de janeiro a julho, na região do Tapajós (CARVALHO, 1994).

3.3.1.3. FRUTOS

Os frutos são legumes (Figura 4), com tamanho médio de 3,6 x 2,9 x 2,0 cm e peso médio de 8,5 g. Inicialmente de coloração amarela a vermelha, tornando-se marrom-escuro com a maturação. Possuem formato globóide, contêm uma semente envolvida por um arilo abundante e colorido que envolve mais da metade da semente (CAMARGO *et al.*, 2008; BRUM *et al.*, 2009).

As sementes têm formato elipsóide e tamanho médio de 2,0 x 1,3 x 1,1 cm e peso médio de 1,8 g. Coloração preta, opaca e de consistência firme. Geralmente, há uma semente por fruto, mas já foram encontradas até três sementes em um fruto (CAMARGO *et al.*, 2008). Sua dispersão natural é do tipo barocórica (atua com a força da gravidade), e tem aves como o sabiá como os maiores responsáveis por sua dispersão, que as levam a grandes distâncias.

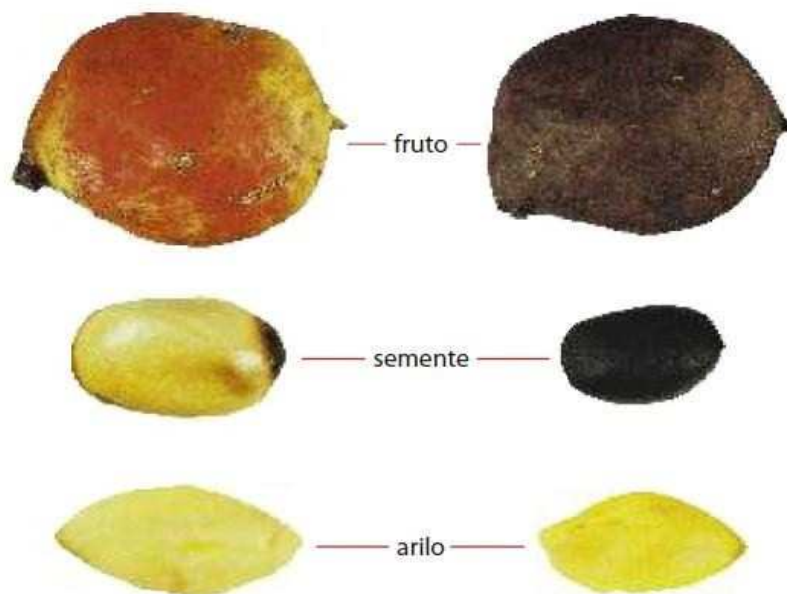


Figura 4. Fruto, semente e arilo de *Copaifera multijuga*.

Fonte: Manual de Sementes da Amazônia, fascículo 9, 2009 (BRUM *et al.*, 2009).

3.3.1.4. ÓLEO-RESINA

O óleo-resina de copaíba pode ser quimicamente definido como uma solução de ácidos diterpênicos dissolvidos em um óleo essencial constituído majoritariamente por sesquiterpenos (ALENCAR, 1982; ARRHENIUS *et al.*, 1983; MONTI *et al.*, 1996; BRAGA *et al.*, 1998; CASCON & GILBERT, 2000). Biologicamente, este óleo é produto da deterioração das paredes celulares do tronco e já foi descrito como produto da excreção e/ou desintoxicação do organismo vegetal, que funcionaria como defesa das plantas contra animais, fungos e bactérias (ALENCAR, 1982).

O óleo-resina pode ser classificado quanto a sua coloração, turbidez e viscosidade. Suas características físicas variam de transparente a opaco, mais ou menos viscoso, de coloração que varia do amarelo ao vermelho, podendo ser incolor. É insolúvel em água e parcialmente solúvel em álcool. Quando exposto ao ar, o óleo-resina escurece e se torna mais viscoso. Apesar da ampla variação de suas características físicas, o óleo-resina é um dos produtos mais procurados pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (CASCON & GILBERT, 2000).

Segundo Plowden (2001), o óleo-resina de copaíba é produzido principalmente por árvores que apresentam DAP entre 45 e 65 cm (indivíduos de 90 a 130 anos). Atualmente, a extração do óleo-resina é realizada através de perfurações no tronco feitas com um trado metálico a 1m de altura do solo. As perfurações atingem o cerne da árvore e após a coleta, o furo é lacrado com cano de PVC. No entanto, Leite (2004) relata duas técnicas de extração muito comuns na Amazônia:

a) Extração tradicional: na qual a abertura no tronco é realizada com um machado, que desperdiça muito óleo e compromete a reabilitação da copaibeira;

b) Extração total: na qual as copaibeiras são derrubadas e abertas para a obtenção do óleo, sua madeira é posteriormente vendida ou queimada.

Cordeiro *et al.* (2004) relatam ainda outro método de extração do óleo, no qual é realizado o corte em estrias na casca e no lenho. Segundo ele, neste processo são avaliadas a profundidade e o número de estrias necessárias para a realização da extração, além do intervalo de realização dos cortes.

A produção do óleo-resina por árvore é variável e ainda não se tem conhecimento dos fatores que a determinam, embora vários fatores sejam considerados fontes de variação, como: condições ambientais do local de crescimento das árvores, características genéticas e sazonalidade, sugerindo que o potencial econômico deste recurso é limitado (ALENCAR, 1982), mesmo quando explorado seguindo um plano de manejo (Leite *et al.*, 2004).

3.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS DE COPAÍBA

Quimicamente, o gênero *Copaifera* destaca-se por apresentar uma enorme diversidade de metabólitos secundários. Cascon (2004) define esse óleo-resina como uma solução natural de resina (fração fixa de ácidos diterpênicos) dissolvida em óleo volátil (composta por hidrocarbonetos sesquiterpênicos). Segundo ela, os hidrocarbonetos sesquiterpênicos representam cerca de 80% dos constituintes dos óleos-resina de copaíba.

Um dos primeiros estudos químicos com o óleo-resina de copaíba foi realizado por Freise (1934), que descreveu a obtenção do óleo essencial a partir do óleo-resina. Posteriormente, Gottlieb (1945) obteve o óleo essencial a partir do óleo-resina de copaíba comercial. Mais tarde, Ferrari e colaboradores obtiveram o óleo-resina de *C. langsdorffii*, constituído por 50% de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e 25% de ácidos diterpênicos com esqueletos labdanos e cauranos. A partir da fração sesquiterpênica, obtiveram como

constituintes majoritários cariofileno, copaeno e bisaboleno, e como minoritários os sesquiterpenos bourbouneno, cipereno, humuleno e cadineno (FERRARI *et al.*, 1971). Craveiro e colaboradores (1981) descreveram ainda a composição de um óleo essencial obtido a partir de um óleo-resina de *Copaifera sp.*, onde os principais sesquiterpenos identificados foram o β -cariofileno, α -humuleno, β -bisaboleno, α -cubebeno, α -muuroleno, α -copaeno, *trans*- α -farneseno, δ -cadineno e α -bergamoteno (CRAVEIRO *et al.*, 1981).

Estudos químicos mais antigos com espécies de *Copaifera* descrevem ainda a existência de cumarinas nas sementes de *C. salikounda*, uma espécie sul-africana (FICALHO, 1894). Além dos hidrocarbonetos e cumarinas, ácidos graxos também foram identificados em sementes de *C. langsdorffii* e *C. officinalis* (CRAVEIRO *et al.*, 1978; VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2007). Análises por cromatografia em fase gasosa permitiram ainda a detecção de ésteres metílicos de ácido graxos, incomuns em sementes, em *C. officinalis* (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2007). Segundo Silva e colaboradores (2006), o óleo essencial extraído das folhas possui composição química semelhante à fração volátil do óleo-resina.

Segundo revisão feita por Veiga-Junior & Pinto (2002), até aquele ano eram descritos na literatura cerca de setenta e dois sesquiterpenos e vinte e sete diterpenos. Desde então, diversos trabalhos que utilizaram técnicas antigas e modernas de isolamento e identificação permitiram a identificação de outros sesquiterpenos e diterpenos. Desde então, pelo menos trinta e oito outros sesquiterpenos foram identificados em óleos-resina de copaíba, sendo trinta e cinco em óleos-resina de *C. duckei*, *C. paupera*, *C. piresii*, *C. pubiflora* e *C. reticulata*: *cis*- α -bergamoteno, *trans*- α -bergamoteno, (Z)- α -bisaboleno, (E)- γ -bisaboleno, (Z)- γ -bisaboleno, *epi*- β -bisabolol, α -bulneseno, *trans*-cadina-1(2),4-dieno, *trans*-cadina-1(6),4-dieno, β -chamigreno, *epi*-cubebol, cubenol, *epi*-cubenol, β -curcumeno, γ -curcumeno, ciclosativeno, cipereno, 4,5-diepiaristolocheno, (E)- β -farneseno, (Z)- β -farneseno, (E,E)- α -farneseno, germacreno A, globulol, guaia-6,9-dieno, *cis*- β -guaieno, *trans*- β -guaieno, γ -

gurjuneno, epóxido de humuleno II, *epi*- α -muurolol, *epi*- β -santaleno, 7-*epi*- α -selineno, sesquisabineno, 7-*epi*-sesquitujeno, valenceno e viridifloreno (LAMEIRA *et al.*, 2009; ZOGHBI *et al.*, 2009; ZOGHBI *et al.*, 2009; HERRERO-JÁUREGUI *et al.*, 2011). A partir da hidrodestilação dos óleos-resina de *C. langsdorffii* e *C. martii* foram identificados ainda mais três sesquiterpenos: selina-3,7(11)-dieno (GRAMOSA & SILVEIRA, 2005), α -calacoreno e o gleenol (ZOGHBI *et al.*, 2007).

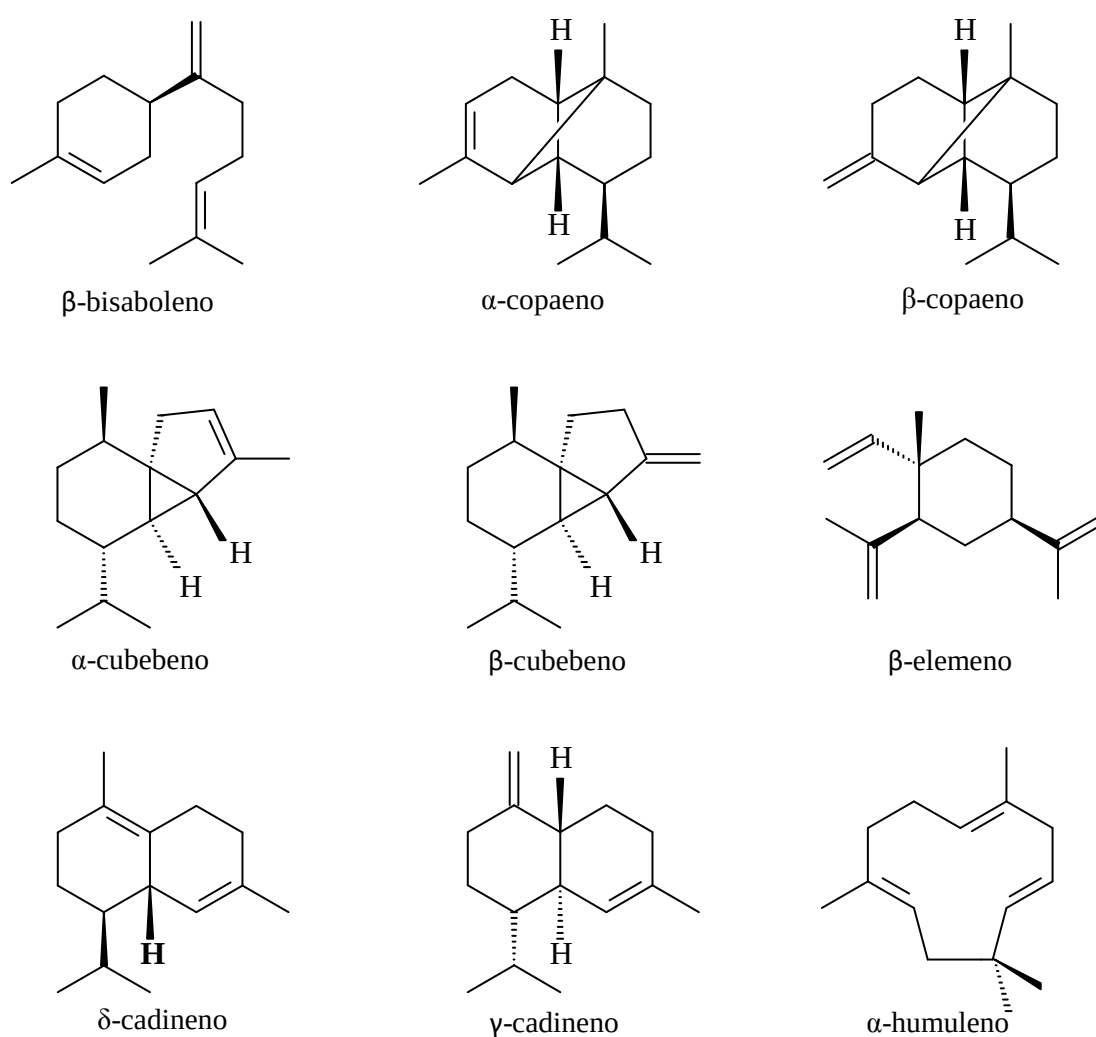


Figura 5. Principais sesquiterpenos encontrados em óleos de copaíba.

Mesmo com a grande variedade de sesquiterpenos já identificados em óleos-resina de copaíba, os sesquiterpenos descritos com maior frequência são: o α -amorfeno, β -bisaboleno, δ

e γ -cadineno, α e β -copaeno, α e β -cubebeno, β -elemeno, germacreno D, α -humuleno, β -cariofileno, óxido de cariofileno, α e β -selineno (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002).

Continuação da Figura 5

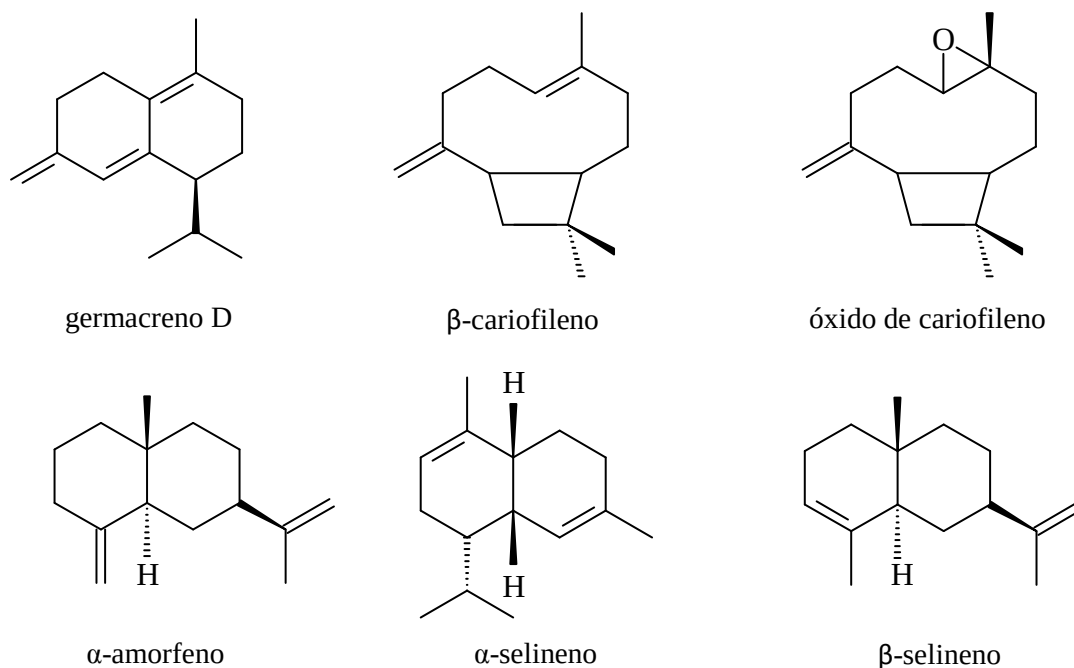


Figura 5. Principais sesquiterpenos encontrados em óleos de copaíba.

Entre os sesquiterpenos, o β -cariofileno e seu óxido são comumente encontrados em óleos-resina de copaíba e em óleos de muitas outras espécies de plantas (TUNG *et al.*, 2008; CHAVAN *et al.*, 2010). O β -cariofileno é considerado como um dos compostos mais importantes por ser majoritário nos óleos-resina de copaíba e por possuir atividades biológicas como: antiinflamatória (PASSOS *et al.*, 2007; TUNG *et al.*, 2008; CHAVAN *et al.*, 2010), antimicrobiana (CHENG *et al.*, 2004; GOREN *et al.*, 2011), inseticida (OMOLO *et al.*, 2004; RODILLA *et al.*, 2008), anticarcinogênico (ZHENG *et al.*, 1992; KUBO *et al.*, 1996; LEGAULT *et al.*, 2007; DI SOTTO *et al.*, 2010), anestésico local (TAMBÉ *et al.*, 1996; GHELARDINI *et al.*, 2001), entre outras (STANDEN *et al.*, 2006; CHANG *et al.*, 2007). Este sesquiterpeno normalmente é encontrado como mistura de *iso*-cariofileno e α -humuleno,

tem como característica apresentar um anel ciclobutano, raro na natureza (SABULAL *et al.*, 2006). Este composto pode se oxidar quando exposto ao ar, uma característica dos sesquiterpenos insaturados. Além disso, o β -cariofileno já foi descrito como um composto volátil emitido pelas plantas na atmosfera em resposta ao ataque de herbívoros (SABULAL *et al.*, 2006). Enquanto o óxido de cariofileno já foi descrito como possível artefato oxidativo, produzido durante a armazenagem do óleo-resina (CASCON & GILBERT, 2000). O monitoramento da oxidação do β -cariofileno por RMN- H^1 mostrou que a oxidação completa desse sesquiterpeno em seu óxido ocorre em quinze dias (GRAMOSA & SILVEIRA, 2005).

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

Existem algumas dúvidas quanto às estruturas exatas desses dois últimos diterpenos. O *ent-dinorlabdano-(-)-13(R)-14,15-dinorlabda-8(17)-eno-3,13-diol* foi isolado a partir de um óleo-resina de copaíba comercial (ROMERO, 2007; ROMERO *et al.*, 2009). Esta substância pode ter sido degradada a partir do ácido 3-hidróxi-copálico, uma vez que o óleo-

resina, sem identificação, teria sido expostos à condições de luz e temperatura que possam ter levado à perda de parte da cadeia lateral. Já o pauperol, um éster metílico C35, é uma substância produzida pelo acoplamento de um diterpeno labdanóico e um álcool sesquiterpênico, dando origem ao éster pauperol, isolado a partir de *C. paupera* (TINCUSI *et al.*, 2002). Assim, esta substância pode não ser originalmente encontrada no óleo-resina, uma vez que os autores relatam que foi realizada esterificação com diazometano antes do isolamento.

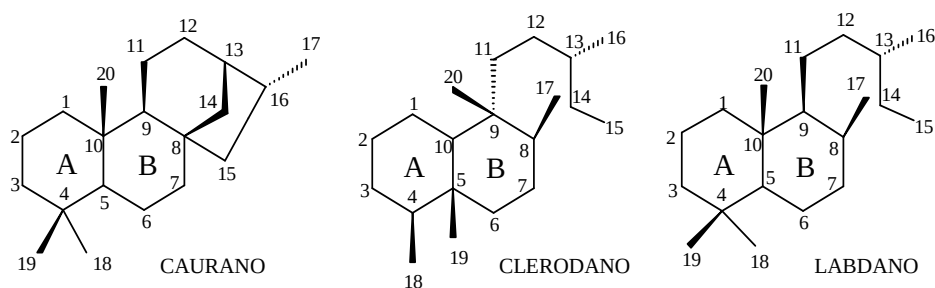


Figura 6. Numeração e estereoquímica normal dos esqueletos diterpênicos: caurano, clerodano e labdano. Sistema decalínico representado pelos anéis A e B.

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

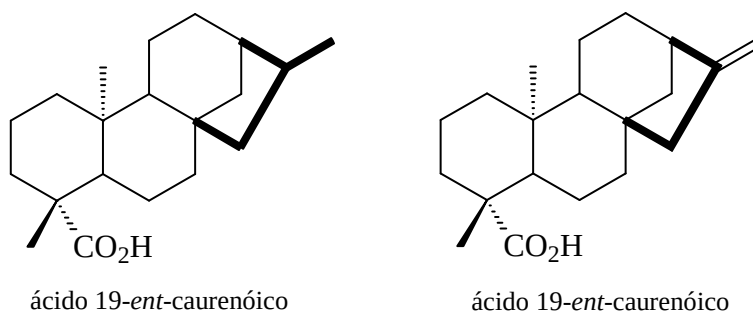


Figura 7. Principais diterpenos encontrados em óleos de copaíba.

Continuação da Figura 7

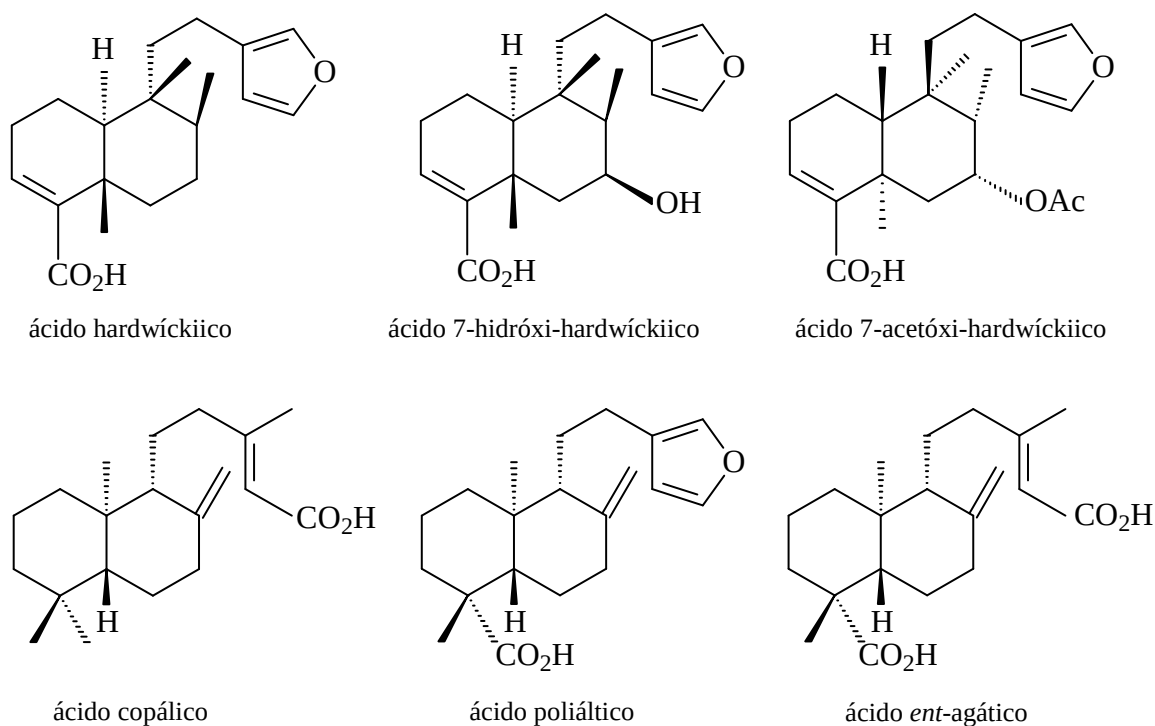


Figura 7. Principais diterpenos encontrados em óleos de copaíba.

3.5. ATIVIDADE BIOLÓGICA

Óleos de espécies de *Copaifera* sem identificação, definidas como *C. sp* (óleos de copaíba comerciais), são referenciados na literatura como possuindo atividades antiinflamatória (BASILE *et al.*, 1988; VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2001), antimicrobiana (PACHECO *et al.*, 2006), inseticida (RIBAS *et al.*, 2010; KANIS *et al.*, 2012; PROPHIRO *et al.*, 2012; PROPHIRO *et al.*, 2012) e de perfusão da pele (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A espécie *C. multijuga* é caracterizada por ter atividades como: antitumoral (LIMA *et al.*, 2003; GOMES *et al.* 2008), cicatrizante (WESTPHAL *et al.*, 2007), antimicrobiana (PACHECO *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2008; MENDONÇA & ONOFRE, 2009), antiinflamatória (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2007; GOMES *et al.* 2010), antinociceptiva

(GOMES *et al.* 2007; GOMES *et al.* 2010) e antileishmanial (SANTOS *et al.*, 2008). Algumas indicações etnofarmacológicas já foram confirmadas por estudos farmacológicos. Como os constituintes dos diversos óleos de copaiba são semelhantes, é possível que propriedades biológicas descritas em outras espécies sejam compartilhadas em *C. multijuga* como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Atividades biológicas testadas em diversas espécies de óleos de copaiba.

Espécie	Atividade Biológica	Referências
<i>C. cearenses</i> Huber ex Ducke	Antiinflamatória	(VEIGA-JUNIOR <i>et al.</i> , 2007)
	Antimicrobiana	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008)
	Antileishmania	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008)
<i>C. duckei</i> Dwyer	Antiproliferativa	(CASTRO-E-SILVA JR. <i>et al.</i> , 2004)
	Antiinflamatória	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2005)
	Analgésica	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2005)
	Antimutagênica	(MAISTRO <i>et al.</i> , 2005)
	Embriotoxicidade	(LIMA <i>et al.</i> , 2011)
<i>C. langsdorffii</i> Desf.	Efeito gastroprotetor em modelo de úlcera gástrica experimental em ratos	(PAIVA <i>et al.</i> , 1998)
	Antimutagênica	(CHEN-CHEN <i>et al.</i> , 2002)
	Cicatrização de feridas	(PAIVA <i>et al.</i> , 2002; VIEIRA <i>et al.</i> , 2008; COMELLI-JÚNIOR <i>et al.</i> , 2010)
	Antiinflamatória	(PAIVA <i>et al.</i> , 2004; NOGUEIRA-NETO <i>et al.</i> , 2011)
	Atenuante de isquemia/ indutor de reperfusão intestinal	(PAIVA <i>et al.</i> , 2004)
	Inseticida	(MENDONÇA <i>et al.</i> , 2005)
	Antioxidante	(MACIEL <i>et al.</i> , 2007) (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2007; SANTOS <i>et al.</i> , 2008;
	Antimicrobiana	PIERI <i>et al.</i> , 2010; PIERI <i>et al.</i> , 2010; PIERI <i>et al.</i> , 2011)
	Antileishmania	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008)
	Isquemia e reperfusão de fragmentos cutâneos randomizados	(SILVA <i>et al.</i> , 2009)
	Antitumoral	(SANTOS-JUNIOR <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. lucens</i> Dwyer	Antimicrobiana	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008)
	Antileishmania	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008)

Continuação da Tabela 3

Espécie	Atividade Biológica	Referências
<i>C. martii</i> Hayne	Antimicrobiana	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008)
	Antileishmania	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008; SANTOS <i>et al.</i> , 2011)
<i>C. multijuga</i> Hayne	Antitumoral	(LIMA <i>et al.</i> , 2003; GOMES <i>et al.</i> , 2008)
	Cicatrizante	(WESTPHAL <i>et al.</i> , 2007)
	Antinociceptiva	(GOMES <i>et al.</i> , 2007; GOMES <i>et al.</i> , 2010)
	Antileishmanial	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008)
		(PACHECO <i>et al.</i> , 2006; SANTOS <i>et al.</i> , 2008;
	Antimicrobiana	DEUS <i>et al.</i> , 2009; MENDONÇA & ONOFRE, 2009; DEUS <i>et al.</i> , 2011)
	Antiinflamatória	(BRITO <i>et al.</i> , 2005; VEIGA-JUNIOR <i>et al.</i> , 2006; VEIGA-JUNIOR <i>et al.</i> , 2007; GOMES <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. officinalis</i> (Jacq.) L.	Antiinflamatória	(BAYLAC & RACINE, 2003)
	Inibição de elastase leucocitária humana	(BAYLAC & RACINE, 2004)
	Anti-isquemia	(ARAÚJO Jr. <i>et al.</i> , 2005)
	Antimicrobiana	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008; PIERI <i>et al.</i> , 2010; PIERI <i>et al.</i> , 2010; PIERI <i>et al.</i> , 2011; SANTOS <i>et al.</i> , 2012)
	Antileishmania	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008)
	Efeito Antitumoral (Walker 256 carcinoma)	(BRITO <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. paupera</i> (Herzog) Dwyer	Antimicrobiana	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008)
	Antileishmania	(KVIST <i>et al.</i> , 2006; SANTOS <i>et al.</i> , 2008)
<i>C. reticulata</i> Ducke	Cicatrização de feridas	(BRITO <i>et al.</i> , 1998; BRITO <i>et al.</i> , 1999)
		(SILVA <i>et al.</i> , 2003; SILVA <i>et al.</i> , 2007;
	Inseticida	FERNANDES <i>et al.</i> , 2007; SEO <i>et al.</i> , 2009)
	Antiinflamatória	(VEIGA-JUNIOR <i>et al.</i> , 2007)
	Antinociceptiva	(GOMES <i>et al.</i> , 2007)

Continuação da Tabela 3

Espécie	Atividade Biológica	Referências
<i>C. reticulata</i> Ducke	Antimicrobiana	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008; CORREIA <i>et al.</i> , 2008)
	Antileishmania	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008; SANTOS <i>et al.</i> , 2012)
	Toxicidade	(SACHETTI <i>et al.</i> , 2009)
	Ansiolítico	(CURIO <i>et al.</i> , 2009)
	Teratogenicidade e embriotoxicidade	(SACHETTI <i>et al.</i> , 2011)
<i>C. sp.</i> (óleo comercial)	Antiinflamatória	(BASILE <i>et al.</i> , 1988; VEIGA-JUNIOR <i>et al.</i> , 2001)
	Antimicrobiana	(PACHECO <i>et al.</i> , 2006)
	Inseticida	(RIBAS <i>et al.</i> , 2010; KANIS <i>et al.</i> , 2012; PROPHIRO <i>et al.</i> , 2012a;
		PROPHIRO <i>et al.</i> , 2012b)
	Perfusão da pele	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2010)

3.6. VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

O óleo-resina de copaíba apresenta uma grande variabilidade não somente em sua produção, mas também em sua composição química (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002). Algumas árvores praticamente não exsudam óleo ou o fazem em quantidade muito pequena para a coleta. A variação na produção de óleos-resina de copaíba já é conhecida e bastante relatada na literatura, embora ainda não se saiba os fatores que determinam a produção desse óleo. Segundo Alencar (1982), condições ambientais como a época de coleta, os locais de crescimento das árvores e suas características genéticas são responsáveis por parte da variação observada na produção desse óleo-resina. Langenheim (1990) alerta ainda sobre a influência da luminosidade e a diminuição de nitrogênio no solo, sobre a produção dos óleos-resina de copaíba. Diversos estudos tentaram relacionar a produção do óleo-resina de copaíba com fatores abióticos, como: a época de coleta, diâmetro à altura do peito (DAP) e o tipo de solo (ALENCAR, 1982; FERREIRA, 1999; FERREIRA & BRAZ, 2001; LEITE *et al.*, 2001;

PLOWDEN, 2001; PLOWDEN, 2003; MEDEIROS, 2006; MEDEIROS & VIEIRA, 2008), porém não há ainda nenhuma conclusão definitiva.

Alencar (1982) quando estudou a produção de óleo-resina de oitenta e duas árvores de *C. multijuga*, na Reserva Ducke no Amazonas, observou que a produção média por árvore, durante as cinco extrações realizadas, foi superior em árvores localizadas em solos argilosos. Resultados semelhantes foram obtidos por Medeiros (2006). Além disso, assim como Baima *et al* (1999) na região do Tapajós-Pará; como Plowden (2001), na Reserva Indígena no Alto Rio Guamá- Pará; e como Medeiros (2007) na Reserva Ducke-Amazonas, Alencar (1982) também observou que a produção era maior na época chuvosa, levantando a hipótese de que a disponibilidade de água seria um fator relevante para a produção de óleo-resina. Em contrapartida, Ferreira & Braz (2001), estudando a produção de sessenta e duas árvores de *C. sp*, na Floresta Estadual do Antimari-Acre, observou que as extrações realizadas no período seco produziram maiores quantidades de óleo-resina, principalmente de árvores localizadas em ambiente de terra firme. Esse resultado concorda com o obtido por Oliveira *et al* (2006), que observaram as maiores produções de óleo-resina de *C. duckei* (entre setembro e outubro de 2003) e *C. reticulata* (entre setembro e novembro de 2003) no período de menor precipitação pluviométrica.

Quanto ao DAP, alguns autores não consideram esse fator como determinante na produção de óleo-resina (FERREIRA & BRAZ, 2001; LISBOA *et al.*, 2002; RIGAMONTE-AZEVEDO, 2004; RIGAMONTE-AZEVEDO *et al.*, 2006; BARBOSA, 2007; BARBOSA *et al.*, 2009; MEDEIROS, 2006; MEDEIROS & VIEIRA, 2008). Embora, os resultados encontrados por Alencar (1982) e Plowden (2001) sugerirem que a produção do óleo aumente com o DAP até um ponto máximo e que árvores com diâmetros entre 45 e 65 cm apresentam maior produção média que árvores com diâmetro menor ou maior que esse limite.

O estudo mais recente sobre a produção de óleos-resina de copaíba foi realizada na Reserva Extrativista do Médio Juruá, no Amazonas. Na área de estudo foram amostradas quatro espécies de copaíba: *C. guianensis*, *C. multijuga*, *C. paupera* e *C. piresii*. De todas as espécies estudadas a *C. multijuga* apresentou maior potencial para a produção e recuperação de óleo-resina, quando comparado com as outras espécies em estudo. Além disso, a única espécie encontrada em dois diferentes tipos de floresta na área de estudo, a *C. guianensis*, apresentou maior produção na área de floresta de várzea do que em floresta de terra firme, indicando que a produção de óleo-resina possa ser afetada pelo tipo de floresta e hidrologia, uma vez que ambos os fatores estão ligados intrinsecamente à fertilidade do solo. Ainda segundo o autor, o DAP não apresentou influência com significância estatística para a produção desses óleos-resina (NEWTON *et al.*, 2011).

Resultados obtidos por Medeiros (2006) alertam ainda para outro possível fator de influência sobre a produção de óleos-resina de copaíba, o ataque de cupins. Segundo ela, a grande maioria das árvores produtoras de óleo-resina estavam infestadas por cupins. Além disso, a classe de maior DAP apresentou maior percentual de árvores infestadas, indicando que árvores muito grandes tem maior predisposição ao ataque. E a correlação positiva da produção com o ataque de cupins, indica que esta produção pode estar funcionando como um mecanismo de defesa da planta contra estes agentes.

O óleo-resina de copaíba também apresenta uma grande variação em sua composição química, tendo sido identificados mais de cem sesquiterpenos e quarenta diterpenos. Técnicas antigas, bem como técnicas mais modernas de isolamento e identificação, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia com fluido super-crítico com detector de infravermelho (SFC-FT-IR) e a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa com colunas cromatográficas de fase estacionária quiral (β -ciclodextrina permetilada) têm permitido o conhecimento da composição química desses

óleos-resina (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002). Essa composição já se encontra descrita em diversos artigos, mas apesar da extensa literatura sobre os óleos-resina de copaíba e sua produção, somente dezessete espécies de *Copaifera* têm a composição química de seus óleos-resina descrita na literatura (GRAMOSA *et al.*, 2010).

Não só os óleos exsudados do tronco das copaibeiras foram estudados quimicamente. Langenheim (1990) realizou estudos buscando relacionar os padrões de variação da composição dos sesquiterpenos dos óleos de *C. multijuga*, *C. langsdorffii*, *C. officinalis* e *C. publiflora* e a encontrada na resina extraída de suas folhas, obtidas por técnica de arraste a vapor. São relatadas ainda as composições químicas dos óleos essenciais das folhas de *C. trapezifolia* (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2006); dos extratos de folhas, caules, raízes (CHEN *et al.*, 2009) e sementes de *C. officinalis* (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2007; LAFONT *et al.*, 2011).

As variações na fração sesquiterpênica desses óleos são muito grandes, ocorrendo sazonalmente, numa espécie ou entre espécies (LANGENHEIM, 1990). Dentro de uma determinada espécie podem ocorrer variações qualitativas e quantitativas em diferentes níveis e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001; GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Alguns autores atribuem a variabilidade desses constituintes à mistura de óleos de diferentes espécies botânicas, ou ainda, de espécimes de idades e locais diferentes; má identificação das espécies; ou ainda, no caso dos óleos comerciais, a problemas de falsificações/adulterações pela mistura a outros tipos de óleos de menor valor agregado (VEIGA-JUNIOR, 1997; VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002). Variações diurnas (WANG & LANGENHEIM, 1990), sazonais (ALENCAR, 1982; MACEDO & LANGENHEIM, 1989;

MACEDO & LANGENHEIM, 1989; RIGAMONTE-AZEVEDO, 2004; BIAVATTI *et al.*, 2006; MEDEIROS, 2006; BARBOSA, 2007; ZOGHBI *et al.*, 2007; LAMEIRA *et al.*, 2009), de DAP (ALENCAR, 1982; PLOWDEN, 2001; RIGAMONTE-AZEVEDO, 2004; MEDEIROS, 2006; BARBOSA, 2007) e do tipo do solo (ALENCAR, 1982; NASCIMENTO & LANGENHEIM, 1986; PLOWDEN, 2001; RIGAMONTE-AZEVEDO, 2004; MEDEIROS, 2006; BARBOSA, 2007; HERRERO-JÁUREGUI *et al.*, 2011) já foram extensamente relatadas. Embora essa variação pareça ser mais sensível a fatores bióticos, tais como injúrias provocadas por insetos e fungos (LANGENHEIM *et al.*, 1986; MACEDO & LANGENHEIM, 1989; LANGENHEIM, 2003), luminosidade e nutrientes (LANGENHEIM, 1990), também têm sido descritos como possíveis fatores de influência sobre essa variação na composição química. Inclusive, alguns estudos já têm relacionado à síntese de compostos secundários como consequência de ataques fúngicos e herbivoria de insetos (LITVAK & MONSON, 1998; PHILLIPS & CROTEAU, 1999; LANGENHEIM, 2003).

Normalmente, as publicações não discriminam a espécie de *Copaifera* que está sendo estudada, algumas vezes nem fazem referência à identificação botânica; a falta de definição sobre o local e a época da coleta do óleo-resina, ou ainda relatos de espécies que não são endêmicas da região de estudo, dificultam a padronização da composição química desses óleos, comprometendo seu controle de qualidade e consequentemente a qualidade do produto a que darão origem. Além disso, a maioria dos estudos realizados têm se restringido a caracterizar quimicamente o óleo-resina e poucos estudos tem se preocupado em estudar as causas da variação na composição química desse óleo.

Como produto florestal primário, a exploração do óleo de copaíba apresenta algumas características originárias de seu manejo que vão definir, em ultima instância, as possibilidades de aplicações industriais e, portanto, estabelecer o seu padrão de qualidade para o mercado. A principal delas refere-se à eventual mistura de óleos de espécies botânicas

variadas, ou ainda de espécimes de idades e locais distintos. Este fato é sobremaneira agravado pela dificuldade de se proceder a diferenciação morfológica entre as espécies, e mesmo pela dificuldade prática em se obter os órgãos florais das espécies, dado o curto período em que ocorrem e à altura das árvores (CASCON & GILBERT, 2000; VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002).

Nas últimas décadas, o aumento da exploração deste óleo pela indústria de cosméticos, perfumes e fitoterápicos tem impulsionado o seu comércio. Porém, seu uso crescente por grande faixa da população brasileira não vem sendo acompanhado do controle de qualidade dessas matérias-primas vegetais, e muitas vezes sua autenticidade é duvidosa. Os problemas de má identificação das espécies, de falsificação e falta de padronização do óleo, tem dificultado seu emprego comercial, gerando um grande entrave econômico (CLAY *et al.*, 2000).

3.7. PADRONIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Apesar de ser amplamente comercializado, o óleo de copaíba não possui nenhuma metodologia própria de controle de qualidade que ateste sua pureza e sua ação farmacológica preconizada (VEIGA-JUNIOR, 1997). A falta de parâmetros efetivos para caracterizar e consequentemente realizar o controle de qualidade do óleo de copaíba, aliada à variabilidade natural inerente a esta matéria-prima e à crescente demanda do mercado, podem comprometer a autenticidade e a efetividade dos produtos contendo este óleo, além de gerar um grande entrave econômico para a região (BIAVATTI *et al.*, 2006).

Segundo Cascon & Gilbert (2000), é necessário conhecer a variabilidade da composição química inter e intra-específica das espécies de *Copaifera* para só depois, utilizar o óleo-resina como matéria prima para medicamentos e cosméticos. Segundo Langenheim

(2003), a variação na composição química do óleo-resina de *Copaifera* pode influenciar a ação farmacológica e a toxidez dos produtos que o utilizam em suas composições, podendo comprometer o controle de qualidade. Um produto para o mercado de fitomedicamentos, com base no óleo de copaíba, portanto, deve garantir a reprodutibilidade da eficácia dentro do lote utilizado industrialmente.

Como atualmente a indústria não pode prescindir de matéria-prima devidamente qualificada para sua utilização como insumo nos produtos comercializados, é fundamental o estabelecimento de técnicas que permitam um rigoroso controle da qualidade. É importante proceder à normatização química para os produtos farmacêuticos formulados com óleo de copaíba, sempre na tentativa de relacionar as diversas atividades farmacológicas do óleo de copaíba com sua constituição química (TAPPIN *et al.*, 2004). Já existe, por exemplo, evidência da correlação entre a atividade antiinflamatória com os óleos que apresentam maiores teores de ácidos diterpênicos (FERNANDES *et al.*, 1992). Analogamente, as frações ricas em hidrocarbonetos sesquiterpênicos também são reputadas como importantes no efeito antiinflamatório, no entanto com prováveis efeitos sinérgicos (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2001).

Alguns trabalhos analíticos têm sido realizados buscando técnicas para o controle de qualidade e a padronização de óleos de copaíba, apesar de suas variações naturais. Vasconcelos & Godinho (2002), propuseram um método titulométrico simples para padronização do óleo de copaíba. Esta técnica baseia-se na determinação dos índices de acidez e de éster por titulação. No entanto, a cromatografia em fase gasosa é a técnica mais empregada. As metodologias utilizadas atualmente ignoram que um óleo-resina tem características próprias que são bastante diferentes de óleos fixos e óleos essenciais.

Veiga-Junior *et al* (1997) desenvolveram uma metodologia que usava a cromatografia em fase gasosa como ferramenta básica de análise para o controle de qualidade dos óleos de copaíba. O grande número de diterpenos encontrados e a presença de ácidos carboxílicos

lineares (C₁₄ a C₁₈) nos óleos comerciais analisados levaram os autores a concluir que esses resultados se deviam possivelmente à mistura de diferentes óleos de copaíba autênticos e a adulteração por óleo de soja.

Biavatti *et al* (2006) investigaram diferentes metodologias de preparação das amostras para a análise por cromatografia em fase gasosa, como: fracionamento com sílica gel impregnada com hidróxido de sódio (KOH), metilação direta com diazometano e por meio de transesterificação com hidróxido de sódio em metanol (KOH/MeOH). Como resultado, alguns compostos como o ácido hardwíckiico e o cariofilenol, detectados na análise das amostras metiladas por diazometano, não foram detectados na análise das amostras metiladas por KOH/MeOH. Sugerindo que a metodologia de transesterificação com KOH/MeOH apesar de ser rápida e de baixo custo, não é eficiente para os ácidos diterpênicos como a metilação por diazometano do ponto de vista reacional, ou que a etapa de extração na transesterificação leva a perda de substâncias. Comparativamente, testaram ainda a metodologia proposta por Vasconcelos & Godinho (2002) com óleos autênticos e comerciais, e concluíram que o método acessível do ponto de vista econômico, conduz a resultados equívocos contradizendo a conclusão dos autores, que o julgaram eficiente.

Tappin *et al* (2004) também estabeleceram um método para a padronização química quantitativa do óleo de copaíba, por intermédio 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. Enquanto Cascon & Gilbert (2000) propuseram padronização quantitativa e qualitativa por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM).

Pelo fato de esses óleos serem amplamente utilizados com fins medicinais e cosméticos, a padronização dos óleos de *Copaifera* tem extrema importância, já que é através desta informação que conseguimos avaliar a sua verdadeira qualidade. Deve-se enxergar a

padronização como uma ferramenta que trará benefícios de custo, melhor utilização e principalmente definição da qualidade destes óleos. Com a padronização dos óleos, toda a cadeia produtiva se beneficiará, desde as comunidades carentes que se sustentam através deste extrativismo vegetal até as empresas que irão comercializar estes óleos, já que o valor agregado desta matéria prima aumentará. Além disso, os óleos terão maior aceitação mundial, pois os mais diversificados testes poderão ser reproduzidos. Com isso, a comercialização destes óleos torna-se uma realidade, gerando um impacto positivo na economia, através da criação de muitos empregos diretos e indiretos para o estado, além de um grande avanço científico.

3.8. CROMATOGRAFIA

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a interações, entre duas fases imiscíveis: a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (DEGANI *et al.*, 1998).

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separadas utilizando-se a técnica denominada “cromatografia em fase gasosa”. A separação baseia-se na diferente distribuição de substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa). A amostra, por meio de um sistema de injeção, é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas convenientes no local de injeção da amostra e na coluna possibilita a vaporização dessas substâncias que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos determinados e chegam à saída

da coluna em tempos diferentes. O uso de um detector adequado na saída da coluna torna possível a quantificação dessas substâncias (BONATO, 2006).

A cromatografia em fase gasosa é uma técnica com um poder de resolução excelente, tornando possível, muitas vezes, a análise de milhares de substâncias de uma mesma amostra. O uso bastante acentuado de cromatografia em fase gasosa se deve também aos baixos limites de detecção que podem ser conseguidos. Essa característica faz com que haja necessidade de pequenas quantidades de amostras, o que, em certos casos, é um fator crítico e que limita a utilização de outras técnicas (LANÇAS, 1993; DEGANI *et al.*, 1998).

Por outro lado, a cromatografia em fase gasosa apresenta certos inconvenientes. Essa técnica pode ser empregada na análise de substâncias voláteis e termicamente estáveis; caso contrário, há necessidade de se formar um derivado com essas características, o que nem sempre é viável. A análise cromatográfica isoladamente é rápida, podendo ser efetuada em minutos. No entanto, na maioria das vezes há necessidade de etapas de preparação da amostra, antes que ela possa ser analisada, para que não haja interferências durante a análise e contaminação da coluna cromatográfica. Às vezes a etapa de preparação da amostra é longa e complexa, aumentando muito o tempo e o custo da análise (BONATO, 2006).

É importante salientar ainda que a cromatografia em fase gasosa é excelente como técnica quantitativa, mas não é uma técnica qualitativa eficiente, necessitando, muitas vezes, de técnicas auxiliares para a identificação segura das substâncias presentes na amostra.

3.8.1. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA (CG-DIC)

O detector de ionização em chama (DIC) é bastante popular em aplicações de cromatografia em fase gasosa devido aos seus níveis de detectabilidade e resposta quase

universal. Neste tipo de detector, o efluente da coluna é dirigido para uma pequena chama de ar/hidrogênio, o gás de arraste chega ao detector e uma chama produzida pela combustão do ar e hidrogênio, presentes no detector, queima e ioniza algumas das moléculas presentes, gerando uma corrente da ordem de 10^{-14} A. Quando moléculas da amostra presente no gás de arraste chegam ao detector, elas são queimadas na chama, ocorrendo a formação de íons, que são coletados por um eletrodo (BONATO, 2006). Portanto, a detecção envolve o monitoramento da corrente produzida pela coleta desses portadores de carga. A maioria dos compostos orgânicos produz íons e elétrons quando pirolizados à temperatura de uma chama ar/hidrogênio (SKOOG *et al.*, 2005).

A ionização de compostos de carbono na chama é um processo ainda pouco compreendido, embora tenha sido observado que o número de íons produzidos é grosseiramente proporcional ao número de átomos de carbono *reduzidos* na chama. Uma vez que o detector de ionização em chama responde ao número de átomos de carbono que entram no detector por unidade de tempo, ele é um dispositivo *sensível à massa* em vez da concentração. Em consequência, esse detector apresenta a vantagem de que a alteração da vazão da fase móvel exerce um efeito pequeno sobre a sua resposta (SKOOG *et al.*, 2005; BONATO, 2006).

Grupos funcionais como carbonila, álcool, halogênicos e amínicos produzem poucos ou nenhum íon na chama. Além disso, o detector é insensível para gases não combustíveis como H_2O , CO_2 , SO_2 e NO_x . Essas propriedades tornam o detector de ionização em chama muito mais útil para a análise de amostras orgânicas, incluindo aquelas contaminadas com óxidos de nitrogênio e enxofre. O detector de ionização exibe uma sensibilidade alta ($\sim 10^{-13}$ g s^{-1}), larga faixa linear de resposta ($\sim 10^7$) e baixo ruído. Geralmente é robusto e fácil de se usar. Uma desvantagem do detector de ionização em chama é que ele destrói a amostra durante a etapa de combustão (DEGANI *et al.*, 1998; SKOOG *et al.*, 2005).

3.8.2. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM)

Um dos detectores mais poderosos para a cromatografia em fase gasosa é o espectrômetro de massas. A combinação da cromatografia a gás e a espectrometria de massas é conhecida como CG-EM. Um espectrômetro de massas mede a razão massa/carga (m/z) de íons que são produzidos pela amostra. A maioria dos íons produzidos apresenta uma carga unitária ($z = 1$), de forma que a maioria dos espectrometris de massas refere-se à medida de massa dos íons quando, na verdade, a razão massa/carga é que é medida (SKOOG *et al.*, 2005).

As moléculas da amostra entram no espectrômetro de massas pelo sistema de entrada. No caso de um CG, a amostra está na forma de vapor e a entrada deve ser interfaceada entre a pressão atmosférica do sistema de CG e a baixa pressão (10^{-5} a 10^{-8}) do sistema do espectrômetro de massas por meio de um sistema complexo de vácuo, necessário para manter a pressão baixa. No espectrômetro de massas, as moléculas da amostra entram em uma fonte de ionização que ioniza a amostra. As fontes de ionização para a espectrometria de massas moleculares são energéticas o suficiente para quebrar as ligações químicas das moléculas da amostra, mas não suficientemente energéticas para decompor as moléculas da amostra em seus átomos constituintes (DEGANI *et al.*, 1998; BONATO, 2006).

As fontes de ionização em CG-EM produzem fragmentos, os quais podem também ser ionizados. Portanto, os íons das moléculas da amostra, denominados íons moleculares, íons de fragmentos e moléculas não-ionizadas, saem da fonte de ionização. As moléculas não-carregadas e os fragmentos são normalmente extraídos da fonte de íons através de bombas de vácuo empregadas para produzir o ambiente de baixa pressão. A próxima seção do espectrômetro de massas é o estágio analisador. O analisador serve para selecionar os íons de

acordo com seus valores m/z . Os íons separados são então detectados e um gráfico contendo a intensidade do sinal gerado pelo íon *versus* m/z é produzido pelo sistema de dados (SKOOG *et al.*, 2005).

3.8.3. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE (CG x CG)

O objetivo de novas tecnologias para cromatografia em fase gasosa é viabilizar a separação, identificação e quantificação rápidas do menor número de constituintes em misturas complexas, usando equipamentos simples e robustos (DESTY, 1965). A cromatografia gasosa bidimensional abrangente é uma dessas novas tecnologias, sendo caracterizada pela utilização sequencial de duas colunas cromatográficas, uma convencional e a outra curta (do tipo de coluna usada para “*fast-GC*”), de forma que todo o efluente da primeira coluna, ou uma parte representativa do mesmo, e seja conduzido para a segunda através de um modulador (MARRIOTT & SHELLIE, 2002). O sistema de modulação entre as duas colunas causa uma compressão da banda cromatográfica que elui da primeira coluna, e esta banda é direcionada para a coluna curta, de forma que a separação na segunda coluna é extremamente rápida. Os períodos de modulação devem ser ajustados a fim de que sejam compatíveis com o tempo de separação na segunda coluna, minimizando o alargamento da banda comprimida. Desta forma, a sensibilidade é significativamente incrementada (relação sinal/ruído aproximadamente 10 vezes maior) e a resolução aumenta de forma expressiva, se comparada à cromatografia gasosa monodimensional. A combinação de duas colunas cromatográficas com mecanismos de separação ortogonais entre si leva a um significativo aumento de seletividade. Tais características tornam esta técnica extremamente útil para análise de amostras complexas, ou amostras que apresentem outras características que limitam

sua caracterização por cromatografia monodimensional, como no caso das separações enantioméricas (DALLÜGE *et al.*, 2003; MARRIOTT & SHELLIE, 2002).

Assim, a grande vantagem da cromatografia bidimensional frente à cromatografia monodimensional é a capacidade de separação de um grande número de compostos, até mesmo em amostras complexas, como óleos-resina de copaíba.

3.9. DERIVATIZAÇÃO

Quando as substâncias a serem analisadas por cromatografia em fase gasosa não são voláteis e termicamente estáveis, particularmente no caso de substâncias de alta massa molecular e/ou contendo grupos funcionais fortemente polares, há necessidade de derivatização. Essa consiste em transformar substâncias de interesse em um derivado com características adequadas para ser analisada por cromatografia em fase gasosa, reduzindo a adsorção de solutos no suporte e superfície da coluna e melhorar a separação dos compostos. A derivação também pode ser usada para a introdução de grupos específicos, no sentido de aumentar a detectabilidade da substância. A modificação de hidroxilas e carboxilas é uma das reações de derivatizações mais comuns, visando aumentar a volatilidade e diminuir a polaridade e com ela, a adsorção melhorando a resolução (BONATO, 2006).

O desenvolvimento de diferentes métodos utilizando catalisadores ácidos ou básicos para a reação de esterificação possibilita escolher aquele que melhor se enquadra ao tipo de amostra em que se deseja trabalhar, como também aos recursos disponíveis de cada laboratório. Para isso tornam-se necessário conhecer a respeito dos tipos de catalisadores, as reações, o tempo envolvido e as possíveis perdas para propiciar uma avaliação coerente dos resultados obtidos (MILINSK, 2007).

Entre os métodos de derivação, os reagentes mais conhecidos são o trimetilsilil (TMS) e o diazometano. A reação com trimetilsilil (TMS) é a mais usada, pois é praticamente universal, reagindo com todos os prótons ativos, responsáveis por dar caráter polar aos grupos funcionais. Enquanto o diazometano, um gás amarelado extremamente tóxico e altamente explosivo, é um reagente muito útil na metilação de ácidos carboxílicos e ácidos fosfônicos, permitindo obter ésteres metílicos (BONATO, 2006; MILINSK, 2007).

Os reagentes mais comumente utilizados na esterificação via catálise básica são hidróxido de sódio (NaOH) ou potássio (KOH) em metanol e metóxido de sódio (NaOCH₃) em metanol (CETINKAYA & KARAOSMANOGLU, 2004). Os métodos de transesterificação empregando estes reagentes são rápidos e podem ser realizados a temperatura ambiente, em um intervalo curto de tempo (MILINSK *et al.*, 2008).

Dentro dos métodos envolvendo catálise ácida, os reagentes mais empregados são trifluoreto de boro em metanol (BF₃/MeOH), ácido sulfúrico em metanol (H₂SO₄/MeOH) e ácido clorídrico em metanol (HCl/MeOH). Na literatura existe uma variedade de metodologias envolvendo estes reagentes, em procedimentos utilizando uma única etapa, como também procedimentos em duas etapas (descritos como etapa de saponificação, seguido de esterificação) e o uso de aquecimento. Embora amplamente utilizado, o BF₃ em metanol é extremamente tóxico (MEHER *et al.*, 2006).

Para a análise de óleos de copaíba por técnicas de cromatografia em fase gasosa uma etapa preliminar de derivatização é essencial: a esterificação dos ácidos terpênicos. Tendo em vista a diversidade de técnicas de obtenção de ésteres de ácidos terpênicos, que podem ocasionar uma variação na composição sesquiterpênica dos óleos de copaíba.

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A quimiometria é a ciência relacionada a medidas realizadas em um sistema ou processo químico, obtendo informações sobre o estado do sistema através da aplicação de métodos matemáticos ou estatísticos. Os métodos estatísticos multivariados consideram as amostras e as variáveis em seu conjunto, permitindo extrair informações complementares que a análise univariada não consegue evidenciar. Um dos objetivos na utilização da análise multivariada é reduzir a representação dimensional dos dados, organizando-os em uma estrutura que facilita a visualização de todo o conjunto de dados (MOITA NETO & MOITA, 1998).

No contexto da aplicação em problemas químicos estes métodos estatísticos são denominados métodos quimiométricos. A importância da quimiometria para os laboratórios modernos de química cresceu com a capacidade dos instrumentos analíticos de produzirem conjuntos de dados cada vez maiores e mais complexos e com a evolução dos computadores que permitem tratá-los agilmente (CORREIA & FERREIRA, 2007). Assim, aplicações de PCA em problemas de química são cada vez mais comuns e podem ser encontradas facilmente na literatura.

As técnicas de análise multivariada mais conhecidas são as análises de agrupamento hierárquico (HCA) e a análise de componentes principais (PCA). A PCA e a HCA são metodologias exploratórias que visam evidenciar similaridades ou diferenças entre amostras em um determinado conjunto de dados. Desse modo, tornam-se perfeitamente aplicáveis em experimentos com um grande número de variáveis (TEÓFILO & FERREIRA, 2006; FERREIRA *et al.*, 1999).

A análise de componentes principais (PCA) encontra-se certamente entre as mais importantes ferramentas da análise multivariada, inclusive por constituir a base onde se

fundamentam a maioria dos outros métodos multivariados de análise de dados. Como uma ferramenta de análise exploratória a PCA permite revelar a existência ou não de amostras anômalas, de relações entre as variáveis medidas e de relações ou agrupamentos entre amostras, separando a informação importante da redundante e aleatória. A PCA projeta dados n -dimensionais em um espaço de menor dimensão, ou seja, as informações contidas no espaço de dimensão n são comprimidas por combinações lineares das variáveis originais a um espaço geralmente de ordem 2 ou 3. A PCA é um método exploratório porque auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados (LYRA *et al.*, 2010).

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) é um processo hierárquico no qual, em cada passo a matriz de dados é diminuída em uma dimensão, pela reunião de pares semelhantes, até a reunião de todos os pontos em um único grupo. O objetivo da HCA é exibir os dados em um espaço bidimensional de maneira a enfatizar os seus agrupamentos e padrões naturais. A distância entre os pontos (amostras ou variáveis) reflete a similaridade de suas propriedades, sendo útil para determinar a semelhança entre amostras. O método relaciona as amostras de forma que as mais semelhantes são agrupadas entre si. Os resultados são apresentados na forma de um dendrograma que agrupa amostras ou variáveis em função da similaridade.



4. Metodologia

4. METODOLOGIA

4.1. COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne foram coletadas por Raquel da Silva Medeiros, entre novembro de 2004 e novembro de 2005, na Reserva Florestal Ducke, Manaus-AM, em época seca e chuvosa, usando como critérios de seleção:

- Árvores com diâmetro à altura do peito (DAP) $\geq$ que 30 cm. Segundo a literatura esta medida de diâmetro é ideal para a extração do óleo-resina (ALENCAR, 1982; LEITE *et al.*, 2001);
- Árvores intactas, ou seja, sem perfurações anteriores para extração do óleo-resina (árvores ocas foram descartadas);
- Durante a coleta foram observadas a existência ou não de injúrias mecânicas na casca da árvore, o tipo de solo onde as árvores se encontravam e se havia infestação por cupins.

4.2. EXTRAÇÃO DO ÓLEO-RESINA

O método de extração do óleo-resina adotado foi o mesmo descrito por Alencar (1982), com trado metálico, porém, seguindo as recomendações de Leite *et al* (2001).

No processo de extração do óleo-resina foram utilizados: trado metálico de $\frac{3}{4}$ de polegada, cano de PVC de $\frac{1}{2}$ polegada com 20 cm de comprimento, feito rosca nas duas extremidades do cano, tampa de PVC de $\frac{1}{2}$ polegada e fita veda rosca.

Com o trado metálico foi feita uma perfuração no fuste da árvore a uma altura de aproximadamente 1m do solo. Ao atingir o centro do fuste, o trado foi retirado e o óleo-resina

contido na árvore foi coletado. Após o cessar do escoamento do óleo-resina foi introduzido o cano de PVC hermeticamente fechado com tampa de PVC, fechando assim o orifício aberto no fuste da árvore. O torno foi cortado rente ao fuste, impedindo a entrada de agentes causadores de doenças. As amostras de óleo-resina foram coletadas em recipientes plásticos e envolvidas por papel alumínio para evitar a oxidação causada pela luz. O volume de óleo-resina foi quantificado em laboratório, com auxílio de proveta graduada e armazenados em frascos âmbar.

4.3. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Os óleos foram esterificados com solução de diazometano em éter, diluídos em diclorometano e as soluções obtidas foram submetidas à análise por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) para a análise quantitativa e determinação dos índices de retenção, e por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrômetro de massas (CG-EM), para a obtenção dos espectros de massas.

4.3.1. DERIVATIZAÇÃO DAS AMOSTRAS COM DIAZOMETANO EM ÉTER ETILÍCO

Para o preparo do diazometano, foram dissolvidas 2,5 g de sal de Diazald (N-metil-N-nitroso-4-toluenosulfonamida) em 30 mL de éter etílico, no balão reacional. A esta mistura foi adicionada uma solução de 400 g de KOH dissolvidos em 10 mL de etanol. Após 5 minutos, a solução etérica de diazometano foi destilada e coletada em éter etílico. As amostras a serem derivatizadas foram dissolvidas em éter etílico. A solução de diazometano foi adicionada às amostras até que não fosse mais observada a evolução de N_2 (VEIGA-JUNIOR, 1997).

4.3.2. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA (CG-DIC)

Os óleos foram analisados em cromatógrafo em fase gasosa modelo CP 3800 da Varian[®] com detector por ionização de chama (DIC), 120 V. As análises foram realizadas com coluna Chrompack CP-Sil 5 CB (100% dimetilpolissiloxano), com medidas de 15,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm, sendo utilizado como gás de arrastes de hélio (He) em fluxo de 2,0 mL/min. A injeção em modo split 1:10 foi realizada com injetor a 270 °C. A temperatura do detector foi de 300 °C e o forno foi programado de 120 °C a 150 °C a 3 °C/min, 150 °C a 280 °C a 8 °C/min, seguido de isoterma de 280 °C por 5 min, com tempo de corrida de 31, 25 minutos. Foram co-injetados padrões de hidrocarbonetos lineares (C₉–C₂₂) e de β-cariofileno (pureza ≥ 98,5% - Sigma-Aldrich).

4.3.3. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

Após a análise por CG-DIC, os óleos foram analisados em cromatógrafo em fase gasosa modelo QP-2010 da Shimadzu[®] com detector por espectrometria de massas (CG-EM). As análises foram realizadas com coluna VF-1MS da Varian[®], com medidas de 15,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm. As condições da análise foram às mesmas utilizadas por CG-DIC. Para a detecção foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70 eV.

4.3.4. IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES

A determinação da composição química dos óleos de copaíba foi realizada através dos dados de índice de retenção, obtidos por CG-DIC, e dos espectros de massas, obtidos por CG-EM. Os índices de retenção foram calculados utilizando a Equação de van der Dool-Kratz, relacionando os tempos de retenção das substâncias presentes nos óleos de copaíba com os tempos de retenção de hidrocarbonetos lineares (série homóloga de C₉-C₂₂) que foram co-injetados com a amostra. Os índices de retenção e os espectros de massas foram comparados com os dados da espectroteca Wiley 7.0 fornecida pela Shimadzu[®], da literatura (ADAMS, 2007) e de padrões de diterpenos isolados anteriormente.

4.3.5. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE (CGxCG)

As análises por CGxCG foram realizadas em um sistema CG × CG-EMTdV Pegasus 4D (Leco, St. Joseph, MI, EUA), composto de um cromatógrafo a gás Agilent 6890 GC (Palo Alto, CA, EUA) equipado com um forno secundário e um modulador de 2 estágios com 2 jatos cada, ou seja, 2 jatos quentes e 2 frios e um espectrômetro de massas por tempo de voo (TOF) Pegasus III (Leco, St. Joseph, MI, EUA). A aquisição e o processamento dos dados foram realizados com o software ChromaTOF versão 4.0 (LECO Corp., St. Josephs, MI). O conjunto de colunas capilares para as análises consiste de uma coluna DB-5 ms (Agilent, Palo Alto, CA, EUA), 5%-fenil-95%-metilsiloxano (30 m x 0,25 mm x 25 µm) na primeira dimensão (¹D) e uma BPX-50 (SGE, Ringwood, VIC, Austrália), 50%-fenil-50%-metilsiloxano (1,3 m x 0,1 mm x 0,1 µm) na segunda dimensão (²D). A segunda coluna é conectada ao detector por meio de um capilar vazio (0,5 m x 0,25 mm). As colunas e o capilar

vazio são conectados por mini-uniões (SGE Ringwood, VIC, Austrália, P/N 073550) utilizando anilhas de SilTite (SGE Ringwood, VIC, Austrália, P/N 073550/P/N 073470).

As condições de programação do CG para a 1D : injeção de 1 μ L em 280°C com divisão de fluxo 1:50. O fluxo de hélio (gás de arraste) é de 1,0 mL/min. A programação de temperatura para o forno primário com a coluna 1D foi de 40 °C por 1 min, com rampa de 30 °C/min até 140 °C, depois com 2 °C/min até 220 °C. A programação de temperatura para 2D foi de 20 °C acima da programação do primeiro forno, embora a temperatura máxima atingida tenha sido de 240 °C. O tempo de modulação foi de 5 seg, com 1,5 s de jato quente. A temperatura do modulador foi mantida a 40 °C acima da programação da primeira coluna. A linha de transferência foi mantida em 280 °C. O EMTdV foi operado no modo impacto de elétrons (70 eV) e foram coletadas a razão massa/carga (m/z) 55-550. A temperatura da fonte iônica foi de 230 °C, o detector foi operado a 1550 V e a taxa de aquisição foi de 100 espectros/s.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram auto-escalados como forma de pré-processamento antes de serem submetidos aos métodos de análise estatística multivariada, HCA (Análise de Agrupamentos Hierárquicos) e PCA (Análise de Componentes Principais). O método utilizado na HCA foi o método Ward e como métrica a Distância Euclidiana. Para ambas as análises foi utilizado o software livre R. 2.14.0[®].

4.5. ESTERIFICAÇÃO

Para a comparação da eficiência e aplicabilidade dos diferentes métodos de obtenção dos ésteres terpênicos presentes nos óleos de copaíba, foram selecionados três óleos (M09-C1, M13-C1 e M43-C1) com diferentes perfis cromatográficos e cinco metodologias: sendo três metodologias empregando trifluoreto de boro em metanol (BF_3/MeOH), uma empregando ácido sulfúrico em metanol ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$) e uma empregando ácido clorídrico em metanol (HCl/MeOH). As esterificações foram realizadas em triplicata.

4.5.1. MÉTODOS DE ESTERIFICAÇÃO DE CATÁLISE ÁCIDA EMPREGANDO TRIFLUORETO DE BORO EM METANOL

4.5.1.1. MÉTODO DESCRITO POR METCALFE *et al.*, 1966 (MET)

Foram pesadas aproximadamente 150 mg de óleo-resina e adicionados 4,0 mL de solução de NaOH 0,50 mol/L em metanol. A mistura foi aquecida em banho de água a 100 °C durante 5 minutos. Foram adicionados à mistura 5,0 mL de solução metanólica de BF_3 (12%), que foi aquecida por mais 2 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 5,0 mL de solução de cloreto de sódio saturada. A mistura foi transferida para um funil de separação juntamente com 20,0 mL de hexano. Agitou-se o funil vigorosamente por 1 minuto, que em seguida foi deixado em repouso para a separação das fases. A fase aquosa foi então descartada e a fase etérea foi filtrada em papel filtro e transferida para um balão, onde o solvente foi evaporado em banho de água a 60 °C.

4.5.1.2. MÉTODO DESCRITO POR BANNON *et al.*, 1982 (BAN)

Foram pesadas aproximadamente 150 mg de óleo-resina e adicionados 5,0 mL de solução de KOH 0,50 mol/L em metanol. A mistura foi aquecida sob refluxo por 3 minutos. Foram adicionados à mistura 5,0 mL de solução metanólica de BF₃ (14%), e a mistura foi aquecida novamente sob refluxo por mais 3 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 3,0 mL de hexano e 15,0 mL de solução de cloreto de sódio saturada. A mistura foi agitada vigorosamente por 15 segundos e após a separação das fases, foram coletados aproximadamente 2,5 µL da fase superior que foram posteriormente injetados no cromatógrafo a gás.

4.5.1.3. MÉTODO DESCRITO POR JOSEPH & ACKMAN, 1992 (JAC)

Foram pesadas aproximadamente 25 mg de óleo-resina e adicionados 1,5 mL de solução de NaOH 0,50 mol/L em metanol. A mistura foi aquecida em banho de água a 100 °C por 5 minutos e em seguida resfriada a temperatura ambiente. Foram adicionados à mistura 2,0 mL de solução metanólica de BF₃ (12%), que foi aquecida novamente em banho de água a 100 °C por mais 30 minutos. O tubo de ensaio foi resfriado em fluxo de água corrente à temperatura ambiente. Foram adicionados 1 mL de hexano e o tubo de ensaio foi agitado vigorosamente por 30 segundos. Em seguida foram adicionados 5,0 mL de solução de cloreto de sódio saturada. A amostra esterificada foi levada à geladeira e deixada em repouso para melhor separação das fases. A fase superior foi coletada. E foi adicionado mais 1,0 mL de hexano ao tubo, que foi novamente agitado, para nova separação de fases. A nova fase

sobrenadante foi coletada e adicionada à fração coletada anteriormente. Depois de concentrada em rota-evaporador, a amostra foi posteriormente injetada no cromatógrafo a gás.

4.5.2. MÉTODO DE ESTERIFICAÇÃO DE CATÁLISE ÁCIDA EMPREGANDO ÁCIDO SULFÚRICO EM METANOL

4.5.2.1. MÉTODO DESCRITO POR HARTMAN & LAGO, 1973 (HLA)

Foram pesadas aproximadamente 250 mg de óleo-resina e adicionados 5,0 mL de solução de NaOH 0,50 mol/L em metanol. A mistura foi aquecida sob refluxo por 5 minutos. Foram adicionados a mistura 15,0 mL do reagente de esterificação (preparado a partir da mistura de 2,0 g de cloreto de amônio, 60,0 mL de metanol e 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, aquecida por aproximadamente 15 minutos). A mistura foi aquecida em refluxo por mais 3 minutos e, em seguida, foi transferida para um funil de separação juntamente com 25,0 mL de hexano e 50,0 mL de água deionizada. Após agitação e separação das fases, a fase aquosa foi descartada. Foram adicionados mais 25,0 mL de água deionizada à fase orgânica e, após agitação e separação das fases, a fase aquosa foi descartada. A fase orgânica foi coletada, e a amostra foi concentrada em evaporador rotativo. Os ésteres metílicos foram solubilizados em hexano, que foram posteriormente injetados no cromatógrafo a gás.

4.5.3. MÉTODO DE ESTERIFICAÇÃO DE CATÁLISE ÁCIDA EMPREGANDO ÁCIDO CLORÍDRICO EM METANOL

4.5.3.1. MÉTODO DESCRITO POR JHAM *et al.*, 1982. (JHA)

Foram transferidos para um tubo de ensaio 50 µL de óleo-resina, ao qual foi adicionado 1,0 mL de uma solução de KOH 0,50 mol/L em metanol. A mistura foi aquecida em banho a 100 °C por 5 minutos. Após o aquecimento, foram adicionados 400 µL de HCl em metanol aquoso (4:1 v/v). A mistura foi novamente aquecida em banho a 100 °C por 15 minutos. Após o resfriamento do tubo, foram adicionados 2,0 mL de água deionizada e 3,0 mL de éter de petróleo e a mistura foi agitada. O sobrenadante foi coletado e foram adicionados 3,0 mL de hexano ao tubo, que foi novamente agitado, e a fração coletada foi adicionada à fração anterior. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio e o solvente foi evaporado para posterior injeção no cromatógrafo a gás.



5. Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COLETA DAS AMOSTRAS E DADOS DE DAP, TIPO DE SOLO E INFESTAÇÃO POR CUPINS

O processo de extração, utilizando trado metálico forneceu o óleo-resina de copaíba em quantidades variadas. No total, quarenta e três amostras de óleos-resina de copaíba foram coletadas de trinta e três árvores diferentes: vinte e três amostras na primeira coleta (época seca), realizada em novembro de 2004; doze amostras na segunda coleta (época chuvosa), realizada em maio de 2005 e oito amostras na terceira coleta (época seca), realizada em novembro de 2005.

Durante a coleta também foram observados e registrados:

- O diâmetro à altura do peito (DAP) de cada árvore: treze árvores possuíam DAP entre 30 e 40 cm, outras treze árvores possuíam DAP entre 40 e 50 cm, cinco árvores possuíam DAP entre 50 e 60 cm e apenas duas árvores possuíam DAP maior que 60 cm;
- O tipo de solo onde as árvores se encontravam: das trinta e três árvores, dezessete árvores estão localizadas em solos argilosos (teor de argila $\geq 60\%$), onze árvores estão localizadas em solos arenosos (teor de argila $< 30\%$), e apenas cinco árvores estão localizadas em solos considerados areno-argilosos ($30\% \leq$ teor de argila $< 60\%$). A classificação dos tipos de solo foi feita com base nos teores de argila das amostras de solo coletadas, que foram submetidas a análises granulométricas, através do método de decantação;
- A presença de infestação por cupins: das trinta e três árvores, apenas oito não apresentavam infestação por cupins.

A Tabela 4 apresenta os dados de DAP, teor de argila, tipo de solo e infestação por cupins, para cada árvore fornecedora das amostras de óleos de copaíba coletados.

Tabela 4. Dados de DAP, infestação por cupins, teor de argila e tipo de solo para cada matriz fornecedora das amostras de óleos de copaíba.

Matriz (árvore)	DAP (cm)	Infestação por Cupim	Teor de argila	Tipo de solo
M01	31,7	Com	30,56	argilo-arenoso
M02	34,4	Com	29,68	arenoso
M03	35,8	Com	20,95	arenoso
M04	42,0	Sem	83,69	argiloso
M05	68,8	com	85,15	argiloso
M07	53,3	com	82,99	argiloso
M08	36,0	sem	84,14	argiloso
M09	34,7	com	82,65	argiloso
M10	47,3	com	85,94	argiloso
M12	37,9	sem	24,61	arenoso
M13	52,8	com	79,00	argiloso
M14	38,8	com	77,99	argiloso
M16	41,0	sem	78,26	argiloso
M17	30,6	com	17,93	arenoso
M18	44,8	com	34,69	argilo-arenoso
M20	61,4	com	76,08	argiloso
M21	46,3	com	77,83	argiloso
M23	41,0	com	80,72	argiloso
M25	43,3	com	67,58	argiloso
M27	32,0	com	68,00	argiloso
M28	35,1	com	2,59	arenoso
M29	37,2	com	43,63	argilo-arenoso
M30	36,6	sem	82,38	argiloso
M31	41,8	com	19,66	arenoso
M32	53,7	com	63,64	argiloso
M35	33,5	sem	1,67	arenoso
M36	42,6	com	26,91	arenoso
M39	40,7	com	16,04	arenoso
M40	50,0	com	55,09	argilo-arenoso
M42	48,5	sem	13,89	arenoso
M43	50,8	com	2,34	arenoso
M44	40,4	sem	59,11	argilo-arenoso
M45	46,9	com	60,67	argiloso

5.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

5.2.1. PRIMEIRA COLETA (C1)

Na primeira coleta realizada em novembro de 2004 (época seca) foram coletadas vinte e três amostras: das quais doze amostras são provenientes de árvores localizadas em solos argilosos, oito amostras são provenientes de árvores localizadas em solos arenosos e apenas três amostras são provenientes de árvores localizadas em solos areno-argilosos. Apenas quatro das vinte e três amostras não apresentavam infestações por cupins.

A proposta de identificação, a quantificação relativa e os respectivos índices de retenção (IR) para os constituintes químicos do óleo-resina de *C. multijuga* Hayne coletados em novembro de 2004, são apresentados a seguir, na Tabela 5 (Página 58).

Foram identificados trinta e cinco compostos, que corresponderam a 70,42% a 97,92% do conteúdo total dos óleos. A composição química dos óleos de *C. multijuga* revelou uma proporção elevada de sesquiterpenos (88,55% a 98,05%). Estes resultados estão de acordo com resultados já publicados em que Cascon & Gilbert (2000) encontraram teores de 79,7% e 97,3% para a fração sesquiterpênica em duas amostras autênticas de óleos de *C. multijuga*. O mesmo resultado foi encontrado por Medeiros (2006), também em amostras autênticas de *C. multijuga*, com teores médios de 96,3% para amostras coletadas no período seco e 96,9% para amostras coletadas no período chuvoso. Veiga-Junior *et al* (2007) encontrou 85,5% de sesquiterpenos em óleos-resina da mesma espécie.

Os compostos α -amorfeno, α -copaeno, α -humuleno, β -cariofileno, óxido de cariofileno, ácido copálico e o ácido pinifólico foram detectados em todas as vinte e três amostras analisadas. Estes constituintes são comumente identificados no gênero *Copaifera*, embora as proporções possam ser diferentes, nenhum deles são exclusivos desse gênero

Tabela 5. Percentual relativo dos constituintes dos óleos-resina de *Copaifera multijuga* Hayne coletados em novembro de 2004 (1ª coleta - época seca).

COMPOSTO	IR	M01-C1	M03-C1	M04-C1	M08-C1	M09-C1	M10-C1	M13-C1	M14-C1	M17-C1	M18-C1	M20-C1	M21-C1	M25-C1	M27-C1	M28-C1	M31-C1	M32-C1	M36-C1	M39-C1	M42-C1	M43-C1	M44-C1	M45-C1
δ-elemeno	1335	-	0,35	-	-	-	-	0,73	-	-	0,89	-	0,88	1,55	-	-	-	1,52	-	1,48	0,29	1,56	-	1,63
α-cubebeno	1345	1,17	-	0,68	0,62	0,75	0,99	0,80	0,96	-	-	0,60	-	0,32	0,73	-	0,56	0,22	0,22	-	1,00	-	-	0,20
α-ilangeno	1373	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,32	-	-	0,26	0,10	-	0,28	-	0,35	-	-	-	-	-
α-copaeno	1374	13,52	8,50	11,92	13,13	12,67	14,87	10,47	11,17	2,51	3,85	8,06	7,16	3,60	6,24	11,27	6,47	3,72	2,03	4,39	13,05	6,04	4,00	2,42
β-elemeno	1389	-	3,92	-	-	-	-	2,58	-	1,00	2,22	-	8,56	4,32	1,28	-	-	4,63	0,70	7,45	-	5,31	-	4,76
α-gurjuneno	1409	0,25	-	0,17	-	-	0,22	-	0,37	-	0,46	-	-	0,41	0,19	-	-	0,20	0,18	-	-	-	-	-
β-cariofileno	1417	40,81	10,58	62,70	42,00	13,14	55,46	18,91	61,53	15,38	35,79	27,93	5,08	40,03	32,41	12,68	47,48	32,34	60,10	14,53	31,70	16,00	18,62	25,88
trans-α-bergamoteno	1432	0,27	-	-	-	-	-	-	0,55	-	-	3,09	-	0,16	0,22	-	-	-	7,10	-	0,28	20,93	32,78	-
γ-elemeno	1434	-	0,63	-	-	-	-	1,08	-	-	-	-	1,40	-	-	-	-	1,22	-	1,82	-	-	-	1,70
α-humuleno	1452	5,63	2,43	8,69	5,74	2,73	7,74	2,80	8,25	3,30	5,16	4,22	1,37	5,78	4,56	2,89	6,80	4,54	8,70	2,93	4,42	3,09	3,38	3,51
allo-aromadendreno	1458	1,01	-	-	-	0,87	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-curcumeno	1479	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,78	-	-	0,61	0,87	-
α-amorfenos	1483	2,90	2,80	1,54	2,71	2,34	2,52	3,41	1,47	2,08	2,09	4,00	2,29	1,66	4,61	3,26	3,62	1,73	1,30	3,30	4,02	0,90	2,90	1,95
germacreno D	1484	12,81	-	2,50	18,86	-	1,72	10,84	1,30	-	10,60	13,29	-	7,66	16,65	-	13,13	18,74	-	-	17,83	-	-	29,23
β-selineno	1489	0,15	-	0,12	-	-	-	-	-	-	1,41	-	-	0,55	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	0,36
α-muroleno	1500	2,87	1,16	-	-	0,77	1,35	2,68	0,81	0,30	2,10	2,93	1,50	1,32	3,30	0,64	2,60	1,02	0,43	1,74	3,41	0,59	0,42	-
biciclogermacreno	1500	-	-	1,09	2,86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,35
γ-cadineno	1513	0,88	0,91	-	-	0,61	0,14	1,78	0,22	-	1,34	1,30	-	0,71	1,69	-	-	0,37	-	1,29	1,14	0,51	-	0,60
δ-cadineno	1522	4,79	-	2,58	2,77	-	3,71	6,34	2,57	-	4,04	4,94	-	2,19	5,39	-	2,26	1,48	0,68	-	5,81	0,72	0,56	2,10
trans-cadina-1,4-dieno	1533	-	-	-	-	-	-	0,29	-	-	-	0,36	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	-	-	0,12
selina-3,7(11)-dieno	1545	-	-	-	-	-	0,29	1,36	-	-	2,40	-	-	-	-	-	-	0,29	-	-	-	-	-	0,78
germacreno B	1559	-	-	-	-	-	-	3,20	-	-	7,28	-	-	8,87	-	-	-	13,60	-	1,34	-	2,84	-	12,53
palustrol	1567	-	-	-	-	-	0,38	-	-	-	0,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13	-	-	-
spatulanol	1577	-	0,72	-	-	1,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00	0,81	-	-	0,50	-	-	0,38	-
óxido de cariofileno	1582	0,75	32,47	0,25	0,30	31,52	0,33	0,21	0,41	44,33	0,41	0,56	36,43	2,57	0,60	30,93	0,57	0,92	1,28	25,75	0,75	11,72	9,51	0,58
globulol	1590	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,07	-	-	0,22	-	-	-	-	-	0,18	-	-	-
viridiflorol	1592	0,28	-	0,10	-	-	-	-	-	-	-	0,26	-	-	0,41	-	-	-	-	-	0,40	-	-	0,09
rosifoliol	1600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ledol	1602	0,35	-	0,20	0,37	-	0,29	0,17	-	0,34	-	0,15	-	0,33	0,36	3,93	0,70	0,24	0,24	-	0,35	1,92	1,82	-
torreyol	1644	1,22	1,28	0,73	1,13	1,51	1,93	0,71	0,48	1,56	1,79	-	-	1,62	1,57	1,19	1,63	0,50	-	-	-	0,70	1,78	-
α-cadinol	1652	1,48	2,30	0,26	-	1,46	0,52	2,74	0,29	0,32	3,65	1,75	2,27	2,26	2,29	0,95	0,72	0,75	-	2,93	2,17	1,64	0,52	1,80
ácido copálico		2,15	3,46	1,13	1,99	3,10	2,78	3,10	5,17	2,43	2,99	1,89	1,66	1,21	4,28	0,92	2,52	2,74	3,31	2,68	0,72	2,92	1,47	0,56
ácido 3β-hidróxi-copálico		0,21	0,79	0,12	0,16	0,18	0,17	0,40	-	0,65	1,50	0,41	-	0,14	0,31	-	0,41	1,14	0,52	0,52	0,21	2,16	0,96	0,98
ácido 3β-acetóxi-copálico		0,52	0,46	0,14	-	-	0,22	1,19	-	0,23	1,08	0,37	-	0,30	0,55	-	0,18	0,45	0,32	0,39	0,30	0,30	0,38	0,30
ácido pinifólico		1,25	4,73	1,78	2,49	3,31	1,29	2,01	1,81	2,01	2,59	0,75	3,04	2,30	2,55	0,76	1,48	4,79	1,45	3,48	1,93	1,50	1,80	1,13
TOTAL		95,40	77,49	96,70	95,13	76,15	97,92	77,80	97,36	76,44	94,25	77,08	71,64	90,12	90,67	70,42	92,22	97,15	89,69	76,52	90,34	81,96	82,15	95,56

*Composto majoritário

*Detectado com teor superior a 10,00%

*Detectado com teor inferior a 1,00%

(CASCON & GILBERT, 2000).

O β -cariofileno, considerado um marcador da fração sesquiterpênica dos óleos de copaíba, foi o sesquiterpeno majoritário em quatorze amostras (M01-C1, M04-C1, M08-C1, M10-C1, M13-C1, M14-C1, M18-C1, M20-C1, M25-C1, M27-C1, M31-C1, M32-C1, M36-C1 e M42-C1) das vinte e três amostras analisadas, seu teor variou de 5,08% a 62,70%. Resultado que também já foi descrito por Cascon & Gilbert (2000), Lima *et al* (2003), Sant'Anna *et al* (2007), Veiga-Junior *et al* (2007), Barbosa (2007) e Romero (2007) para óleos de copaíba de *C. multijuga*.

Além disso, o β -cariofileno também já foi descrito como constituinte majoritário em óleos-resina de *C. langsdorffii* coletados no Ceará (GRAMOSA & SILVEIRA, 2005); em óleos-resina de *C. cearensis* coletados em Itaboraí, no Rio de Janeiro (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2007); em óleos-resina de *C. reticulata* coletados em Belém, no Pará (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2007); coletados nos municípios de Curionópolis, no Pará e Mazagão, no Amapá (ZOGHBI *et al.*, 2009); coletados no município de Moju, no Pará (OLIVEIRA *et al.*, 2006; SACHETTI *et al.*, 2011); e coletados no município de Belterra, também no Pará (HERRERO-JÁUREGUI *et al.*, 2011); em óleos-resina de *C. duckei* coletados no município de Moju, no Pará (LAMEIRA *et al.*, 2009); em óleos-resina de *C. pubiflora* coletados em Boa Vista, em Roraima (ZOGHBI *et al.*, 2009); em óleos essenciais das folhas de *C. trapezifolia* coletados em São Paulo (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2006); e ainda em óleos essenciais do pericarpo, folhas e galhos de *C. langsdorffii* coletados em Lavras, em Minas Gerais (Do Nascimento *et al.*, 2012).

O óxido de cariofileno foi o majoritário em seis amostras (M03-C1, M09-C1, M17-C1, M21-C1, M28-C1 e M39-C1) das vinte e três amostras analisadas, seu teor variou de 0,21% a 44,33%. Resultado que também já foi descrito por Barbosa (2007) e Romero (2007) em amostras de óleos-resina de *C. multijuga* coletados em Manaus, no Amazonas; e em óleos-resina de *C. guianensis* coletados no Amapá (CASCON & GILBERT, 2000), trabalho no qual

os autores constataram que este sesquiterpeno pode ser um produto natural do óleo-resina de copaíba e não um artefato advindo da oxidação devido ao armazenamento, como já tinha descrito anteriormente. Neste estudo o óxido de cariofileno foi o constituinte majoritário, com teor de 19% em óleo-resina de *C. guianensis* recém extraído. Este sesquiterpeno também foi o constituinte majoritário em óleos essenciais das cascas de frutos, das cascas das raízes, da madeira de tronco e da madeira das raízes de *C. langsdorffii* coletados no Ceará (GRAMOSA & SILVEIRA, 2005); e em óleos essenciais das folhas de *C. langsdorffii* coletados em Lavras, em Minas Gerais (Do Nascimento *et al.*, 2012).

O *trans*- α -bergamoteno detectado em apenas nove amostras das vinte e três amostras analisadas, foi o majoritário em apenas duas amostras (M43-C1 e M11-C1), seu teor variou de 0,16% a 32,78%. Resultado que também já foi descrito por Zoghbi *et al* (2009) para amostras de *C. reticulata* coletadas nos municípios de Almeirim e Belterra, no Pará.

O germacreno D, importante precursor de muitos hidrocarbonetos sesquiterpênicos, como cadinenos e muurolenos (BÜLOW & KÖNIG, 2000), foi detectado em quatorze amostras das vinte e três amostras analisadas, apesar de ter sido o majoritário em apenas uma amostra (M45-C1). Seus teores variaram de 1,30% a 29,23%. O germacreno D já havia sido detectado como constituinte majoritário por Barbosa (2007) em duas amostras de *C. multijuga* coletadas no período chuvoso em Manaus, sendo identificado aqui como constituinte majoritário em uma amostra coletada no período seco, sugerindo que seu teor não esteja relacionado com a estação de coleta do óleo de copaíba. Também foi detectado como o constituinte majoritário em óleos essenciais de folhas e galhos de *C. langsdorffii* coletados em Lavras, em Minas Gerais (Do Nascimento *et al.*, 2012).

Geralmente o germacreno D ocorre em plantas simultaneamente com o δ -cadineno (BÜLOW & KÖNIG, 2000), fato que foi observado neste trabalho: das vinte e três amostras analisadas quatorze apresentaram germacreno D e δ -cadineno simultaneamente, seis amostras

não apresentaram nenhum dos dois constituintes e apenas três amostras continham δ -cadineno com a ausência de germacreno D.

O α -copaeno, comumente descrito como um dos principais constituintes dos óleos de copaíba, independente da espécie, foi detectado em todas as amostras. Embora, tenha sido o constituinte secundário ou terciário em nove amostras das vinte e três amostras analisadas, não foi majoritário em nenhuma amostra. O α -copaeno já foi descrito como constituinte majoritário em óleos-resina de *C. paupera* coletadas em Xapuri, no Acre (ZOGHBI *et al.*, 2009), *C. piresii* coletadas em Machadinho d'Oeste, em Rondônia (ZOGHBI *et al.*, 2009) e *C. martii* coletadas no município de Moju, no Pará (OLIVEIRA *et al.*, 2006); foi identificado ainda como constituinte majoritário dos óleos essenciais obtido por hidrodestilação do óleos-resina de *C. martii* coletados no município de Moju, no Pará (ZOGHBI *et al.*, 2007).

O β -bisaboleno, descrito frequentemente como um dos principais constituintes dos óleos de copaíba, não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas neste trabalho. Embora já tenha sido descrito como constituinte majoritário em amostras de óleos-resina *C. duckei* coletadas no Amapá e no Pará (CASCON & GILBERT, 2000), coletadas no município de Caxiuanã, no Pará (CARVALHO *et al.*, 2005) e coletadas no município de Moju, no Pará (OLIVEIRA *et al.*, 2006; LAMEIRA *et al.*, 2009); também já foi detectado como constituinte majoritário em óleos-resina de *C. reticulata* coletadas nos municípios de Curionópolis (ZOGHBI *et al.*, 2009) e Belterra, ambos no Pará (ZOGHBI *et al.*, 2009; HERRERO-JÁUREGUI *et al.*, 2011).

Entre os diterpenos identificados, o ácido copálico, descrito na literatura como marcador químico dos óleos das copaibeiras (BIAVATTI *et al.*, 2006), foi detectado como o constituinte majoritário em doze amostras das vinte e três amostras analisadas. Seus teores variaram entre 0,56% e 5,17%. Já o ácido pinifólico, foi detectado como constituinte majoritário nas outras onze amostras das vinte e três amostras analisadas. Seus teores

variaram entre 0,75% e 4,79%. O ácido 3 β -hidróxi-copálico foi detectado em vinte amostras das vinte e três amostras analisadas. Enquanto o ácido 3 β -acetóxi-copálico foi detectado em dezoito amostras das vinte e três amostras analisadas.

Os teores dos constituintes identificados nas amostras (resultados das análises cromatográficas) de óleo-resina de copaíba constituem um conjunto de dados multivariados que foram submetidos às Análises de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) e Análises de Componentes Principais (PCA), para a classificação das vinte e três amostras da primeira coleta. O pré-processamento dos dados foi realizado por normalização por log com o objetivo de reduzir a influência de variações indesejadas presentes no conjunto de dados.

Com base nos teores de cada composto presente, determinados por CG-DIC e CG-EM, construiu-se uma matriz de dados (23 linhas x 35 colunas): sendo as 23 linhas correspondentes às amostras e 35 colunas correspondentes aos teores dos constituintes identificados nas amostras. A similaridade entre as amostras foi calculada a partir da distância Euclidiana no espaço das variáveis, usando o método Ward. A HCA foi realizada com a finalidade de verificar semelhanças na composição química entre as amostras analisadas.

O resultado da HCA foi representado na forma de um gráfico bidimensional chamado dendograma (Figura 8, na página 63), através do qual pode-se observar o agrupamento entre as amostras em dois clusters (grupos) distintos, classificando as vinte e três amostras da primeira coleta.

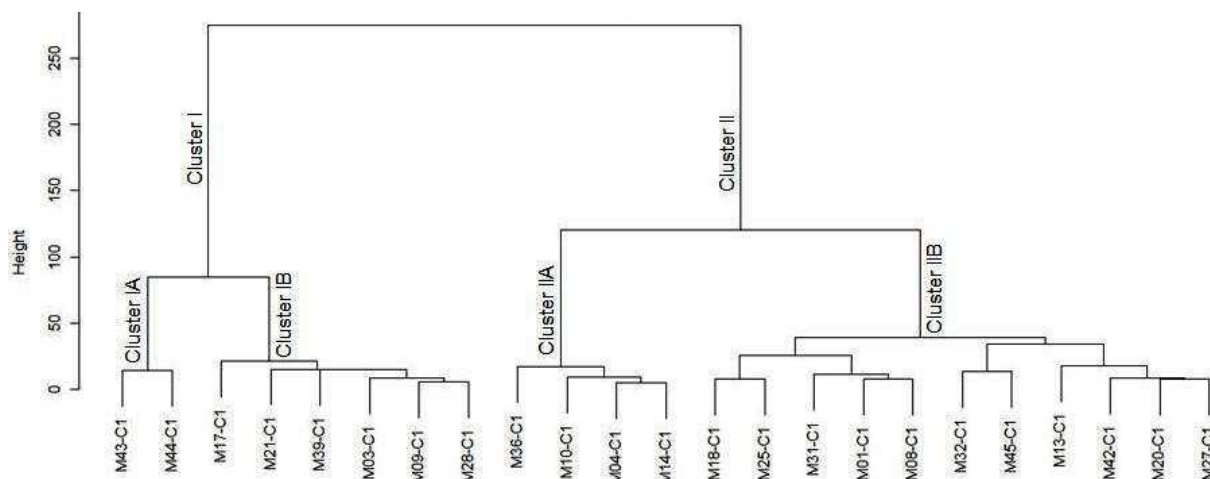


Figura 8. Dendrograma correspondente à classificação das vinte e três amostras de óleos-resina de copaíba (*C. multijuga*), coletadas em novembro de 2004 (1ª coleta).

O cluster I, foi dividido em dois sub-clusters. O sub-cluster IA inclui duas amostras (M43-C1 e M44-C1) que apresentaram o *trans*- α -bergamoteno como constituinte majoritário e teve seu teor variando entre 20,93% e 32,78%.

Sample Name : M44-C1
 Sample ID : M44-C1
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\UFAM\Agosto\M44-C1.qgd
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Copaiba.qgm

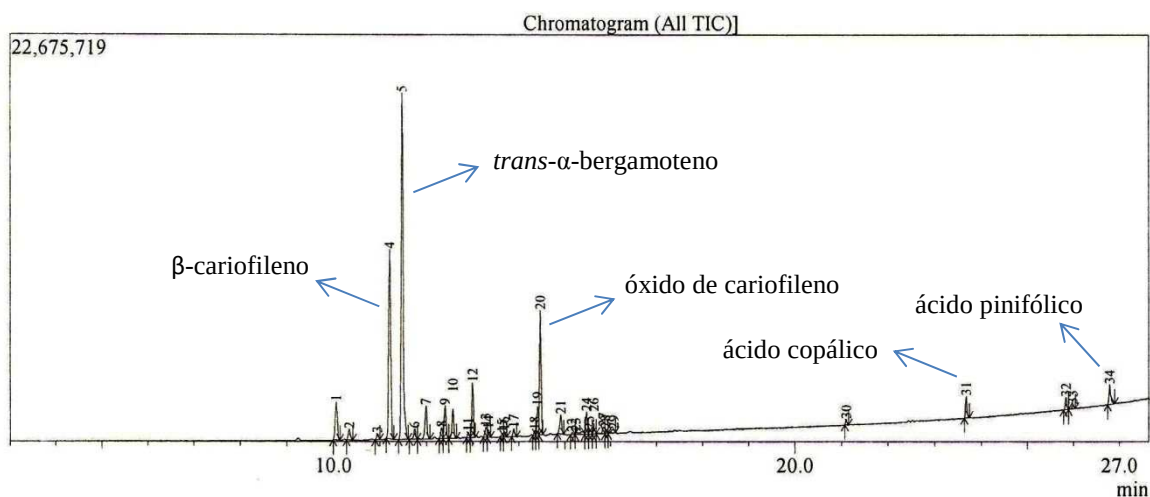


Figura 9. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IA, referente as amostras da 1ª coleta (novembro de 2004).

No sub-cluster IB, que inclui seis amostras (M03-C1, M09-C1, M17-C1, M21-C1, M28-C1 e M39-C1), o óxido de cariofileno foi o constituinte majoritário, seus teores variaram entre 25,75% e 44,33%.

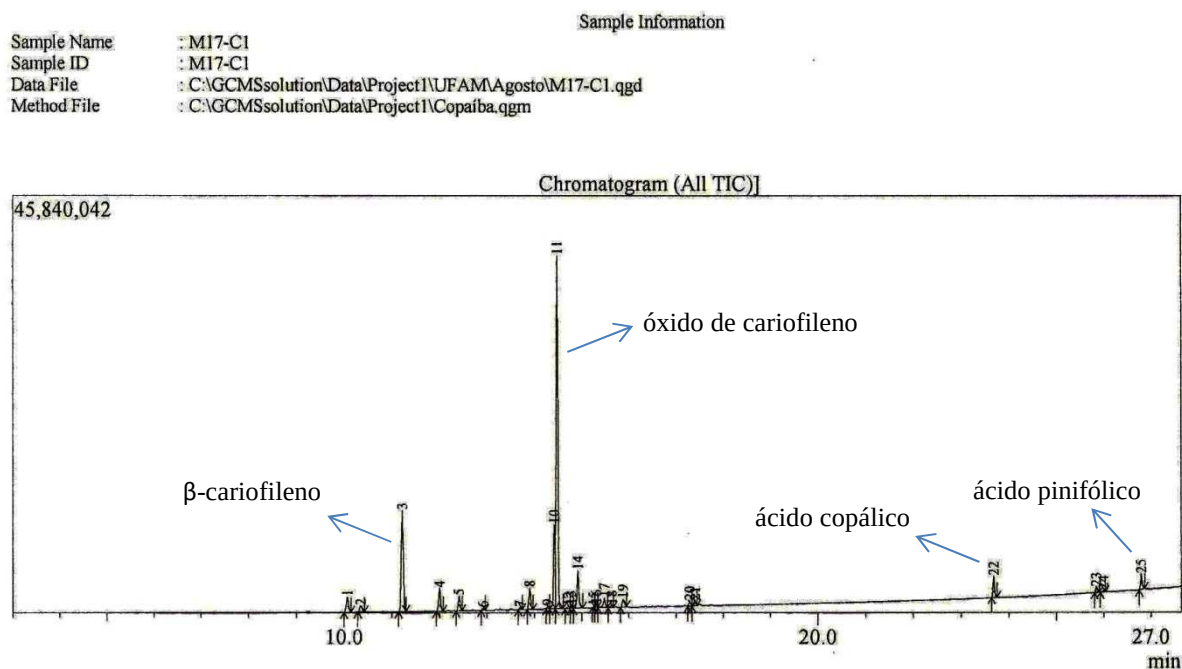


Figura 10. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IB, referente as amostras da 1ª coleta (novembro de 2004).

Todas as amostras do cluster II apresentaram o β -cariofileno como componente majoritário, mesmo assim este grupo foi subdividido em dois sub-clusters. O sub-cluster IIA, inclui quatro amostras (M04-C1, M10-C1, M14-C1 e M36-C1) que apresentaram teores de β -cariofileno variando entre 55,46% e 62,70%.

Sample Name : M04-C1
 Sample ID : M04-C1
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\UFAM\Agosto\M04-C1.qgd
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Copaiba.qgm

Sample Information

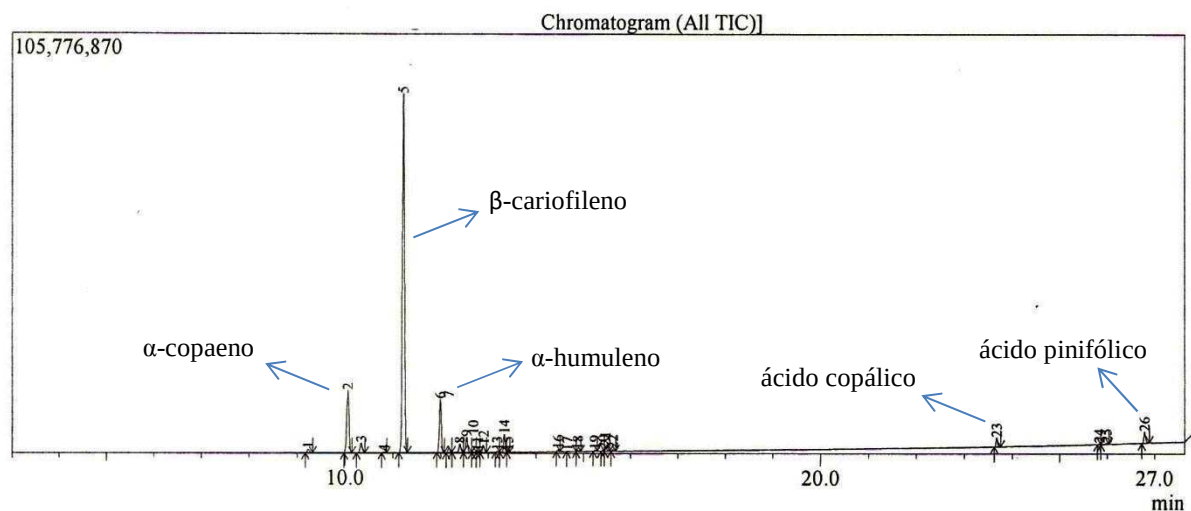


Figura 11. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IIA, referente as amostras da 1ª coleta (novembro de 2004).

Enquanto o sub-cluster IIB, que inclui onze amostras (M18-C1, M25-C1, M31-C1, M01-C1, M08-C1, M32-C1, M45-C1, M13-C1, M42-C1, M20-C1 e M27-C1), os teores de β -cariofileno variaram entre 18,91% e 47,48%.

Sample Name : M31-C1
 Sample ID : M31-C1
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\UFAM\Agosto\M31-C1.qgd
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Copaiba.qgm

Sample Information

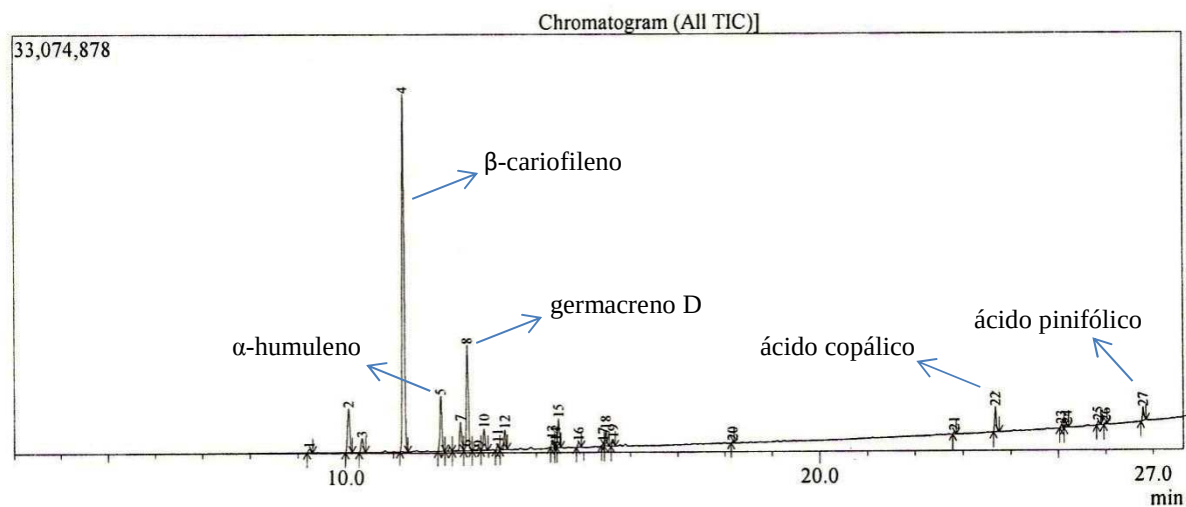


Figura 12. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IIB, referente as amostras da 1ª coleta (novembro de 2004).

A análise dos componentes principais (PCA) foi realizada através das combinações lineares das quatro variáveis originais selecionadas: β -cariofileno, óxido de cariofileno, ácido copálico e ácido pinifólico, para as vinte e três amostras analisadas. Estas variáveis foram selecionadas devido à sua frequência - já que foram detectadas em todas as amostras analisadas - e à sua importância - já que todas elas correspondem a constituintes detectados como majoritários nas frações sesquiterpênica e diterpênica. O arranjo matricial para a análise de componentes principais consistiu de 23 linhas, correspondentes às amostras e 4 colunas, correspondentes às variáveis selecionadas. A PCA mostrou a distribuição das amostras e a importância das variáveis. O resultado da PCA foi representado na forma de gráficos de *scores* e de *loading* (Figuras 13a e 13b, respectivamente), isto é, os gráficos da distribuição das amostras em função da importância das variáveis.

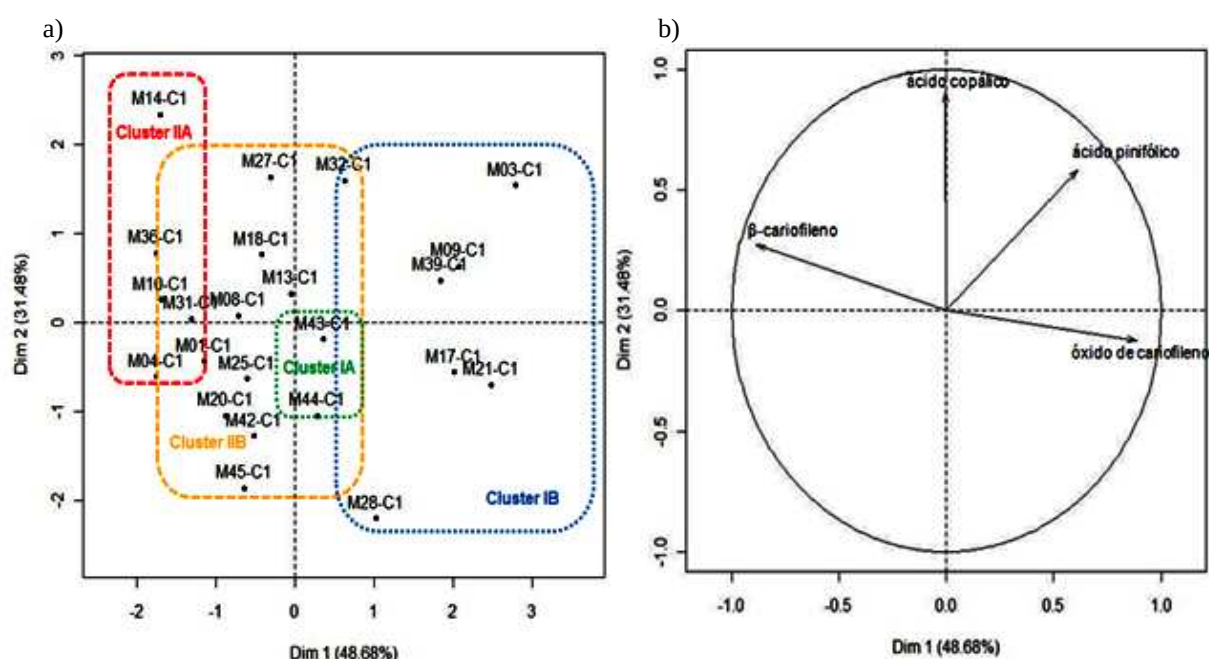


Figura 13. Gráficos de a) *scores* e b) *loadings* para Dim 1 versus Dim 2, correspondente à classificação das vinte e três amostras de óleos-resina de copaíba (*C. multijuga*), coletadas em novembro de 2004 (1ª coleta).

Na Figura 13a é apresentado o gráfico dos *escores* de Dim 1 (com 48,68% da variância) versus Dim 2 (com 31,48% da variância), representando 80,16% das informações

totais. Nesta figura é possível notar que Dim 1 separa os óleos com maiores teores de β -cariofileno, em valores de *escores* negativos, dos óleos com maiores teores de óxido de cariofileno, em valores de *escores* positivos. Enquanto é possível notar que Dim 2 separa os óleos com maiores teores de ácido copálico e ácido pinifólico, em valores de *escores* positivos, dos óleos com menores teores de ácido copálico e ácido pinifólico, em valores de *escores* negativos.

Uma inspeção no gráfico dos *loadings*, Figura 13b, confirma que a separação entre as amostras em Dim 1 é determinada, essencialmente, pelos parâmetros de β -cariofileno (com *loadings* negativos) e óxido de cariofileno (com *loadings* positivos). Assim, por exemplo, os óleos com maiores teores de β -cariofileno encontram-se mais à esquerda no gráfico dos *escores* (Figura 13a), enquanto os óleos com maiores teores de óxido de cariofileno encontram-se mais à direita no gráfico dos *escores* (Figura 13a). Enquanto Dim 2 mostra que a separação entre as amostras é determinada, essencialmente, pelos parâmetros de ácido copálico e ácido pinifólico. As amostras com maiores teores de ácido copálico e ácido pinifólico (com *loadings* positivos) se separam das amostras com menores teores de ácido copálico e ácido pinifólico (com *loadings* negativos). Assim, por exemplo, os óleos com maiores teores de ácido copálico e ácido pinifólico encontram-se nos quadrantes superiores do gráfico dos *escores* (Figura 13a), enquanto os óleos com menores teores de ácido copálico e ácido pinifólico encontram-se quadrantes inferiores no gráfico dos *escores* (Figura 13a).

Embora os sesquiterpenos e diterpenos ocorram em uma proporção similar em todos os óleos, como já registrado na literatura, foram observadas diferenças quantitativas e qualitativas nos perfis cromatográficos. (CASCON & GILBERT, 2000; VEIGA-JUNIOR & PINTO 2002; ZOGHBI *et al.*, 2009; HERRERO-JÁUREGUI *et al.*, 2011). A quantidade de sesquiterpenos detectados variou entre quatorze e trinta e nove sesquiterpenos; enquanto o número de diterpenos detectados ficou entre dois e dez diterpenos. Segundo Janzen (1974), a

variabilidade encontrada na fração sesquiterpênica pode ser influenciada pelo tipo de solo onde a árvore cresce. Ele sugere que os solos arenosos, pobres em nutrientes, promovem uma maior quantidade de metabolitos secundários, em comparação com solos argilosos, que são ricos em nutrientes.

5.2.2. SEGUNDA COLETA (C2)

Na segunda coleta realizada em maio de 2005 (época chuvosa) foram coletadas doze amostras, das quais sete amostras são provenientes de árvores localizadas em solos argilosos, quatro amostras são provenientes de árvores localizadas em solos arenosos e uma amostra é proveniente de uma árvore localizada em solo areno-argiloso. Apenas uma amostra das doze amostras não apresentavam infestações por cupins.

A proposta de identificação, a quantificação relativa e os respectivos índices de retenção (IR) para os constituintes químicos do óleo-resina de *C. multijuga* Hayne coletados em maio de 2005, são apresentados na Tabela 6 (Página 69).

Foram identificados trinta e cinco compostos, que corresponderam a 74,54% a 98,16% do conteúdo total dos óleos. Assim como as amostras da primeira coleta, a composição química dos óleos de *C. multijuga* da segunda coleta revelaram uma proporção elevada de sesquiterpenos (65,50% a 96,50%), embora a variação na fração sesquiterpênica da coleta anterior tenha sido menor. Estes resultados também estão de acordo com os resultados já encontrados para *C. multijuga* por Cascon & Gilbert (2000), Medeiros (2006), Barbosa (2007) e Veiga-Junior *et al.* (2007).

Os compostos α -copaeno, α -humuleno, α -amorfenos, β -cariofileno, óxido de cariofileno, ácido copálico e o ácido pinifólico foram novamente detectados em todas as amostras analisadas.

Tabela 6. Percentual relativo dos constituintes dos óleos-resina de *Copaifera multijuga* Hayne coletados em maio de 2005 (2ª coleta - época chuvosa).

COMPOSTO	IR	M05-C2	M07-C2	M09-C2	M10-C2	M12-C2	M14-C2	M21-C2	M27-C2	M31-C2	M36-C2	M40-C2	M43-C2
δ-elemeno	1335	1,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,25
α-cubebeno	1345	0,53	0,55	0,87	0,97	0,36	0,93	0,68	0,82	-	-	0,41	-
α-ilangeno	1373	0,31	-	-	-	-	-	0,10	-	-	-	-	-
α-copaeno	1374	3,44	3,56	15,04	14,11	5,06	11,38	5,65	11,11	6,68	2,00	3,48	5,51
β-elemeno	1389	3,27	1,19	-	-	-	-	1,15	-	-	0,67	-	6,10
α-gurjuneno	1409	-	-	-	0,20	0,44	-	0,18	0,13	-	0,18	0,23	-
β-cariofileno	1417	35,09	10,28	34,99	50,41	61,43	64,04	29,82	52,66	20,79	60,58	67,94	7,58
trans-α-bergamoteno	1432	-	0,48	-	-	9,71	0,59	0,22	7,51	-	6,17	0,26	19,77
γ-elemeno	1434	2,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-humuleno	1452	4,81	2,10	5,29	7,05	8,50	8,56	4,27	-	4,00	8,89	9,37	1,99
allo-aromadendreno	1458	-	-	1,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-curcumeno	1479	-	-	-	-	-	-	-	0,23	-	1,10	-	0,62
α-amorfenos	1483	3,44	2,18	2,52	2,51	1,28	1,56	4,48	1,72	4,05	1,39	2,05	1,01
germacreno D	1484	-	0,40	3,12	1,58	1,81	1,45	15,86	2,21	-	1,13	1,85	-
β-selineno	1489	0,41	-	-	-	-	-	0,20	-	-	-	0,11	0,31
α-muroleno	1500	2,56	0,58	1,00	1,29	-	0,81	3,17	0,89	0,77	0,44	-	0,85
biciclogermacreno	1500	-	-	-	-	0,93	-	-	-	-	-	1,06	-
γ-cadineno	1513	1,72	-	-	0,14	-	0,16	1,57	0,37	0,89	-	-	-
δ-cadineno	1522	-	0,60	1,69	3,56	1,66	2,59	5,01	2,77	-	0,82	1,04	-
trans-cadina-1,4-dieno	1533	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-	-	-	-
selina-3,7(11)-dieno	1545	1,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
germacreno B	1559	5,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,52
palustrol	1567	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
spatulanol	1577	-	1,74	1,19	-	-	-	-	-	2,09	-	-	-
óxido de cariofileno	1582	-	24,91	10,01	0,93	0,57	0,20	0,28	0,54	29,15	0,38	0,33	19,91
globulol	1590	-	-	0,12	0,10	-	-	0,22	-	-	-	-	-
viridiflorol	1592	-	-	-	0,41	-	-	0,38	-	-	-	-	-
rosifoliol	1600	-	-	-	-	-	-	0,12	-	-	-	-	-
ledol	1602	-	3,37	1,70	0,39	-	-	0,21	0,19	4,26	0,21	0,17	3,48
torreyol	1644	-	0,73	1,58	1,93	0,56	0,28	1,61	-	2,42	0,70	0,95	1,33
α-cadinol	1652	2,63	1,02	1,45	0,50	-	-	2,10	0,18	0,96	0,16	0,09	1,59
ácido copálico		2,42	15,04	3,42	5,66	1,38	4,30	7,09	2,89	4,87	2,46	2,72	2,48
ácido 3β-hidróxi-copálico		0,17	-	0,51	1,07	-	-	0,97	0,24	1,44	0,29	0,98	1,15
ácido 3β-acetóxi-copálico		0,45	4,20	0,51	0,70	-	-	0,95	0,37	-	0,20	0,76	0,26
ácido pinifólico		2,57	15,26	3,16	2,47	1,87	1,31	4,22	2,04	2,92	1,03	3,46	0,77
TOTAL		74,54	88,19	89,20	95,98	95,56	98,16	90,67	86,87	85,29	88,80	97,26	76,48

*Composto majoritário

*Detectado com teor superior a 10,00%

*Detectado com teor inferior a 1,00%

O β -cariofileno foi novamente detectado como o sesquiterpeno majoritário em nove amostras (M05-C2, M09-C2, M10-C2, M12-C2, M14-C2, M21-C2, M27-C2, M36-C2 e M40-C2) das doze amostras analisadas. Seus teores variaram de 7,58% a 67,94%, como já fora descrito anteriormente para amostras de *C. multijuga* (CASCON & GILBERT, 2000; LIMA *et al.*, 2003; BARBOSA, 2007; SANT'ANNA *et al.*, 2007; VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2007; ROMERO, 2007). Sendo o constituinte secundário em uma única amostra (M31-C2).

Já o óxido de cariofileno, foi detectado como o constituinte majoritário em três amostras (M07-C2, M31-C2 e M43-C2) das doze amostras analisadas. Seus teores variaram de 0,20% a 29,15%, como também já fora descrito para amostras de *C. multijuga* (CASCON & GILBERT, 2000; BARBOSA, 2007; ROMERO, 2007). Sendo o constituinte terciário em uma amostra (M09-C2).

O *trans*- α -bergamoteno detectado em apenas oito amostras das doze amostras analisadas, não se apresentou como constituinte majoritário em nenhuma das amostras. Seus teores variaram entre 0,22% e 19,77%. Sendo o constituinte secundário em uma amostra (M43-C2) com teor de 19,77%, na qual apresentou teor semelhante ao do constituinte majoritário desta amostra, o óxido de cariofileno (19,91%).

O germacreno D foi detectado em nove amostras das doze amostras analisadas. Seus teores variaram de 0,40% a 15,86%, mas este sesquiterpeno não se apresentou como constituinte majoritário em nenhuma das amostras; sendo o constituinte secundário em uma amostra (M21-C2). Nas nove amostras em que foi detectado o germacreno D ocorreu simultaneamente com o δ -cadineno, como já fora descrito por BÜLOW & KÖNIG, (2000).

Entre os diterpenos identificados, o ácido copálico e o ácido pinifólico foram novamente os diterpenos majoritários, em oito e quatro amostras, das doze amostras analisadas, respectivamente. Os teores do ácido copálico variaram entre 1,38% e 15,04%. Os teores do ácido pinifólico variaram entre 0,77% e 15,26%. Os ácidos diterpênicos 3 β -hidróxi-

copálico e 3 β -acetóxi-copálico foram detectados simultaneamente em oito amostras (M05-C2, M09-C2, M10-C2, M21-C2, M27-C2, M36-C2, M40-C2 e 43-C2) das doze amostras analisadas. Das quatro amostras restantes, o ácido 3 β -hidróxi-copálico foi detectado em uma amostra (M31-C2); o ácido 3 β -acetóxi-copálico em outra amostra (M07-C2); e duas amostras (M12-C2 e M14-C2) não apresentaram nem o ácido 3 β -hidróxi-copálico e nem o ácido 3 β -acetóxi-copálico.

Novamente, os teores dos constituintes identificados nas amostras (resultados das análises cromatográficas) de óleo-resina de copaíba constituem um conjunto de dados multivariados que foram submetidos às análises de HCA e PCA, para a classificação das doze amostras da primeira coleta. Novamente, o pré-processamento dos dados foi realizado por normalização por log com o objetivo de reduzir a influência de variações indesejadas presentes no conjunto de dados.

Com base nos teores de cada composto presente, determinados por CG-DIC e CG-EM, construiu-se uma matriz de dados (12 linhas x 35 colunas): sendo as 12 linhas correspondentes às amostras e 35 colunas correspondentes aos teores dos constituintes identificados nas amostras. A similaridade entre as amostras foi novamente calculada a partir da distância Euclidiana no espaço das variáveis, usando o método Ward.

O resultado da HCA está representado no dendograma (Figura 14, na página 72), através do qual pode-se observar o agrupamento entre as amostras em dois clusters (grupos) distintos, classificando as doze amostras da segunda coleta.

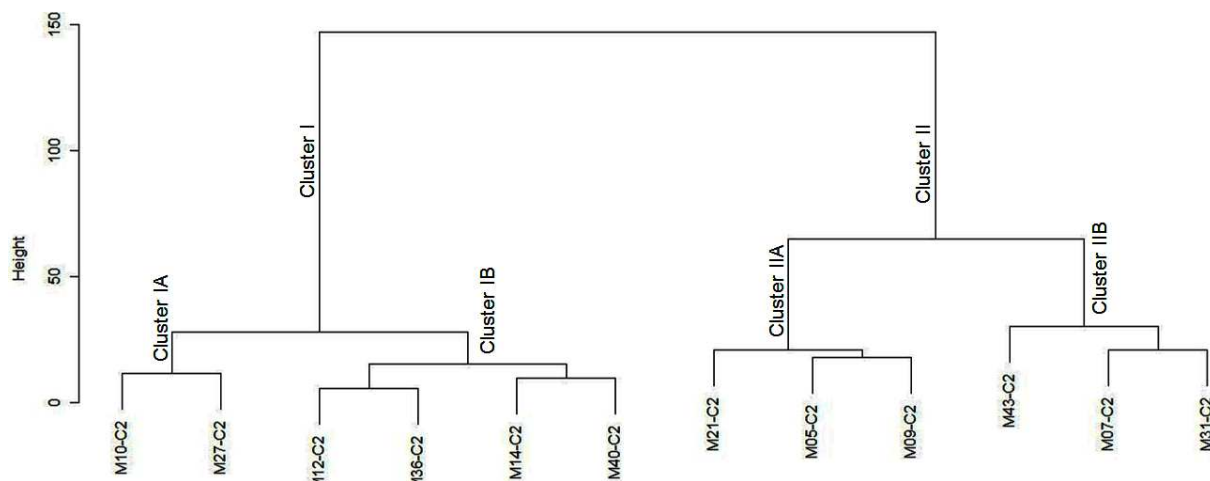


Figura 14. Dendrograma correspondente à classificação das doze amostras de óleos-resina de copaíba (*C. multijuga*), coletadas em maio de 2005 (2ª coleta).

Todas as amostras do cluster I apresentaram o β -cariofileno como constituinte majoritário, mesmo assim este grupo foi subdividido em dois sub-clusters. O sub-cluster IA, inclui duas amostras (M10-C2 e M27-C2) que apresentaram teores de β -cariofileno variando entre 50,41% e 52,66%.

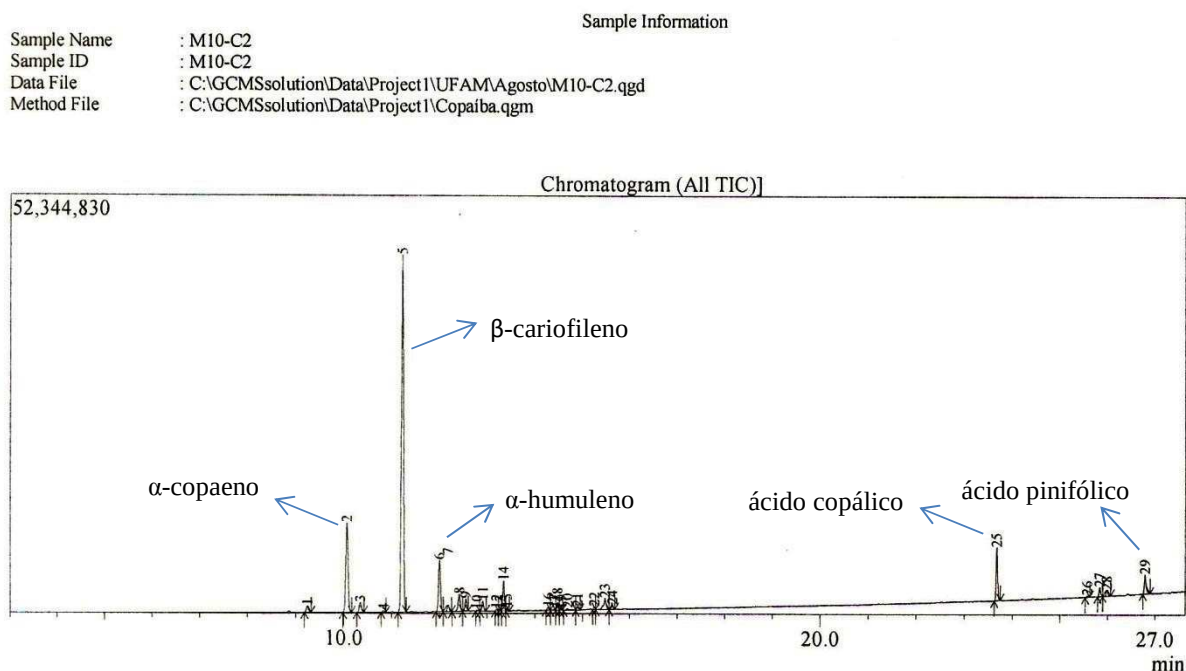


Figura 15. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IA, referente as amostras da 2ª coleta (maio de 2005).

Enquanto no sub-cluster IB, que inclui quatro amostras (M12-C2, M14-C2, M36-C2 e M40-C2), os teores de β -cariofileno variaram entre 60,58% e 67,94%.

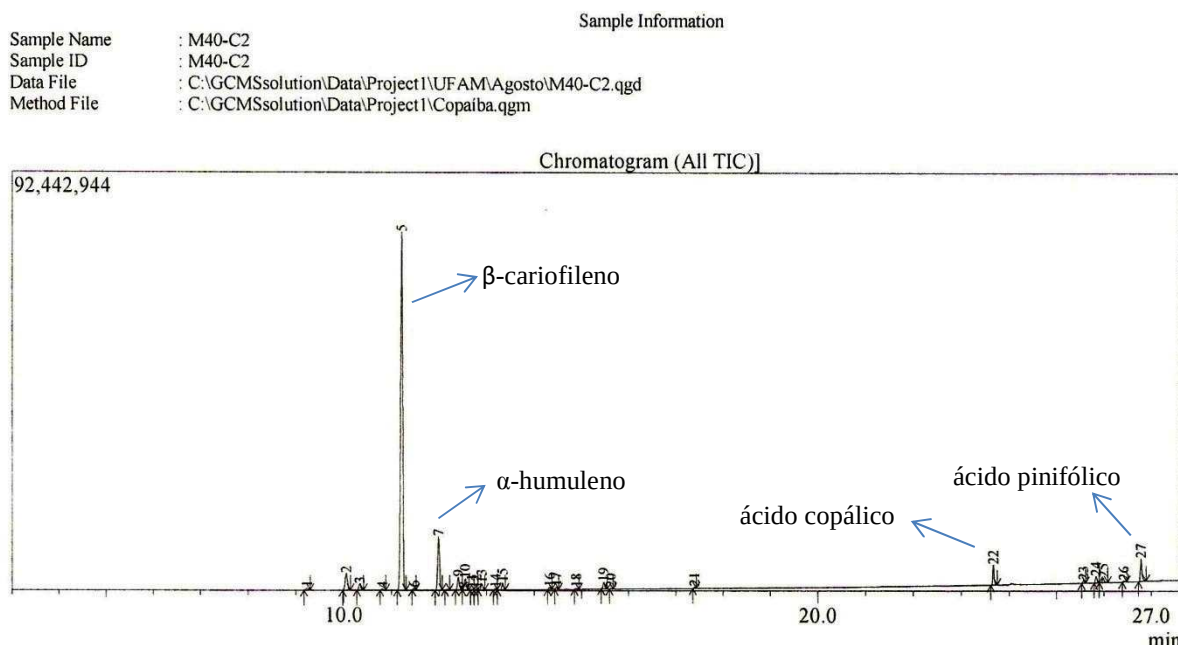


Figura 16. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IB, referente as amostras da 2ª coleta (maio de 2005).

O cluster II também foi dividido em dois sub-clusters. O sub-cluster IIA inclui três amostras (M05-C2, M09-C2 e M21-C2) que também apresentaram o β -cariofileno como constituinte majoritário, mas neste caso seus teores variaram entre 29,82% e 35,09%. No sub-cluster IIB, que também inclui três amostras (M07-C2, M31-C2 e M43-C2), o óxido de cariofileno foi a substância majoritária. Seus teores variaram entre 19,91% e 29,15%.

De todas as amostras da segunda coleta, a amostra M07-C2 (Figura 19, na página 75) se mostrou quantitativamente diferente das demais, pois foi a que apresentou maiores teores dos ácidos copálico e pinifólico, com teores relativos iguais a 15,04% e 15,26%, respectivamente.

Sample Information
 Sample Name : M05-C2
 Sample ID : M05-C2
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\UFAM\Agosto\M05-C2.qgd
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Copaiba.qgm

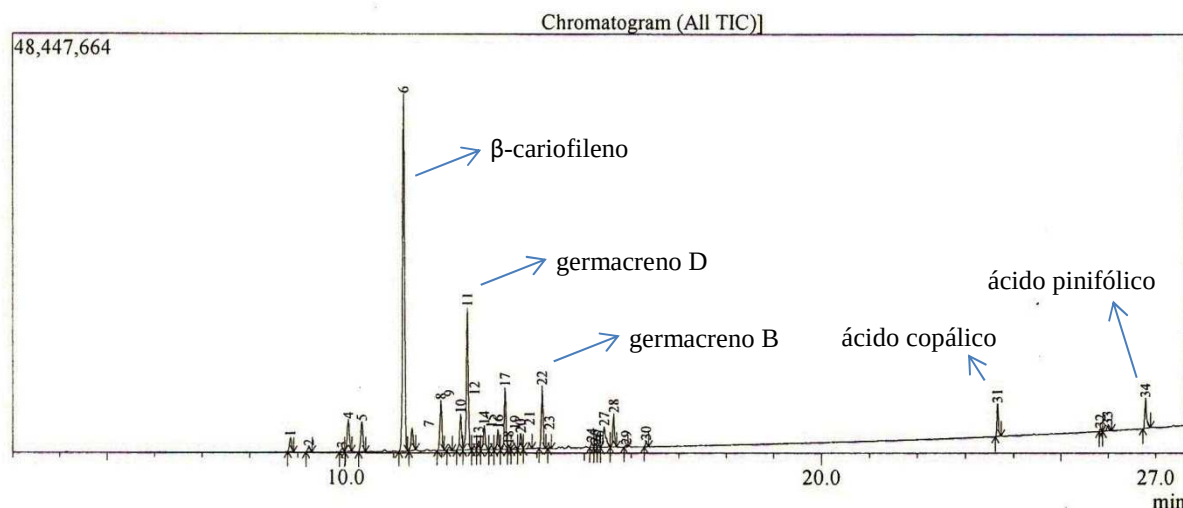


Figura 17. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IIA, referente as amostras da 2ª coleta (maio de 2005).

Sample Information
 Sample Name : M31-C2
 Sample ID : M31-C2
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\UFAM\Agosto\M31-C2.qgd
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Copaiba.qgm

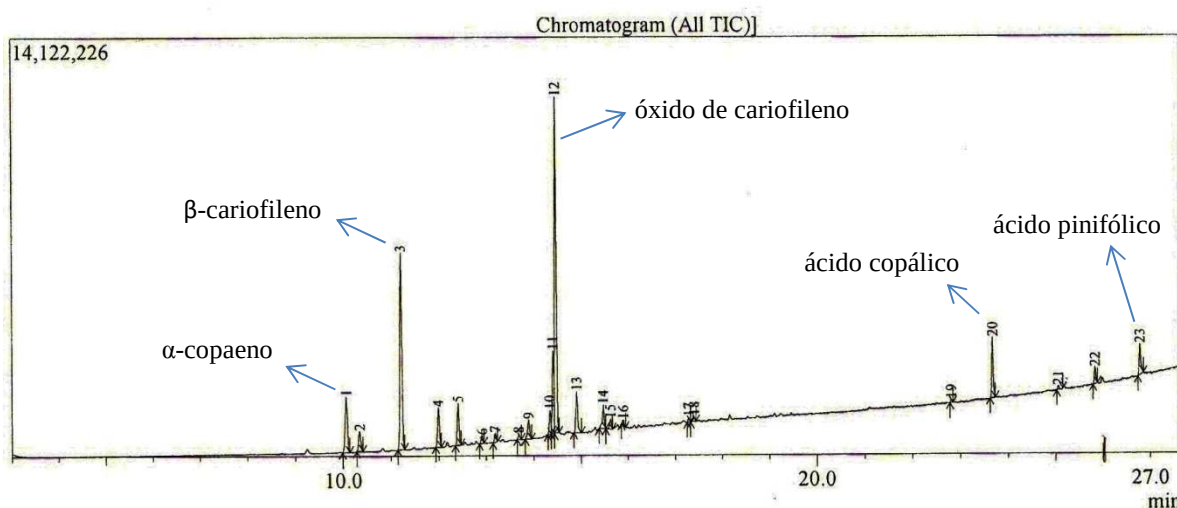


Figura 18. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IIB, referente as amostras da 2ª coleta (maio de 2005).

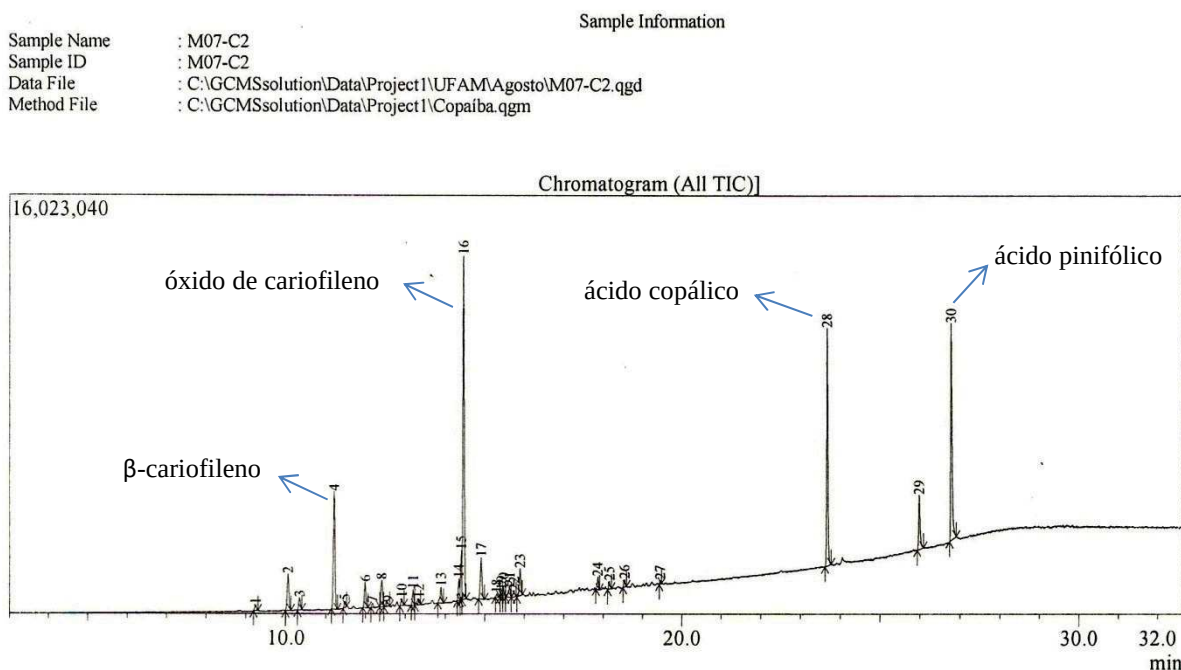


Figura 19. Cromatograma da amostra M07-C2, referente as amostras da 2ª coleta (maio de 2005).

A análise dos componentes principais (PCA) foi realizada através das combinações lineares das quatro variáveis originais selecionadas: β-cariofileno, óxido de cariofileno, ácido copálico e ácido pinifólico, para as doze amostras analisadas. Estas variáveis foram novamente selecionadas devido à sua importância e frequência nas frações sesquiterpênica e diterpênica. O arranjo matricial para a análise de componentes principais consistiu de 12 linhas, correspondentes às amostras e 4 colunas, correspondentes às variáveis selecionadas. A PCA mostrou a distribuição das amostras e a importância das variáveis. O resultado da PCA foi representado na forma de gráficos de *scores* e de *loading* (Figuras 20a e 20b, respectivamente), isto é, os gráficos da distribuição das amostras em função da importância das variáveis.

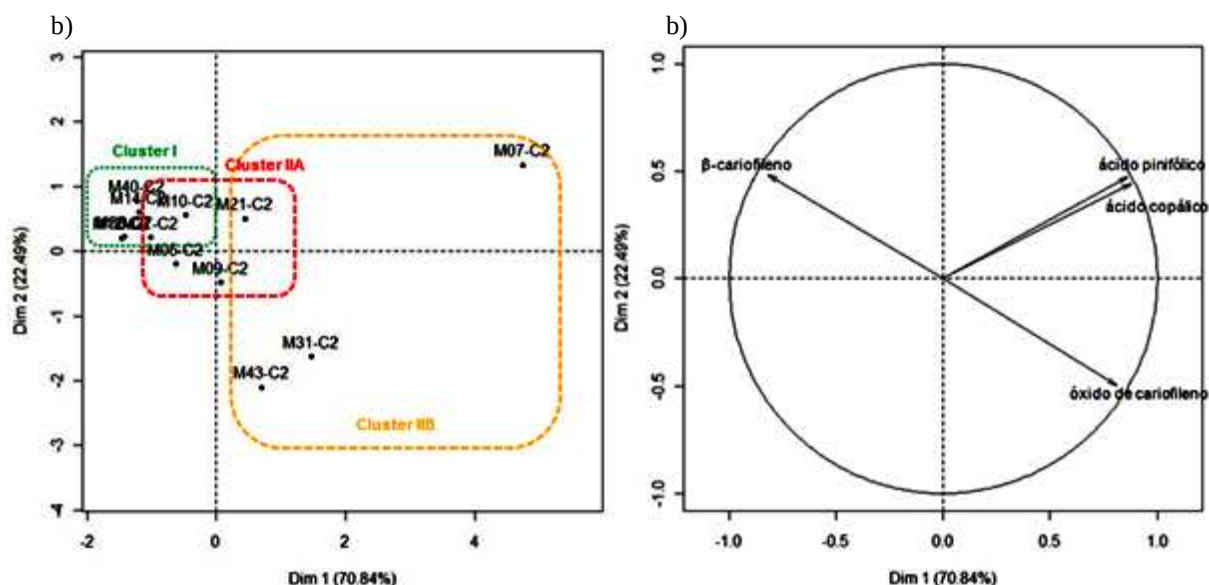


Figura 20. Gráficos de a) *scores* e b) *loadings* para Dim 1 versus Dim 2, correspondente à classificação das doze amostras de óleos-resina de copaíba (*C. multijuga*), coletadas em maio de 2005 (2ª coleta).

Na Figura 20a é apresentado o gráfico dos *escores* de Dim 1 (com 70,84% da variância) *versus* Dim 2 (com 22,49% da variância), representando 93,33% das informações totais. Nesta figura é possível notar que Dim 1 separa os óleos com maiores teores de β-cariofileno, em valores de *escores* negativos, dos óleos com maiores teores de óxido de cariofileno, em valores de *escores* positivos. Enquanto é possível notar que Dim 2 separa os óleos com maiores teores de ácido copálico e ácido pinifólico, em valores de *escores* positivos, dos óleos com menores teores de ácido copálico e ácido pinifólico, em valores de *escores* negativos.

Uma inspeção no gráfico dos *loadings*, Figura 20b, confirma que a separação entre as amostras em Dim 1 é determinada, essencialmente, pelos parâmetros de β-cariofileno (com *loadings* negativos) e óxido de cariofileno (com *loadings* positivos). Assim, por exemplo, os óleos com maiores teores de β-cariofileno encontram-se mais à esquerda no gráfico dos *escores* (Figura 20a), enquanto os óleos com maiores teores de óxido de cariofileno encontram-se mais à direita no gráfico dos *escores* (Figura 20a). Enquanto Dim 2 mostra que a separação entre as amostras é determinada, essencialmente, pelos parâmetros de ácido

copálico e ácido pinifólico. As amostras com maiores teores de ácido copálico e ácido pinifólico (com *loadings* positivos) se separam das amostras com menores teores de ácido copálico e ácido pinifólico (com *loadings* negativos). Assim, por exemplo, os óleos com maiores teores de ácido copálico e ácido pinifólico encontram-se nos quadrantes superiores do gráfico dos *escores* (Figura 20a), enquanto os óleos com menores teores de ácido copálico e ácido pinifólico encontram-se quadrantes inferiores no gráfico dos *escores* (Figura 20a).

Também é possível perceber no gráfico de *loadings* a diferença entre a amostra M07-C2 e as demais. Essa amostra se encontra com valores de *escores* positivos em Dim 1 e Dim 2. Em Dim 1 os *escores* positivos separam as amostras com maiores teores de óxido de cariofileno, em Dim 2 os *escores* positivos separam as amostras com maiores teores de ácido copálico e pinifólico, como mostra a Figura 20b.

Novamente foram observadas diferenças quantitativas e qualitativas nos perfis cromatográficos (CASCON & GILBERT, 2000; VEIGA-JUNIOR & PINTO 2002; ZOGHBI *et al.*, 2009; HERRERO-JÁUREGUI *et al.*, 2011). A quantidade de sesquiterpenos detectados variou entre quatorze e quarenta e um sesquiterpenos; enquanto o número de diterpenos detectados ficou entre dois e dez diterpenos.

5.2.3. TERCEIRA COLETA (C3)

Na terceira coleta, realizada em novembro de 2005 (época seca) foram coletadas apenas oito amostras: cinco amostras são provenientes de árvores localizadas em solos argilosos, duas amostras são provenientes de árvores localizadas em solos arenosos e uma amostra é proveniente de uma árvore localizada em solo areno-argiloso. Três das oito amostras não apresentavam infestações por cupins.

A proposta de identificação, a quantificação relativa e os respectivos índices de retenção (IR) para os constituintes químicos do óleo-resina de *C. multijuga* Hayne coletados em maio de 2005, são apresentados abaixo, na Tabela 7 (Página 79).

Foram identificados somente trinta e três compostos, que correspondem a 76,76% a 94,82% do conteúdo total dos óleos. Os sesquiterpenos *allo*-aromadendreno e spatulenol, detectados em amostras da primeira e segunda coletas, não foram identificados nas amostras da terceira coleta.

Assim como as amostras da primeira e segunda coleta, a composição química dos óleos de *C. multijuga* revelou uma proporção elevada de sesquiterpenos (92,28% a 97,76%), estando de acordo com os resultados já encontrados para *C. multijuga* por Cascon & Gilbert (2000), Medeiros (2006), Barbosa (2007) e Veiga-Junior *et al.* (2007).

Os compostos α -copaeno, α -humuleno, α -amorfeno, β -cariofileno, ácido copálico e o ácido pinifólico foram detectados nas oito amostras analisadas. Mas o óxido de cariofileno presente em todas as amostras da primeira e segunda coleta, só esteve presente em cinco amostras das oito amostras da terceira coleta.

O β -cariofileno foi novamente detectado como o sesquiterpeno majoritário em seis amostras (M02-C3, M16-C3, M20-C3, M29-C3, M30-C3 e M35-C3) das oito amostras analisadas. Seus teores variaram de 6,11% a 52,35%, como já fora descrito anteriormente para amostras de *C. multijuga* (CASCON & GILBERT, 2000; LIMA *et al.*, 2003; BARBOSA, 2007; SANT'ANNA *et al.*, 2007; VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2007; ROMERO, 2007). Sendo o constituinte secundário nas duas amostras restantes (M23-C3 e M27-C3).

Já o óxido de cariofileno, foi detectado como o constituinte majoritário em duas amostras (M23-C3 e M27-C3) das cinco amostras em que foi detectado. Seus teores variaram de 0,20% a 49,50%, como também já fora descrito para amostras de *C. multijuga* (CASCON & GILBERT, 2000; BARBOSA, 2007; ROMERO, 2007).

Tabela 7. Percentual relativo dos constituintes dos óleos-resina de *Copaifera multijuga* Hayne coletados em novembro de 2005 (3ª coleta - época seca).

COMPOSTO	IR	M02-C3	M16-C3	M20-C3	M23-C3	M27-C3	M29-C3	M30-C3	M35-C3
δ-elemeno	1335	-	-	-	-	-	-	1,45	1,54
α-cubebeno	1345	0,31	0,54	0,62	0,71	-	0,28	1,04	0,20
α-ilangeno	1373	-	-	-	-	-	-	0,28	0,35
α-copaeno	1374	3,65	5,62	8,11	13,61	7,37	3,97	17,42	2,74
β-elemeno	1389	1,08	-	-	-	1,13	1,24	3,95	3,37
α-gurjuneno	1409	-	-	0,27	-	-	-	-	0,23
β-cariofileno	1417	52,35	35,06	28,21	6,11	10,86	43,55	23,49	37,38
trans-α-bergamoteno	1432	0,18	1,93	3,13	24,13	5,64	-	-	-
γ-elemeno	1434	-	-	-	-	-	-	1,79	2,14
α-humuleno	1452	7,35	4,76	4,21	1,61	2,49	6,12	3,35	5,27
α-curcumeno	1479	-	-	-	1,08	0,25	-	-	-
α-amorfeno	1483	2,69	3,36	4,03	2,09	1,81	2,97	2,07	2,32
germacreno D	1484	10,81	27,29	13,26	-	0,36	19,46	11,17	11,82
β-selineno	1489	-	-	-	-	-	0,17	0,50	0,74
α-muuroleno	1500	2,21	-	2,87	0,63	0,38	3,10	1,78	1,86
biciclogermacreno	1500	-	3,48	-	-	-	-	-	-
γ-cadineno	1513	0,63	0,80	1,27	-	-	0,90	0,72	0,85
δ-cadineno	1522	3,04	2,94	5,01	-	-	3,22	5,22	3,09
trans-cadina-1,4-dieno	1533	-	-	0,30	-	-	0,11	0,20	0,21
selina-3,7(11)-dieno	1545	-	-	-	-	-	-	0,57	0,98
germacreno B	1559	-	-	-	-	-	-	7,73	8,07
palustrol	1567	-	-	-	0,37	-	-	0,16	-
óxido de cariofileno	1582	1,28	-	-	24,29	49,50	0,79	-	0,20
globulol	1590	0,14	-	0,07	-	-	0,25	-	-
viridiflorol	1592	0,36	-	0,28	-	-	0,48	-	-
rosifoliol	1600	-	-	0,16	-	-	-	-	-
ledol	1602	0,22	-	0,18	3,97	0,20	0,36	0,14	-
torreyol	1644	1,25	1,16	-	1,08	1,63	1,26	-	-
α-cadinol	1652	1,85	-	1,80	1,04	0,73	2,69	1,77	2,30
ácido copálico		1,73	3,23	1,67	1,30	2,55	0,80	3,05	1,68
ácido 3β-hidróxi-copálico		0,57	1,00	0,30	-	0,32	0,45	0,19	0,53
ácido 3β-acetóxi-copálico		0,37	0,54	0,35	-	-	0,36	0,47	0,48
ácido pinifólico		2,75	2,88	0,66	0,94	0,70	1,14	3,55	2,12
TOTAL		94,82	94,59	76,76	82,96	85,92	93,67	92,06	90,47

*Composto majoritário

*Detectado com teor superior a 10,00%

*Detectado com teor inferior a 1,00%

O *trans- α* -bergamoteno detectado em apenas cinco amostras das oito amostras analisadas, não se apresentou como constituinte majoritário em nenhuma das amostras. Seus teores variaram entre 0,18% e 24,13%. Sendo o constituinte secundário em uma única amostra (M23-C3) com teor de 24,13%, na qual apresentou teor semelhante ao do constituinte majoritário desta amostra, o óxido de cariofileno (24,29%).

O germacreno D foi detectado em sete amostras das oito amostras analisadas. Seus teores variaram de 0,36% a 27,29%, mas este sesquiterpeno não se apresentou como constituinte majoritário em nenhuma das amostras. Sendo o constituinte secundário em cinco amostras (M02-C3, M16-C3, M20-C3, M29-C3 e M35-C3) e o constituinte terciário em uma única amostra (M30-C3). Nas sete amostras em que foi detectado o germacreno D ocorreu simultaneamente com o δ -cadineno, como já fora descrito por BÜLOW & KÖNIG, (2000) e apenas uma continha δ -cadineno na ausência do germacreno D.

Entre os diterpenos identificados, o ácido copálico e o ácido pinifólico foram novamente os diterpenos majoritários em quatro amostras cada. Os teores do ácido copálico variaram entre 0,80% e 3,23%. Os teores de ácido pinifólico variaram entre 0,66% e 3,55%. O ácidos diterpênicos 3 β -hidróxi-copálico e 3 β -acetóxi-copálico foram detectados simultaneamente em seis amostras (M02-C3, M16-C3, M20-C3, M29-C3, M30-C3 e M35-C3) das oito amostras analisadas. Das duas amostras restantes, o ácido 3 β -hidróxi-copálico foi detectado em uma amostra (M27-C3) e a amostra M23-C3 não apresentou nem o ácido 3 β -hidróxi-copálico e nem o ácido 3 β -acetóxi-copálico.

Novamente, os teores dos constituintes identificados nas amostras (resultados das análises cromatográficas) de óleo-resina de copaíba constituem um conjunto de dados multivariados que foram submetidos às análises de HCA e PCA, para a classificação das oito amostras da terceira coleta. O pré-processamento dos dados foi realizado por normalização

por log com o objetivo de reduzir a influência de variações indesejadas presentes no conjunto de dados.

Com base nos teores de cada composto presente, determinados por CG-DIC e CG-EM, construiu-se uma matriz de dados (8 linhas x 35 colunas): sendo as 8 linhas correspondentes às amostras e 35 colunas correspondentes aos teores dos constituintes identificados nas amostras. A similaridade entre as amostras foi novamente calculada a partir da distância Euclidiana no espaço das variáveis, usando o método Ward.

O resultado da HCA está representado no dendrograma (Figura 21), através do qual pode-se observar o agrupamento entre as amostras em dois clusters (grupos) distintos, classificando as oito amostras da terceira coleta.

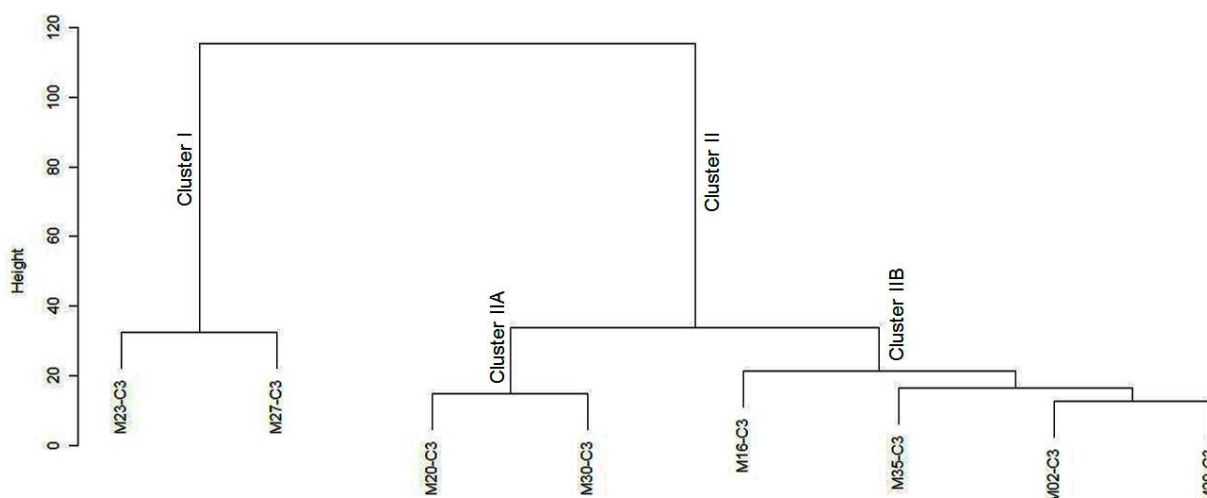


Figura 21. Dendrograma correspondente à classificação das oito amostras de óleos-resina de copaíba (*C. multijuga*), coletadas em novembro de 2005 (3ª coleta).

As duas amostras do cluster I (M23-C3 e M27-C3) apresentaram o óxido de cariofileno como constituinte majoritário.

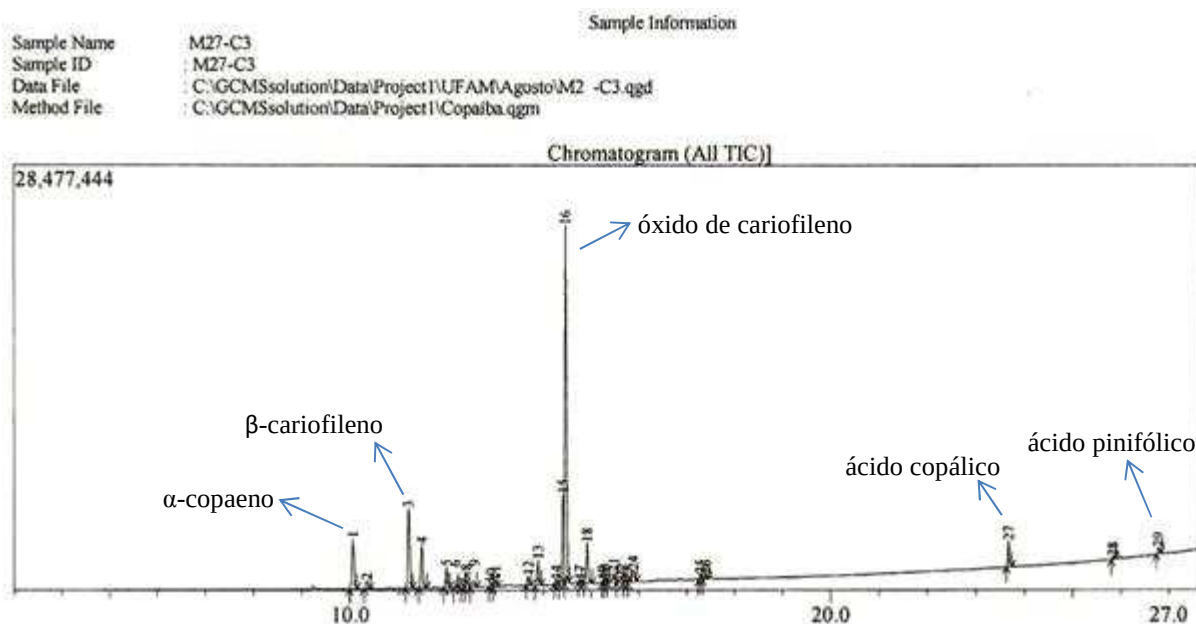


Figura 22. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster I, referente as amostras da 3ª coleta (novembro de 2005).

Todas as amostras do cluster II apresentaram o β -cariofileno como constituinte majoritário, mesmo assim este grupo foi subdividido em dois sub-clusters. O sub-cluster IIA inclui duas amostras (M20-C3 e M30-C3) que apresentaram o β -cariofileno como constituinte majoritário, com teores variando entre 23,49% e 28,21%.

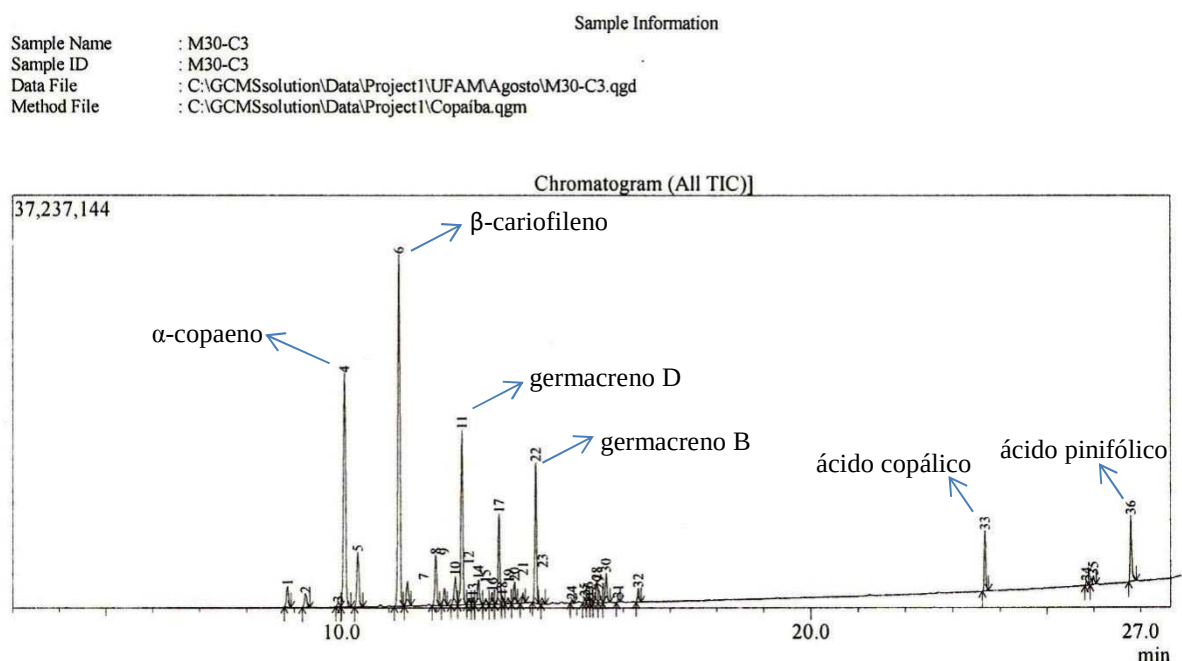


Figura 23. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IIA, referente as amostras da 3ª coleta (novembro de 2005).

No sub-cluster IIB, que inclui quatro amostras (M02-C3, M16-C3, M29-C3 e M35-C3) que também apresentaram o β -cariofileno como constituinte majoritário, mas neste caso seus teores variaram entre 35,06% e 52,35%.

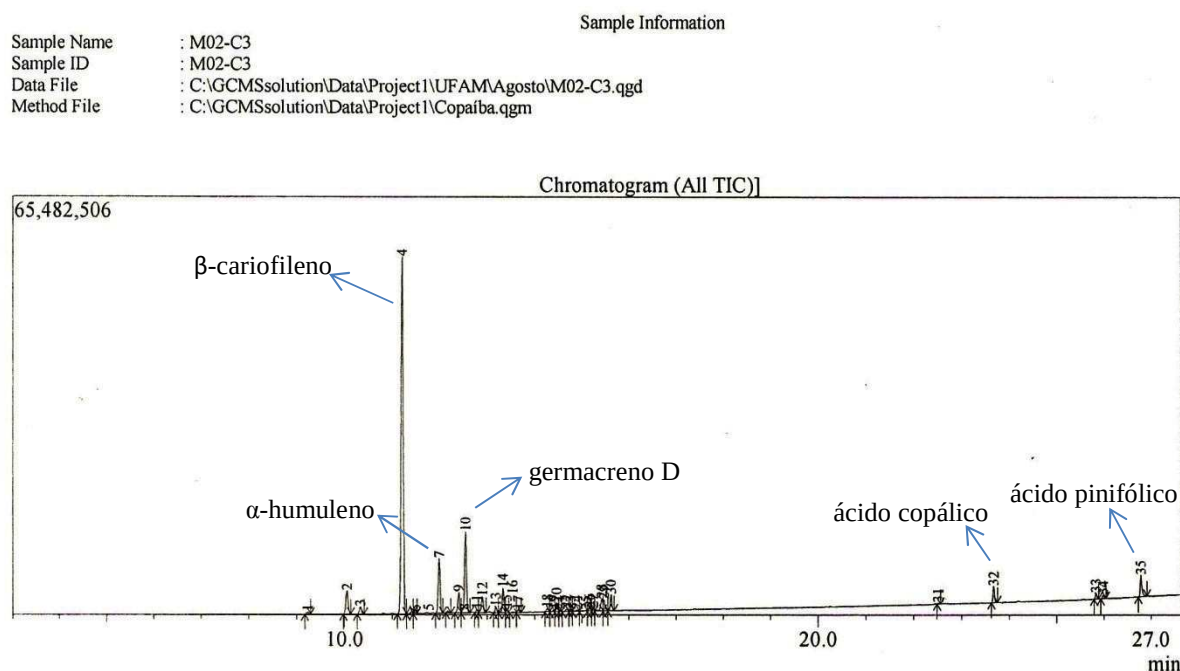


Figura 24. Cromatograma representativo das amostras do sub-cluster IIB, referente as amostras da 3ª coleta (novembro de 2005).

A análise dos componentes principais (PCA) foi realizada através das combinações lineares das quatro variáveis originais selecionadas: β -cariofileno, óxido de cariofileno, ácido copálico e ácido pinifólico, para as doze amostras analisadas. Estas variáveis foram novamente selecionadas devido à sua importância e frequência nas frações sesquiterpênica e diterpênica. O arranjo matricial para a análise de componentes principais consistiu de 8 linhas, correspondentes às amostras e 4 colunas, correspondentes às variáveis selecionadas. A PCA mostrou a distribuição das amostras e a importância das variáveis. O resultado da PCA foi representado na forma de gráficos de *scores* e de *loading* (Figuras 25a e 25b, respectivamente), isto é, os gráficos da distribuição das amostras em função da importância das variáveis.

Na Figura 25a é apresentado o gráfico dos *escores* de Dim 1 (com 53,89% da variância) *versus* Dim 2 (com 35,64% da variância), representando 89,53% das informações totais. Nesta figura é possível notar que Dim 1 separa os óleos com maiores teores de β -cariofileno, em valores de *escores* positivos, dos óleos com maiores teores de óxido de cariofileno, em valores de *escores* negativos. Enquanto é possível notar que Dim 2 separa os óleos com maiores teores de ácido copálico e ácido pinifólico, em valores de *escores* positivos, dos óleos com menores teores de ácido copálico e ácido pinifólico, em valores de *escores* negativos.

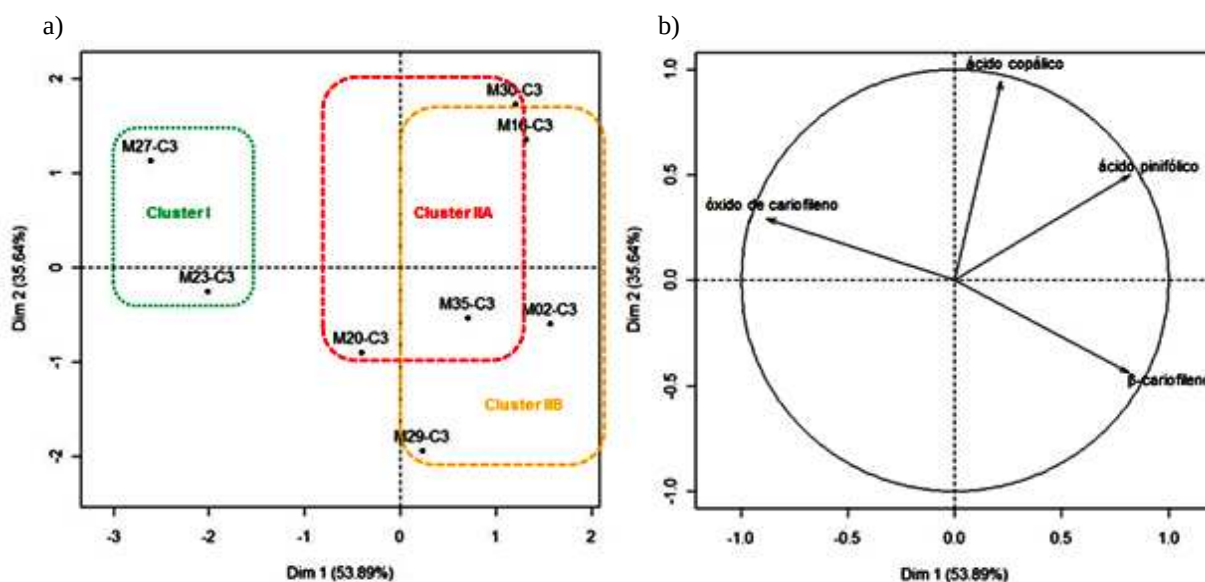


Figura 25. Gráficos de a) *scores* e b) *loadings* para Dim 1 versus Dim 2, correspondente à classificação das oito amostras de óleos-resina de copaíba (*C. multijuga*), coletadas em novembro de 2005 (3ª coleta).

Uma inspeção no gráfico dos *loadings*, Figura 25b, confirma que a separação entre as amostras em Dim 1 é determinada, essencialmente, pelos parâmetros de β -cariofileno (com *loadings* positivos) e óxido de cariofileno (com *loadings* negativos). Assim, por exemplo, os óleos com maiores teores de β -cariofileno encontram-se mais à direita no gráfico dos *escores* (Figura 25a), enquanto os óleos com maiores teores de óxido de cariofileno encontram-se mais à esquerda no gráfico dos *escores* (Figura 25a). Enquanto Dim 2 mostra que a separação

entre as amostras é determinada, essencialmente, pelos parâmetros de ácido copálico e ácido pinifólico. As amostras com maiores teores de ácido copálico e ácido pinifólico (com *loadings* positivos) se separam das amostras com menores teores de ácido copálico e ácido pinifólico (com *loadings* negativos). Assim, por exemplo, os óleos com maiores teores de ácido copálico e ácido pinifólico encontram-se nos quadrantes superiores do gráfico dos *escores* (Figura 25a), enquanto os óleos com menores teores de ácido copálico e ácido pinifólico encontram-se quadrantes inferiores no gráfico dos *escores* (Figura 25a).

Também é possível perceber no gráfico de *loadings* a diferença entre a amostra M23-C3 e M27-C3: ambas possuem o óxido de cariofileno como constituinte majoritário, no entanto a amostra M27-C3 aparece em Dim 2 com *loadings* positivos enquanto a amostra M23-C3 aparece em Dim 2 com *loadings* negativos, isso porque o teor de óxido de cariofileno em M27-C3 é correspondente ao dobro do teor desse sesquiterpeno em M23-C3.

Novamente foram observadas diferenças quantitativas e qualitativas nos perfis cromatográficos (CASCON & GILBERT, 2000; VEIGA-JUNIOR & PINTO 2002; ZOGHBI *et al.*, 2009; HERRERO-JÁUREGUI *et al.*, 2011). A quantidade de sesquiterpenos detectados variou entre dezessete e quarenta e dois sesquiterpenos; enquanto o número de diterpenos detectados ficou entre dois e sete diterpenos.

5.2.4. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DAS TRÊS COLETAS

A fim de comparar o padrão de distribuição de todas as amostras com a distribuição das amostras por coleta, foram realizadas novas análises de HCA e PCA. Os teores dos constituintes identificados nas amostras (resultados das análises cromatográficas) de óleo-resina de copaíba constituem um conjunto de dados multivariados que foram novamente

submetidos às análises de HCA e PCA, para a classificação das quarenta e três. O pré-processamento dos dados foi realizado por normalização por log com o objetivo de reduzir a influência de variações indesejadas presentes no conjunto de dados.

Com base nos teores de cada composto presente, determinados por CG-DIC e CG-EM, construiu-se uma matriz de dados (43 linhas x 35 colunas): sendo as 43 linhas correspondentes às amostras e 35 colunas correspondentes aos teores dos constituintes identificados nas amostras. A similaridade entre as amostras foi calculada a partir da distância Euclidiana no espaço das variáveis, usando o método Ward. A HCA foi realizada com a finalidade de verificar semelhanças na composição química entre as amostras analisadas.

O resultado da HCA está representado no dendograma (Figura 26, na página 87), através do qual pode-se observar o agrupamento entre as amostras em dois clusters (grupos) distintos, classificando as quarenta e três amostras.

O cluster I, foi dividido em dois sub-clusters. O sub-cluster IA inclui quatro amostras (M23-C3, M43-C1, M43-C2 e M44-C1) das quarenta e três amostras analisadas. As amostras M23-C3 e M43-C2, que possuem o óxido de cariofileno como constituinte majoritário e as amostras M43-C1 e M44-C1, que possuem o *trans*- α -bergamoteno como constituinte majoritário. O teor de óxido de cariofileno nas amostras deste cluster varia entre 9,51% a 24,29%. Enquanto os teores de *trans*- α -bergamoteno varia entre 20,93% e 32,78%. Embora as amostras M23-C3 e M43-C2 possuam o óxido de cariofileno como constituinte majoritário, os teores de *trans*- α -bergamoteno nessas duas amostras (24,13% e 19,77%, respectivamente) se comparam aos teores de *trans*- α -bergamoteno nas amostras M43-C1 e M44-C1 (20,93% e 32,78%, respectivamente), o que caracteriza a semelhança entre elas e parece ser o fator que as reúne em um mesmo cluster.

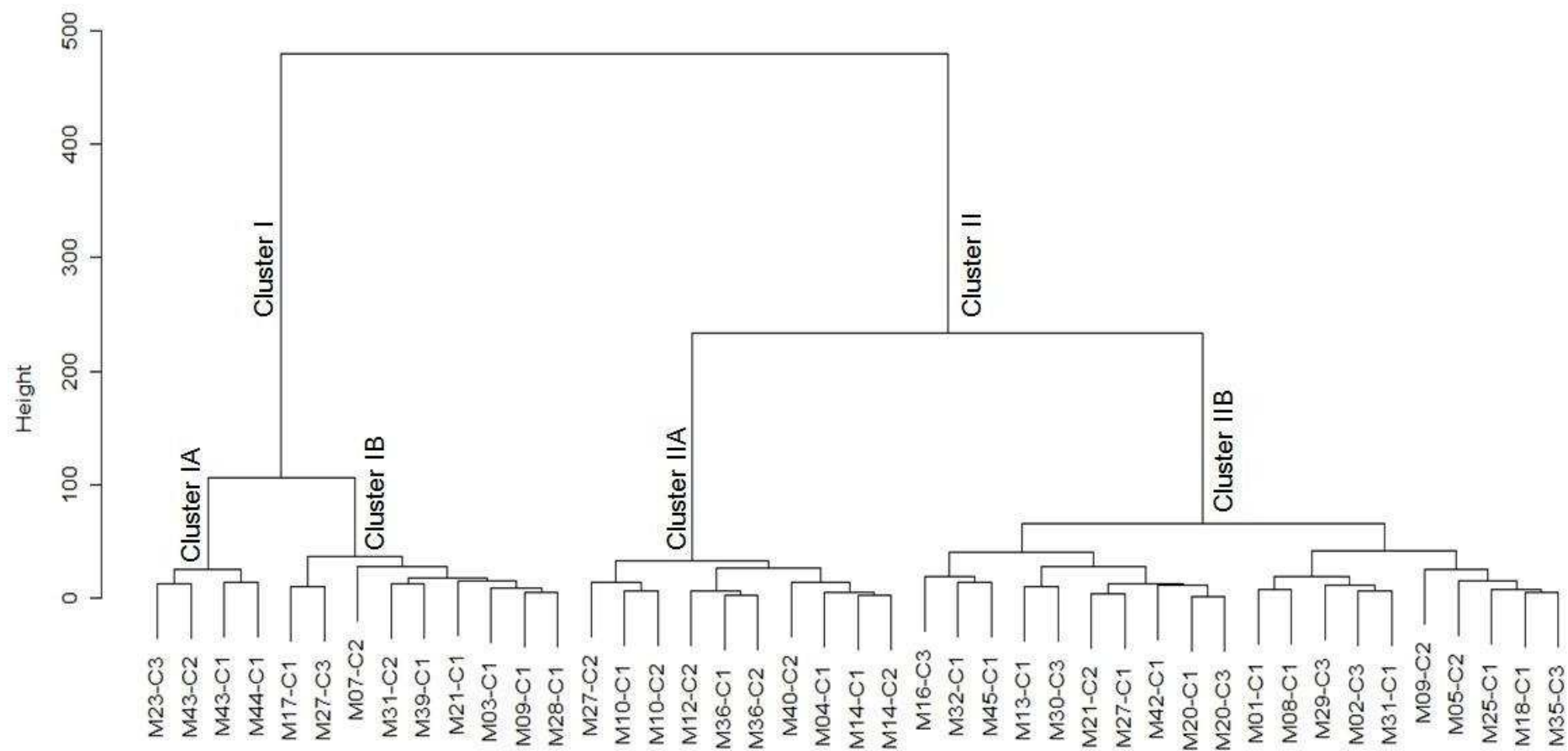


Figura 26. Dendrograma correspondente à classificação das quarenta e três amostras de óleos-resina de copaíba (*C. multijuga*).

No sub-cluster IB, que inclui nove amostras (M03-C1, M07-C2, M09-C1, M17-C1, M21-C1, M27-C3, M28-C1, M31-C2 e M39-C1) das quarenta e três amostras analisadas, que possuem o óxido de cariofileno como constituinte majoritário. O teor de óxido de cariofileno nas amostras deste cluster varia entre 24,91% e 49,50%, o que caracteriza a semelhança entre elas e parece ser o fator que as reúne em um mesmo cluster.

O cluster II, foi dividido em dois sub-clusters: o sub-cluster IIA que inclui dez amostras (M03-C1, M07-C2, M09-C1, M17-C1, M21-C1, M27-C3, M28-C1, M31-C2 e M39-C1) das quarenta e três amostras analisadas, que possuem o β -cariofileno como consituinte majoritário. O teor de β -cariofileno nesse cluster variou entre 50,41% e 67,94%. Enquanto o sub-cluster IIB inclui as vinte amostras restantes (M01-C1, M02-C3, M05-C2, M08-C1, M09-C2, M13-C1, M16-C3, M18-C1, M20-C1, M20-C3, M25-C1, M21-C2, M27-C1, M29-C3, M30-C3, M31-C1, M32-C1, M35-C3, M42-C1 e M45-C1). Todas, exceto a amostra M45-C1, possuem o β -cariofileno como constituinte majoritário, com teores que variaram entre 18,91% e 52,35%. A amostra M45-C1, apesar de apresentar o germacreno D como constituinte majoritário (29,23%), possui teor de β -cariofileno (25,88%) comparável aos teores de β -cariofileno das outras amostras no mesmo cluster, o que caracteriza a semelhança entre elas e parece ser o fator que as reúne em um mesmo cluster.

A análise dos componentes principais (PCA) foi realizada através das combinações lineares das quatro variáveis originais selecionadas: β -cariofileno, óxido de cariofileno, ácido copálico e ácido pinifólico, para as quarenta e três amostras analisadas. Estas variáveis foram novamente selecionadas devido à sua importância e frequência nas frações sesquiterpênica e diterpênica. O arranjo matricial para a análise de componentes principais consistiu de 43 linhas, correspondentes às amostras e 4 colunas, correspondentes às variáveis selecionadas. A PCA mostrou a distribuição das amostras e a importância das variáveis. O resultado da PCA foi representado na forma de gráficos de *scores* e de *loading* (Figuras 27a e 27b,

respectivamente), isto é, os gráficos da distribuição das amostras em função da importância das variáveis.

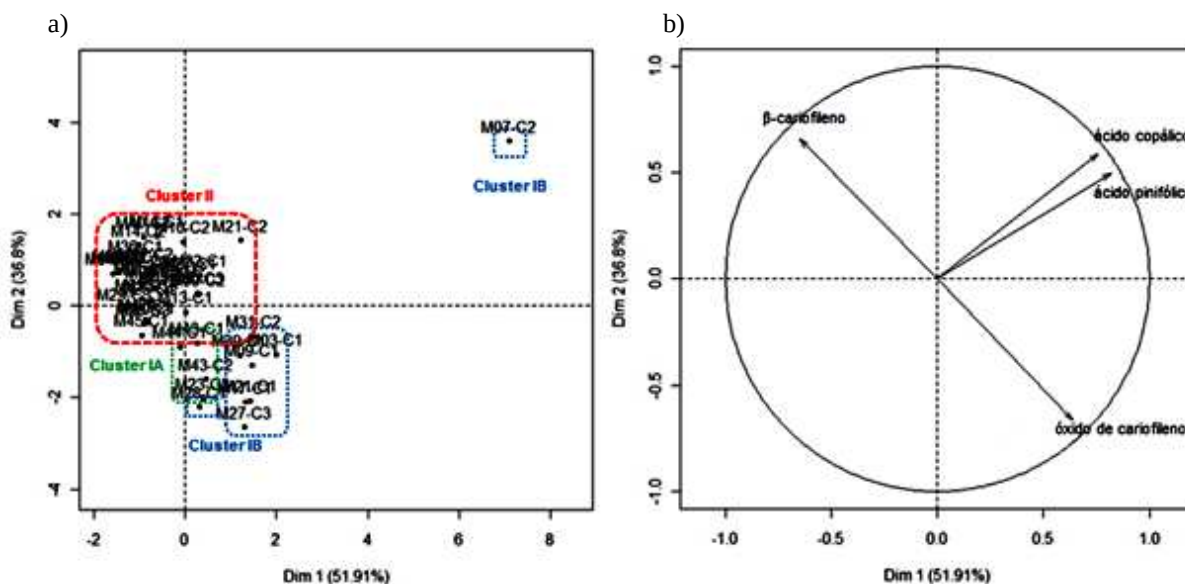


Figura 27. Gráficos de a) *scores* e b) *loadings* para Dim 1 versus Dim 2, correspondente à classificação das quarenta e três amostras de óleos-resina de copaíba (*C. multijuga*).

Na Figura 27a é apresentado o gráfico dos *escores* de Dim 1 (com 51,91% da variância) *versus* Dim 2 (com 36,80% da variância), representando 88,71% das informações totais. Nesta figura é possível notar que Dim 1 separa os óleos com maiores teores de β -cariofileno, em valores de *escores* negativos, dos óleos com maiores teores de óxido de cariofileno, em valores de *escores* positivos. Enquanto é possível notar que Dim 2 separa os óleos com maiores teores de ácido copálico e ácido pinifólico, em valores de *escores* positivos, dos óleos com menores teores de ácido copálico e ácido pinifólico, em valores de *escores* negativos.

Uma inspeção no gráfico dos *loadings*, Figura 27b, confirma que a separação entre as amostras em Dim 1 é determinada, essencialmente, pelos parâmetros de β -cariofileno (com *loadings* negativos) e óxido de cariofileno (com *loadings* positivos). Assim, por exemplo, os óleos com maiores teores de β -cariofileno encontram-se mais à esquerda no gráfico dos

escores (Figura 27a), enquanto os óleos com maiores teores de óxido de cariofileno encontram-se mais à direita no gráfico dos *escores* (Figura 27a). Enquanto Dim 2 mostra que a separação entre as amostras é determinada, essencialmente, pelos parâmetros de ácido copálico e ácido pinifólico. As amostras com maiores teores de ácido copálico e ácido pinifólico (com *loadings* positivos) se separam das amostras com menores teores de ácido copálico e ácido pinifólico (com *loadings* negativos). Assim, por exemplo, os óleos com maiores teores de ácido copálico e ácido pinifólico encontram-se nos quadrantes superiores do gráfico dos *escores* (Figura 27a), enquanto os óleos com menores teores de ácido copálico e ácido pinifólico encontram-se quadrantes inferiores no gráfico dos *escores* (Figura 27a). Também é possível confirmar no gráfico de *loadings* a diferença entre a amostra M07-C2 e as demais, justificada pelos altos teores dos ácidos copálico e pinifólico.

Assim, podemos afirmar que o padrão da composição química orgânica das amostras de *Copaifera multijuga*, coletadas na Reserva Ducke entre novembro de 2004 e novembro de 2005, caracterizam-se pela presença e abundância de β -cariofileno em 67,44% das amostras analisadas, enquanto seu óxido foi o constituinte majoritário em 25,58% das amostras, como já fora descrito para óleos dessa mesma espécie (CASCON & GILBERT, 2000; BARBOSA, 2007; ROMERO, 2007). E embora as frações sesquiterpênicas e diterpênicas tenham ocorrido em uma proporção similar em todos os óleos, foram confirmadas as diferenças quantitativas e qualitativas nos perfis (CASCON & GILBERT, 2000; VEIGA-JUNIOR & PINTO 2002; ZOGHBI *et al.*, 2009; HERRERO-JÁUREGUI *et al.*, 2011). No entanto, os fatores que as influenciam ainda é desconhecido. Sabe-se que a variação na produção e/ou acúmulo desses metabólitos secundários pode ser afetada por vários fatores como sazonalidade, disponibilidade hídrica, temperatura, ataque de patógenos, entre outros (LANGENHEIM *et al.*, 1986; CASCON & GILBERT, 2000; VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002; TAPPIN *et al.*, 2004; BIAVATTI *et al.*, 2006; MEDEIROS, 2006; BARBOSA, 2007).

5.3. AVALIAÇÃO DOS FATORES DE INFLUÊNCIA SOBRE A VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

5.3.1. SAZONALIDADE

Para o estudo da influência da sazonalidade foram consideradas apenas dezesseis amostras das quarenta e três amostras de óleo de copaíba analisadas, já que esse tipo de estudo deve ser conduzido a partir da comparação de amostras oriundas da mesma árvore. Das dezesseis amostras de copaíba, oito amostras foram coletadas em época seca (novembro de 2004) e oito amostras foram em época chuvosa (maio de 2005).

A proposta de identificação, a quantificação relativa e os respectivos índices de retenção (IR) para os constituintes químicos das dezesseis amostras de óleo-resina de *C. multijuga* Hayne são apresentados a seguir, na Tabela 8 (Página 92).

Foram identificados trinta e cinco constituintes, contabilizando entre 71,64 a 97,92% dos constituintes presentes nas amostras. Os compostos α -copaeno, α -humuleno, α -amorfeno, β -cariofileno, óxido de cariofileno, ácido copálico e o ácido pinifólico foram novamente detectados em todas as amostras analisadas.

O β -cariofileno foi novamente detectado como o sesquiterpeno majoritário em onze amostras das dezesseis amostras consideradas: cinco amostras coletadas em época seca (M10-C1, M14-C1, M27-C1, M31-C1, M36-C1) e seis amostras coletadas em época chuvosa (M09-C2, M10-C2, M14-C2, M21-C2, M27-C2 e M36-C2).

O óxido de cariofileno foi detectado como o sesquiterpeno majoritário em quatro amostras das dezesseis amostras consideradas: duas amostras coletadas em época seca (M09-C1 e M21-C1) e duas amostras coletadas em época chuvosa (M31-C2 e M43-C2). Enquanto o *trans*- α -bergamoteno, detectado em nove amostras das dezesseis amostras consideradas foi

Tabela 8. Percentual relativo dos constituintes dos óleos-resina das dezesseis amostras de *Copaifera multijuga* Hayne coletados em novembro de 2004 (época seca) e maio de 2005 (época chuvosa).

COMPOSTO	IR	M09-C1	M09-C2	M10-C1	M10-C2	M14-C1	M14-C2	M21-C1	M21-C2	M27-C1	M27-C2	M31-C1	M31-C2	M36-C1	M36-C2	M43-C1	M43-C2
δ-elemeno	1335	-	-	-	-	-	-	0,88	-	-	-	-	-	-	-	1,56	1,25
α-cubebeno	1345	0,75	0,87	0,99	0,97	0,96	0,93	-	0,68	0,73	0,82	0,56	-	0,22	-	-	-
α-ilangeno	1373	-	-	-	-	-	-	-	0,10	0,10	-	0,28	-	0,35	-	-	-
α-copaeno	1374	12,67	15,04	14,87	14,11	11,17	11,38	7,16	5,65	6,24	11,11	6,47	6,68	2,03	2,00	6,04	5,51
β-elemeno	1389	-	-	-	-	-	-	8,56	1,15	1,28	-	-	-	0,70	0,67	5,31	6,10
α-gurjuneno	1409	-	-	0,22	0,20	0,37	-	-	0,18	0,19	0,13	-	-	0,18	0,18	-	-
β-cariofileno	1417	13,14	34,99	55,46	50,41	61,53	64,04	5,08	29,82	32,41	52,66	47,48	20,79	60,10	60,58	16,00	7,58
trans-α-bergamoteno	1432	-	-	-	-	0,55	0,59	-	0,22	0,22	7,51	-	-	7,10	6,17	20,93	19,77
γ-elemeno	1434	-	-	-	-	-	-	1,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-humuleno	1452	2,73	5,29	7,74	7,05	8,25	8,56	1,37	4,27	4,56	-	6,80	4,00	8,70	8,89	3,09	1,99
allo-aromadendreno	1458	0,87	1,03	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-curcumeno	1479	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,23	-	-	0,78	1,10	0,61	0,62
α-amorfenos	1483	2,34	2,52	2,52	2,51	1,47	1,56	2,29	4,48	4,61	1,72	3,62	4,05	1,30	1,39	0,90	1,01
germacreno D	1484	-	3,12	1,72	1,58	1,30	1,45	-	15,86	16,65	2,21	13,13	-	-	1,13	-	-
β-selineno	1489	-	-	-	-	-	-	-	0,20	0,16	-	-	-	-	-	-	0,31
α-muroleno	1500	0,77	1,00	1,35	1,29	0,81	0,81	1,50	3,17	3,30	0,89	2,60	0,77	0,43	0,44	0,59	0,85
biciclogermacreno	1500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ-cadineno	1513	0,61	-	0,14	0,14	0,22	0,16	-	1,57	1,69	0,37	-	0,89	-	-	0,51	-
δ-cadineno	1522	-	1,69	3,71	3,56	2,57	2,59	-	5,01	5,39	2,77	2,26	-	0,68	0,82	0,72	-
trans-cadina-1,4-dieno	1533	-	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-
selina-3,7(11)-dieno	1545	-	-	0,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
germacreno B	1559	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,84	0,52
palustrol	1567	-	-	0,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
spatuleno	1577	1,19	1,19	-	-	-	-	-	-	-	-	0,81	2,09	-	-	-	-
óxido de cariofileno	1582	31,52	10,01	0,33	0,93	0,41	0,20	36,43	0,28	0,60	0,54	0,57	29,15	1,28	0,38	11,72	19,91
globulol	1590	-	0,12	-	0,10	-	-	-	0,22	0,22	-	-	-	-	-	-	-
viridiflorol	1592	-	-	-	0,41	-	-	-	0,38	0,41	-	-	-	-	-	-	-
rosifoliol	1600	-	-	-	-	-	-	-	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-
ledol	1602	-	1,70	0,29	0,39	-	-	-	0,21	0,36	0,19	0,70	4,26	0,24	0,21	1,92	3,48
torreyol	1644	1,51	1,58	1,93	1,93	0,48	0,28	-	1,61	1,57	-	1,63	2,42	-	0,70	0,70	1,33
α-cadinol	1652	1,46	1,45	0,52	0,50	0,29	-	2,27	2,10	2,29	0,18	0,72	0,96	-	0,16	1,64	1,59
ácido copálico		3,10	3,42	2,78	5,66	5,17	4,30	1,66	7,09	4,28	2,89	2,52	4,87	3,31	2,46	2,92	2,48
ácido 3β-hidróxi-copálico		0,18	0,51	0,17	1,07	-	-	-	0,97	0,31	0,24	0,41	1,44	0,52	0,29	2,16	1,15
ácido 3β-acetóxi-copálico		-	0,51	0,22	0,70	-	-	-	0,95	0,55	0,37	0,18	-	0,32	0,20	0,30	0,26
ácido pinifólico		3,31	3,16	1,29	2,47	1,81	1,31	3,04	4,22	2,55	2,04	1,48	2,92	1,45	1,03	1,50	0,77
TOTAL		76,15	89,20	97,92	95,98	97,36	98,16	71,64	90,67	90,67	86,87	92,22	85,29	89,69	88,80	81,96	76,48

*Composto majoritário

*Detectado com teor superior a 10,00%

*Detectado com teor inferior a 1,00%

detectado como constituinte majoritário em uma única amostra (M43-C1) coletada em época seca.

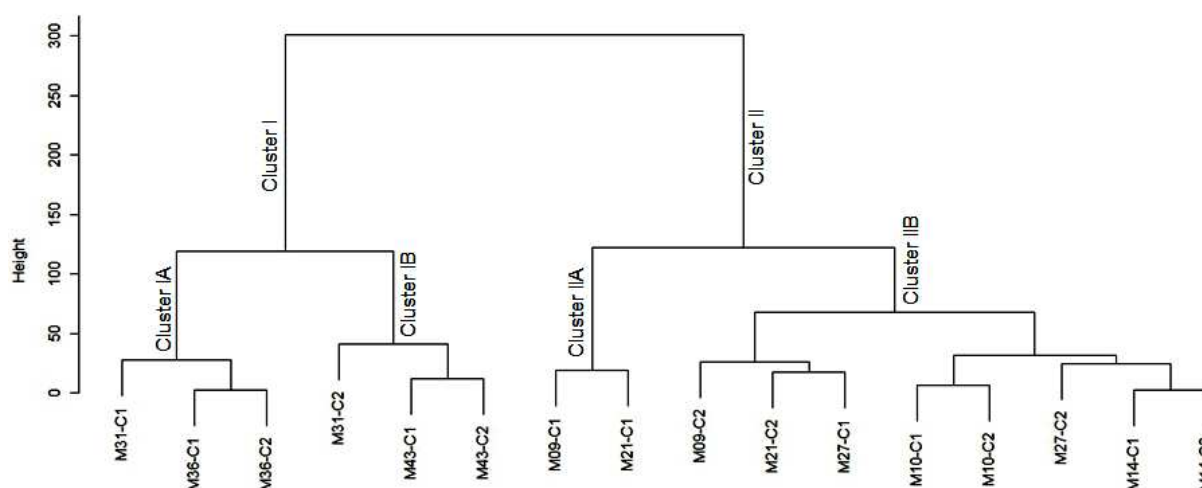
Embora nem todos os constituintes das amostras tenham sido identificados, devido principalmente à falta de espectros de massas na literatura para comparação com os constituintes da fração de sesquiterpenos oxigenados desses óleos, não foram observadas relações entre aumento/diminuição ou ausência/presença dos teores dos constituintes majoritários ou de quaisquer outros constituintes com a época de coleta. Já que a proporção de amostras com β -cariofileno e seu óxido como constituinte majoritário em ambas as épocas de coleta foi equivalente. Mesmo assim a análise dos perfis cromatográficos desses óleos-resina revelou a existência de variações quantitativas e qualitativas, que foi avaliada por HCA e PCA.

Desta vez, os teores dos constituintes identificados nas amostras (resultados das análises cromatográficas) de óleo-resina de copaíba, os dados de DAP e os teores de argila (tipo de solo) constituem o conjunto de dados multivariados que foram submetidos às análises de HCA e PCA, para a classificação das dezesseis amostras. Novamente, o pré-processamento dos dados foi realizado por normalização por log com o objetivo de reduzir a influência de variações indesejadas presentes no conjunto de dados.

Com os valores obtidos, construiu-se uma matriz de dados (16 linhas x 37 colunas): sendo as 16 linhas correspondentes às amostras; 35 colunas correspondentes aos teores dos constituintes identificados nas amostras, uma coluna correspondente aos dados de DAP's e uma coluna correspondente aos teores de argila (que classificam os tipos de solo). A similaridade entre as amostras foi novamente calculada a partir da distância Euclidiana no espaço das variáveis, usando o método Ward.

O resultado da HCA está representado no dendograma (Figura 28, na página 94), através do qual pode-se observar o agrupamento entre as amostras em dois clusters (grupos)

distintos, classificando as dezesseis amostras. Observa-se que os clusters I e II correspondem às árvores localizadas em solos arenosos e argilosos, respectivamente, que revelaram diferentes perfis cromatográficos.



Figurae 28. Dendrograma correspondente à classificação das dezesseis amostras de óleos-resina de copaíba (*C. multijuga*), coletadas em novembro de 2004 (1ª coleta) e maio de 2005 (2ª coleta).

O Cluster I foi dividido em dois sub-clusters. O Cluster IA inclui três amostras: duas amostras coletadas no período seco (M31-C1 e M36-C1) e uma amostra coletada no período chuvoso (M36-C2) que apresentaram o β -cariofileno como componente majoritário e teve seu teor variando entre 47,48% e 60,58%. No Cluster IB, que também inclui três amostras: uma amostra coletada no período seco (M43-C1) que teve o *trans*- α -bergamoteno como constituinte majoritário (20,93%) e duas amostras coletadas no período chuvoso (M31-C2 e M43-C2), nas quais o óxido de cariofileno foi o constituinte majoritário e teve seu teor variando entre 19,91% e 29,15%.

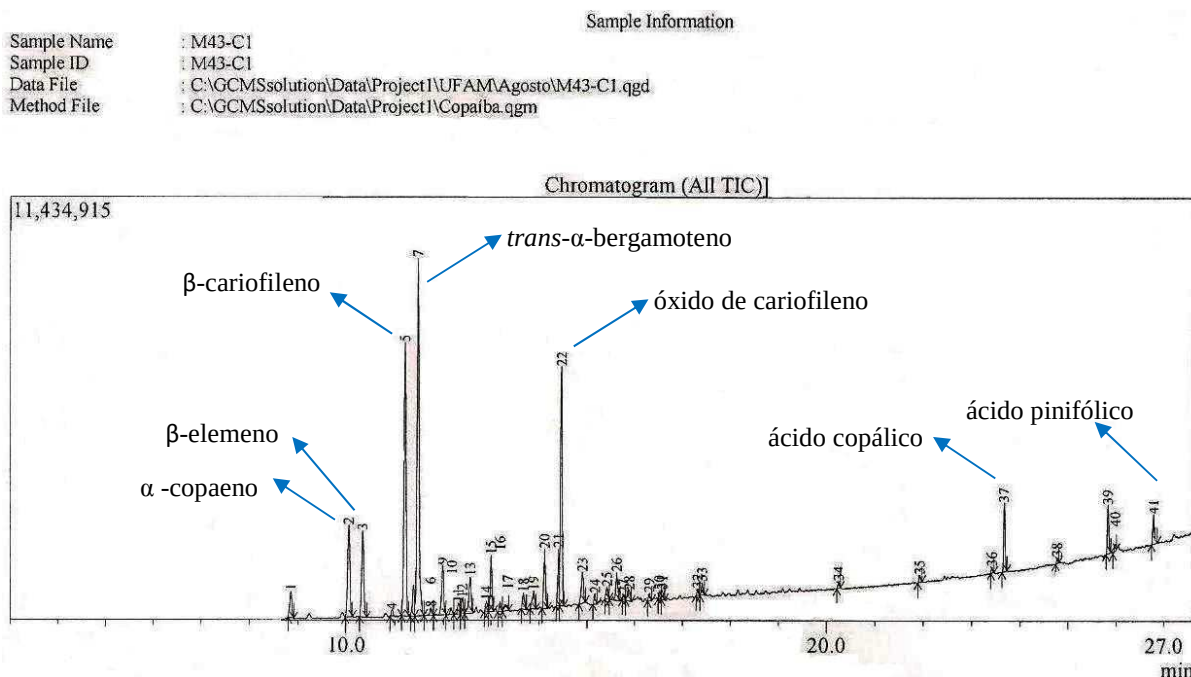


Figura 29. Perfil cromatográfico das amostras do cluster I, localizadas em solos arenosos.

O Cluster II foi subdividido em dois sub-clusters, IIA e IIB. O Cluster IIA inclui duas amostras coletadas no período seco (M09-C1 e M21-C1), que apresentaram o óxido de cariofileno como constituinte majoritário, com teores variando entre 31,52 e 36,43%. O cluster IIB, inclui oito amostras: três amostras coletadas no período seco (M10-C12, M14-C1 e M27-C1) e cinco amostras coletadas no período chuvoso (M09-C2, M10-C2, M14-C2, M21-C2 e M27-C2) que apresentaram o β-cariofileno como componente majoritário, com teor variando entre 29,82 e 64,04%.

Observou-se que os clusters I e II correspondem às amostras provenientes de árvores localizadas em solos arenosos e argilosos, respectivamente. De modo geral, as amostras do Cluster I, de solos arenosos (Figura 29) apresentaram maiores variações quantitativas e qualitativas nos perfis cromatográficos (perfis cromatográficos mais complexos), quando comparados às amostras do Cluster II, de solos argilosos (Figura 30). Segundo Jazen (2004), os solos arenosos, pobres em nutrientes, proporcionam uma maior produção de metabólitos secundários em comparação com solos argilosos, que são mais ricos em nutrientes.

Sugerindo, portanto, uma possível influência do tipo de solo onde as árvores se desenvolveram sobre a composição química desses óleos.

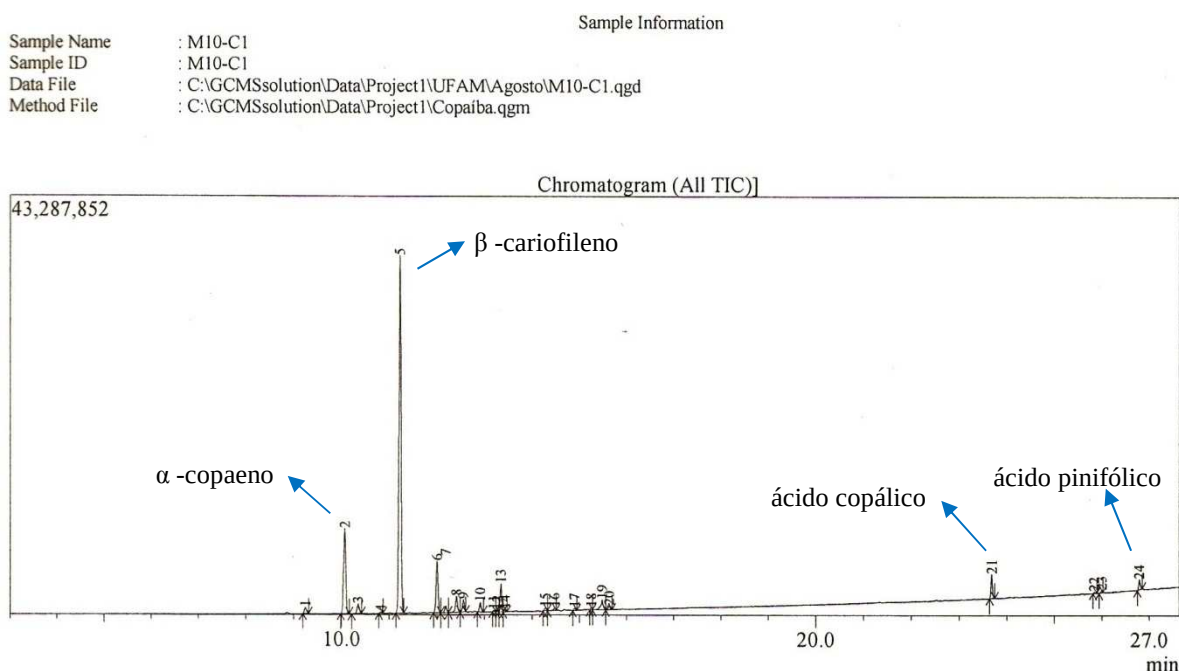


Figura 30. Perfil cromatográfico das amostras do Cluster II, localizadas em solos argilosos.

Quanto à fração diterpênica, no cluster I foram detectados de quatro a oito substâncias, tendo sido identificados apenas quatro diterpenos (4,51% a 9,75% da composição química). No cluster II, foram detectados de dois a cinco substâncias, tendo sido identificados apenas quatro diterpenos (4,46 a 13,92%). Em ambos os grupos os ácidos copálico e pinifólico, detectados em todas as amostras analisadas, foram os diterpenos majoritários na fração diterpênica.

Para a PCA foi realizada combinações lineares das cinco variáveis selecionadas: β-cariofileno, óxido de cariofileno, ácido copálico, ácido pinifólico e do teor de argila, já que o mesmo se mostrou relevante na HCA. Foram então obtidos os gráficos de *scores* e de *loading* (Figuras 31a e 31b, na página 97), isto é, os gráficos da distribuição das amostras em função da importância das variáveis.

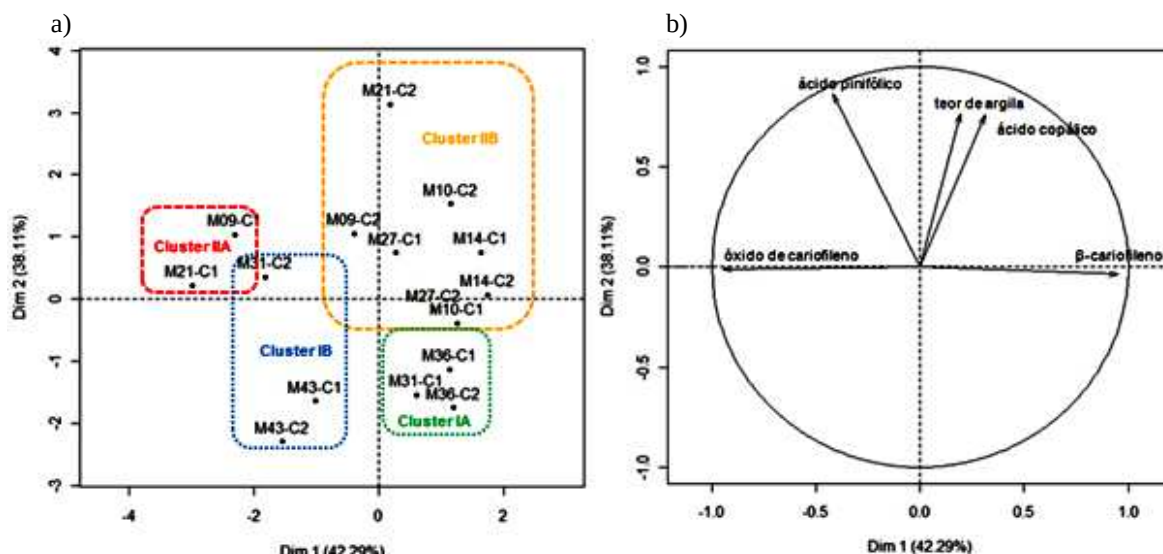


Figura 31. Gráficos de a) *scores* e b) *loadings* para Dim 1 versus Dim 2, correspondente à classificação das dezesseis amostras de óleos-resina de copaíba (*C. multijuga*), coletadas em novembro de 2004 (1ª coleta) e maio de 2005 (2ª coleta).

Na Figura 31a é apresentado o gráfico dos *escores* de Dim 1 (com 42,29% da variância) *versus* Dim 2 (com 38,11% da variância), representando 80,40% das informações totais. Nesta figura é possível notar que Dim 1 separa os óleos com maiores teores de óxido de cariofileno, em valores de *escores* negativos dos óleos com maiores teores de β-cariofileno, em valores de *escores* positivos. Enquanto o Dim 2 separa os óleos provenientes de árvores localizadas em solos arenosos, em valores de *scores* negativos, dos óleos provenientes de árvores localizadas em solos argilosos, em valores de *scores* positivos.

A inspeção no gráfico dos *loadings* (Figura 31b) mostra que a separação entre as amostras em PC1 é determinada, essencialmente, pelos parâmetros de óxido de cariofileno (com *loadings* negativos) e β-cariofileno (com *loadings* positivos). Assim, os óleos com maiores teores de óxido de cariofileno encontram-se mais à esquerda no gráfico dos *scores* (Figura 31a), enquanto os óleos com maiores teores de β-cariofileno encontram-se mais à direita. Enquanto Dim 2 mostra que a separação entre as amostras é determinada, essencialmente, pelos parâmetros de ácido copálico e ácido pinifólico. As amostras com maiores teores de ácido copálico e ácido pinifólico (com *loadings* positivos) se separam das

amostras com menores teores de ácido copálico e ácido pinifólico (com *loadings* negativos). Assim, por exemplo, os óleos com maiores teores de ácido copálico e ácido pinifólico encontram-se nos quadrantes superiores do gráfico dos *escores* (Figura 31a), enquanto os óleos com menores teores de ácido copálico e ácido pinifólico encontram-se quadrantes inferiores no gráfico dos *escores* (Figura 31a).

Embora tenha sido observada variações quantitativas e qualitativas entre as amostras, a fração sesquiterpênica esteve entre 84,83% e 95,54% da composição desses óleos, como já descrito por Cascon & Gilbert (2000), Medeiros (2006), Barbosa (2007) e Romero (2007) para a mesma espécie. Vale destacar que importantes variações nos teores dos constituintes principais foram encontradas, principalmente para β -cariofileno (5,08% a 64,04%) que teve o maior percentual em um óleo de copaíba coletado em maio/2005 de uma árvore localizada solo argiloso. O óxido de cariofileno que teve o maior percentual em novembro/2004 (amostra de árvore localizada em solo arenoso); *trans*- α -bergamoteno (0,22% a 20,93%), que teve o maior percentual em novembro/2004 (amostra de árvore localizada em solo arenoso).

A época em que um óleo é coletado também pode ser um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Medeiros (2006) observou que no período seco os óleos de *C. multijuga* tiveram suas frações de sesquiterpenos não oxigenados e de ácidos diterpênicos levemente aumentadas, enquanto a fração de sesquiterpenos oxigenados foi levemente aumentada no período chuvoso. No entanto, esses resultados não foram estatisticamente significativos. Em *C. duckei* Dwyer, não foram observadas variações qualitativas entre os constituintes, mas observaram grandes variações em suas proporções. Embora este resultado seja importante, uma única amostra foi analisada, não sendo permitido considerar essa variação como um padrão para essa espécie (CASCON

& GILBERT, 2000). Recentemente, um estudo feito com óleos de *C. reticulata* não encontrou relação entre composição química e sazonalidade (HERRERO-JÁUREGUI *et al.*, 2011).

5.3.2. TIPO DE SOLO

A fim de confirmar a influência do tipo de solo sobre o padrão de distribuição de todas as amostras, foram realizadas novas análises de HCA e PCA. Desta vez, além dos teores dos constituintes identificados nas amostras (resultados das análises cromatográficas) de óleo-resina de copaíba, os teores de argila para cada árvore também foram submetidos aos métodos de HCA e PCA, constituindo o conjunto de dados multivariados analisados para a classificação das quarenta e três amostras.

Novamente, o pré-processamento dos dados foi realizado por normalização por log com o objetivo de reduzir a influência de variações indesejadas presentes no conjunto de dados. Com os valores obtidos, construiu-se uma matriz de dados (43 linhas x 36 colunas): sendo as 43 linhas correspondentes às amostras; 35 colunas correspondentes aos teores dos constituintes identificados nas amostras e uma coluna correspondente aos dados dos teores de argila (que classificam os tipos de solo). A similaridade entre as amostras foi novamente calculada a partir da distância Euclidiana no espaço das variáveis, usando o método Ward.

O resultado da HCA está representado no dendograma (Figura 32, na página 100), através do qual pode-se observar o agrupamento entre as amostras em dois clusters distintos, classificando as quarenta e três amostras analisadas.

Para a PCA foi realizada combinações lineares das variáveis originais β -cariofileno, óxido de cariofileno, ácido copálico, ácido pinifólico e do teor de argila, já que o mesmo se mostrou relevante na HCA. Foram então obtidos os gráficos de *scores* e de *loading* (Figuras

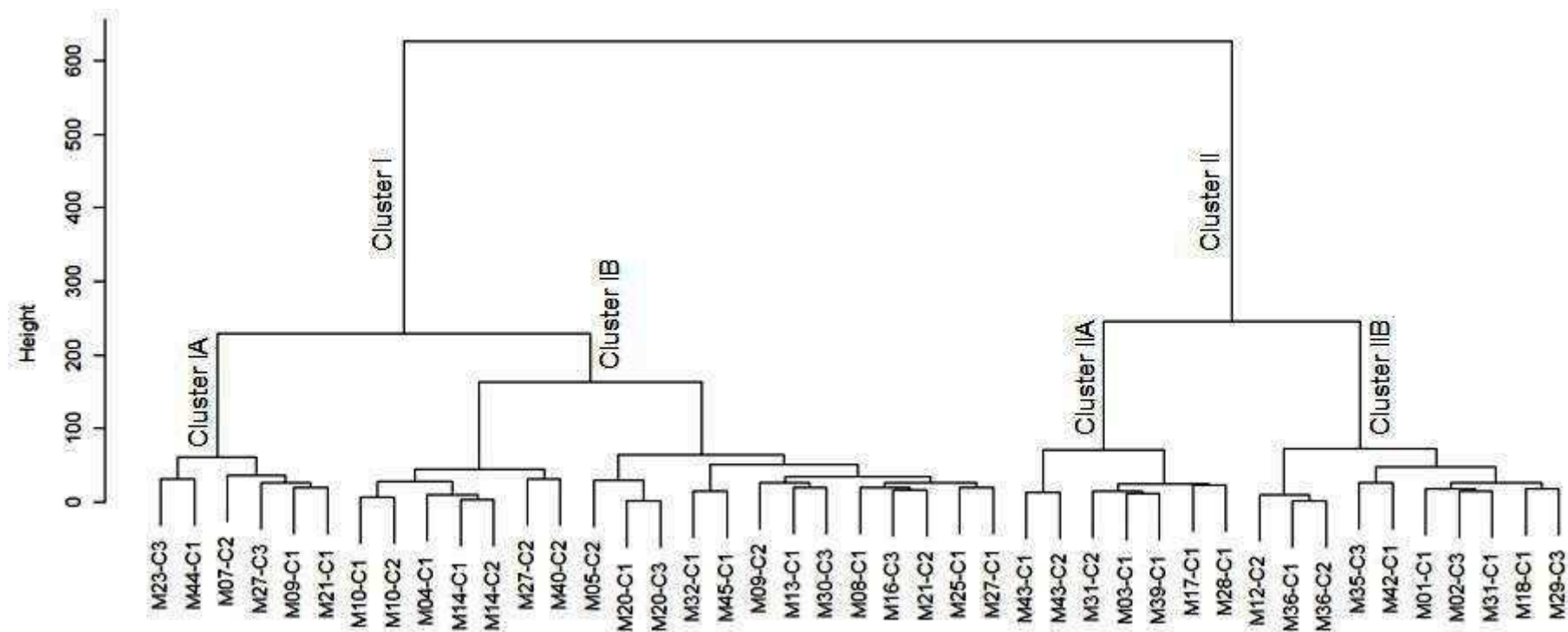


Figura 32. Dendrograma correspondente à classificação das quarenta e três amostras de óleos-resina de copaíba (*C. multijuga*).

33a e 33b), isto é, os gráficos da distribuição das amostras em função da importância das variáveis.

Na Figura 33a é apresentado o gráfico dos *escores* de Dim 1 (com 41,83% da variância) *versus* Dim 2 (com 33,45% da variância), representando 74,75% das informações totais. Nesta figura é possível notar que Dim 1 separa os óleos com maiores teores de β -cariofileno, em valores de *escores* negativos dos óleos com maiores teores de óxido de cariofileno em valores de *escores* positivos. Enquanto o Dim 2 separa os óleos provenientes de árvores localizadas em solos arenosos, em valores de *scores* negativos, dos óleos provenientes de árvores localizadas em solos argilosos, em valores de *scores* positivos.

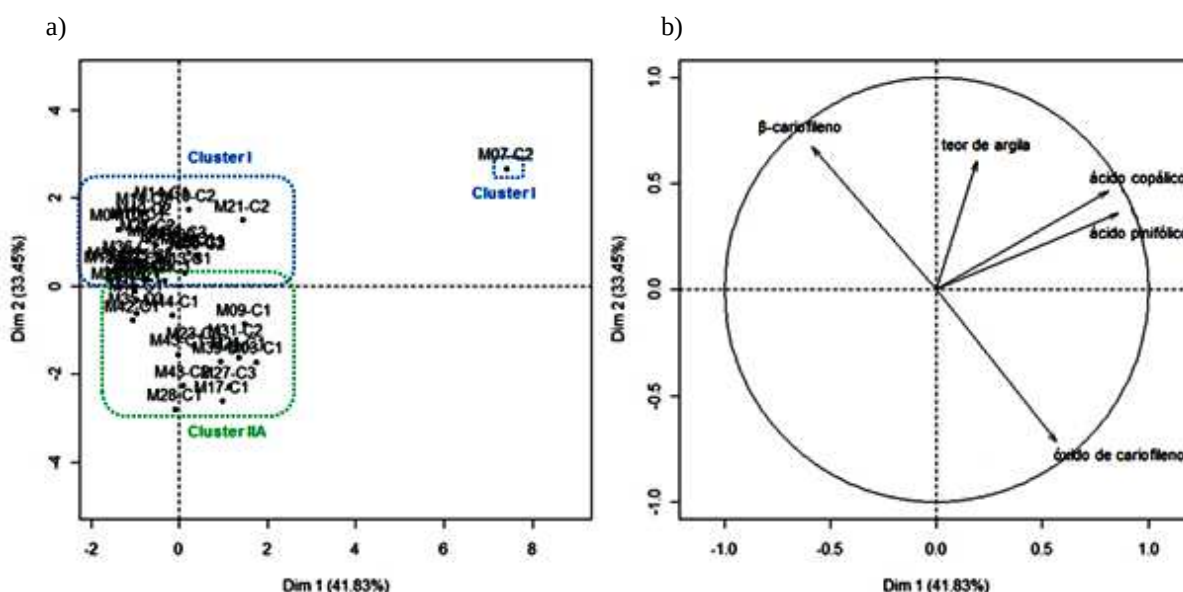


Figura 33. Gráficos de a) *scores* e b) *loadings* para Dim 1 versus Dim 2, correspondente classificação das quarenta e três amostras de óleos-resina de copaíba (*C. multijuga*).

A inspeção no gráfico dos *loadings* (Figura 33b) mostra que a separação entre as amostras em Dim 1 é determinada, essencialmente, pelos parâmetros de β -cariofileno, com *loadings* negativos e óxido de cariofileno com *loadings* positivos. Assim, os óleos com maiores teores de β -cariofileno encontram-se mais à esquerda no gráfico dos *scores* (Figura 33a), enquanto os óleos com maiores teores de óxido de cariofileno encontram-se mais à direita.

Estudos realizados no Amazonas, com *C. multijuga*, mostraram haver dependência entre a textura do solo (arenosa ou argilosa) e a produtividade de óleo-resina, onde a produção foi maior nos solos argilosos que naqueles arenosos (ALENCAR, 1982). Medeiros (2006), não observou relação da produção com o tipo de solo, mas observou que a fração de sesquiterpenos não oxigenados e ácidos diterpênicos são levemente maiores em solos argilosos, enquanto a fração de sesquiterpenos oxigenados foi maior em solos arenosos. Em óleos de *C. reticulata* foi observada uma concentração significativamente maior de *trans-α*-bergamoteno em amostras de árvores que cresceram em solos argilosos (HERRERO-JÁUREGUI *et al.*, 2011). No entanto, em estudos em folhas de árvores adultas de *C. multijuga* não foram observadas diferenças significativas na produção de compostos sesquiterpênicos em relação ao tipo de solo (NASCIMENTO & LANGENHEIM, 1986).

5.3.3. DAP

Quanto ao DAP, existe uma tendência de que árvores com maiores DAP's sejam cronologicamente mais velhas (PLOWDEN, 2003). Geralmente, árvore mais jovens apresentam maior atividade fisiológica do que árvores mais velhas, fato que pode explicar a maior continuidade da produção de óleo-resina ao longo do tempo. Enquanto as árvores que apresentam maiores DAP's ($DAP \geq 40$ cm) já se encontrem em fase reprodutiva, o que pode contribuir para a menor continuidade de produção desse óleo-resina, uma vez que essas árvores podem estar deixando de produzir compostos que funcionariam para a defesa da planta contra organismos externos para produzir compostos necessários à produção de flores, frutos e sementes, como estratégia de perpetuação da espécie (MEDEIROS, 2006).

Plowden (2001) sugeriu que a produção do óleo de copaíba aumente com o DAP até um ponto máximo e que árvores com diâmetros entre 55 e 65 cm apresentam maior produção

média que indivíduos com diâmetro maior ou menor. No entanto, Rigamonte-Azevedo *et al* (2004), Medeiros (2006), Barbosa (2007) e Herrero-Jáuregui *et al* (2011) não observaram qualquer relação entre o DAP das matrizes e a composição química de óleos-resina de copaíba. No presente trabalho, o DAP também não mostrou influência significativa sobre a composição química desta espécie.

5.3.4. INFESTAÇÃO POR CUPINS

Das trinta e três árvores selecionadas, vinte e cinco árvores apresentavam infestação por cupins. No entanto, a composição química dos óleos-resina não apresentou diferenças significativas em relação à ausência/presença de infestação por cupins.

5.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE (CGxCG)

Três amostras já analisadas (M13-C1, M20-C1 e M43-C1) por CG-DIC e CG-EM foram selecionadas para serem analisadas também por cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente (CGxCG). Dos trinta e cinco compostos identificados pelas análises de CG-DIC e CG-EM, apenas dezoito constituintes foram identificados por CGxCG nos óleos-resina de copaíba, embora tenham sido detectados até 1.326 picos (como na amostra M43-C1), que confirmam a complexidade da composição química dos óleos-resina de copaíba.

Além dos dezoito constituintes já identificados por CG-DIC e CG-EM, foram identificados por CGxCG: três hidrocarbonetos sesquiterpênicos detectados em outros óleos de copaíba analisados neste trabalho; treze sesquiterpenos (sendo doze hidrocarbonetos sesquiterpênicos e um sesquiterpeno oxigenado) que não haviam sido identificados anteriormente nos outros óleos e sete monoterpenos, inéditos em óleos-resina de copaíba. Nenhum ácido diterpênico foi identificado nessas amostras.

A proposta de identificação, a quantificação relativa e os respectivos índices de retenção (IR) para os constituintes químicos das três amostras de óleo-resina de *C. multijuga* Hayne coletados em novembro de 2004, são apresentados na Tabela 9. De acordo com a literatura (DALLÜGE *et al.*, 2003), um índice de similaridade maior do que 800 indicam que um espectro de massas adquirido tenha uma boa correspondência com um espectro de massas da espectroteca. Com exceção do α -pineno (índice de similaridade 552) e do α -felandreno (índice de similaridade 713), todos os outros 5 monoterpenos detectados tiveram índice de similaridade superior a 800.

Tabela 9. Percentual relativo dos constituintes do óleo-resina de três amostras de *Copaifera multijuga* Hayne coletados em novembro de 2004 (época seca) e analisados por cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente.

	Constituents	R_t (s), 1D, 2D	M13-C1	M20-C1	M43-C1
Monoterpenos	α -pineno	360, 1.235	t	nd	nd
	δ -3-careno	385, 1.270	nd	0,03	nd
	ocimeno	385, 1.275	t	nd	nd
	α -felandreno	395, 1.295	t	0,01	nd
	β -pineno	405, 1.325	0,05	nd	0,01
	<i>trans</i> - β -ocimeno	405, 1.335	nd	0,11	nd
	limoneno	410, 1.315	nd	nd	0,03
	<i>allo</i> -ocimeno	470, 1.435	nd	0,02	nd

*Sesquiterpenos já identificados por CG-DIC e CG-EM em outros óleos de copaíba neste trabalho

*Sesquiterpenos não identificados anteriormente por CG-DIC e CG-EM nos outros óleos de copaíba

*Monoterpenos identificados

*t – constituintes em concentração em nível de traços

Continuação da Tabela 9

	Constituents	R _t (s), 1D, 2D	M13-C1	M20-C1	M43-C1
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos	δ-elemeno	715, 1.695	0,91	0,10	1,09
	α-cubebeno	735, 1.710	1,31	0,71	0,75
	α-ilangeno	775, 1.770	0,36	0,57	0,44
	α-copaeno	780, 1.835	3,11	2,41	1,69
	β-elemeno	800, 1.790	0,63	Nd	1,40
	cipereno	835, 1.895	nd	Nd	0,4657
	α-gurjuneno	845, 1.850	0,28	1,35	Nd
	β-cariofileno	860, 1.950	1,67	3,03	5,20
	trans-α-bergamoteno	875, 1.855	0,08	1,39	0,87
	γ-elemeno	875, 1.895	2,42	Nd	3,77
	β-cis-farneseno	880, 1.895	nd	0,82	Nd
	aromadendreno	915, 1.960	nd	0,17	0,56
	α-humuleno	925, 2.050	0,31	0,88	Nd
	α-patchoulano	940, 1.995	0,16	Nd	Nd
	allo-aromadendreno	945, 2.000	0,96	Nd	Nd
	ar-curcumenol	950, 2.040	0,13	Nd	0,12
	γ-gurjuneno	960, 2.015	0,60	Nd	nd
	γ-muuroleno	960, 2.065	nd	4,36	1,10
	germacreno D	971, 2.050	0,94	2,68	Nd
	α-selineno	990, 2.080	nd	Nd	0,62
	α-muuroleno	1000, 2.080	2,42	4,20	1,47
	α-farneseno	1005, 2.160	nd	0,60	Nd
	β-bisaboleno	1010, 1.985	nd	0,16	Nd
	γ-cadineno	1020, 2.085	0,41	0,65	Nd
	δ-cadineno	1045, 2.120	0,52	1,13	Nd
	cis-calameneno	1055, 2.255	1,10	1,47	0,36
	trans-cadina-1,4-dieno	1075, 2.155	0,46	0,85	Nd
	α-calacoreno	1100, 2.365	1,10	0,21	0,17
	selina-3,7(11)-dieno	1105, 2.175	0,30	Nd	Nd
Sesquiterpenos Oxigenados	óxido de cariofileno	1200, 2.425	0,46	0,22	9,28
	ledol	1245, 2.390	0,28	0,21	0,19
	torreyol	1315, 2.460	0,38	Nd	Nd
	α-cadinol	1320, 2.490	1,86	1,91	2,02
	a-bisabolol	1415, 2.435	nd	Nd	0,14

*Sesquiterpenos já identificados por CG-DIC e CG-EM em outros óleos de copaíba neste trabalho

*Sesquiterpenos não identificados anteriormente por CG-DIC e CG-EM nos outros óleos de copaíba

*Monoterpenos identificados

*t – constituintes em concentração em nível de traços

Como já é descrito na literatura, os sesquiterpenos são os constituintes majoritários, embora outras classes como os ácidos diterpênicos, que não puderam ser identificados, possam estar presentes. Não há relatos anteriores sobre a presença de monoterpenos em óleos

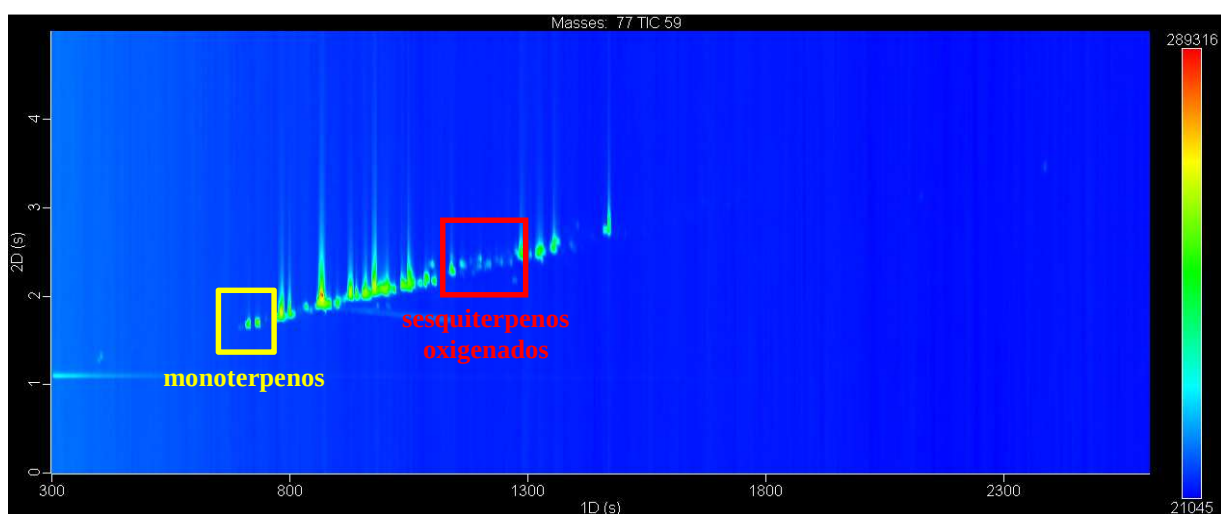


Figura 34. Diagrama de cores da amostra M13-C1.

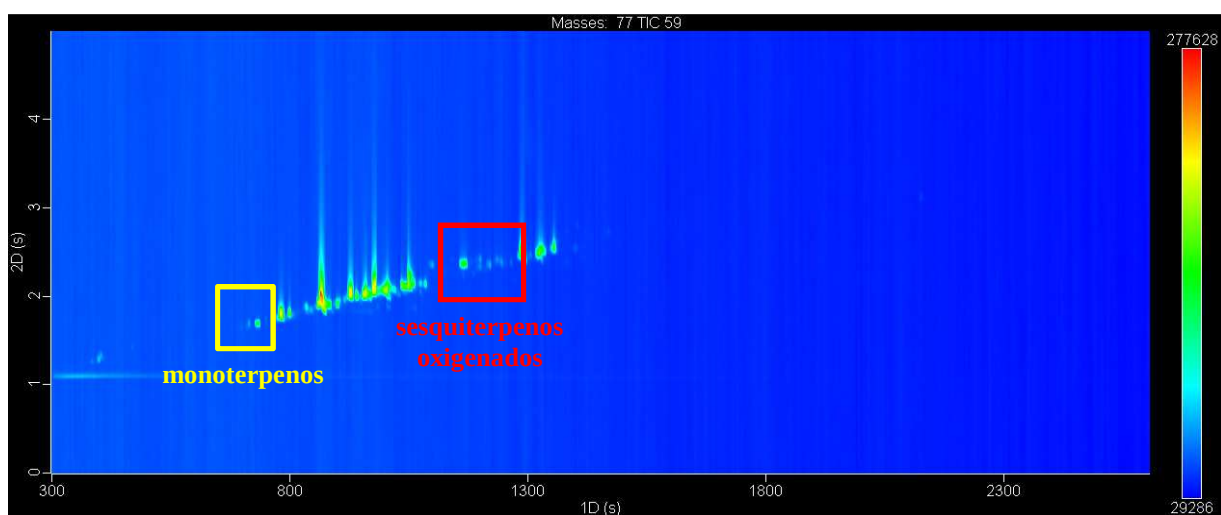


Figura 35. Diagrama de cores da amostra M20-C1.

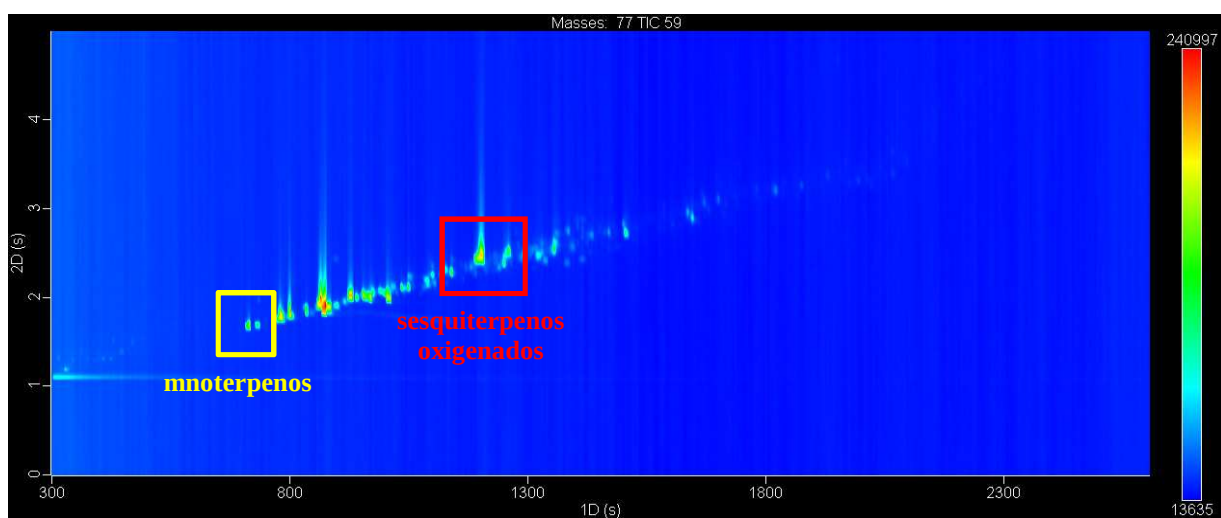


Figura 36. Diagrama de cores da amostra M43-C1.

de copaíba. Mas nos três óleos analisados, foram detectados sete monoterpenos: α e β -pineno, δ -3-careno, ocimeno, *allo*-ocimeno, *trans*- β -ocimeno, α -felandreno e limoneno. E embora a comparação com espectros de massas desses monoterpenos com os espectros de massas da literatura tenham confirmado a presença desses constituintes, novas análises são necessárias para eliminar quaisquer dúvidas a respeito da origem dessas substâncias nesses óleos.

Embora nem todos os constituintes detectados tenham sido identificados, foi possível confirmar a diferença no perfil químico e cromatográfico dessas três amostras através do diagrama de cores (Figuras 34, 35 e 36), onde são destacadas as regiões dos monoterpenos (em amarelo) e uma diferença na fração sesquiterpênica (em vermelho) das amostras.

5.5. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE ESTERIFICAÇÃO ENVOLVENDO CATÁLISE ÁCIDA

Três amostras (M09-C1, M13-C1 e M43-C1) já analisadas por CG-DIC e CG-EM foram selecionadas para as análises de comparação dos cinco métodos de esterificação envolvendo catálise ácida. Três métodos utilizam BF_3/MeOH ; um método utiliza $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ e um método utiliza HCl/MeOH . As análises foram realizadas em triplicata para verificar a reprodutibilidade do experimento.

Embora as análises das cinco metodologias testadas tenham sido reprodutíveis e os resultados semelhantes entre si, foi possível perceber que as amostras analisadas sofreram algum tipo de alteração em sua composição química, visto que os perfis cromatográficos das amostras analisadas para a comparação de métodos de catálise ácida se mostraram diferentes de quando as amostras esterificadas por diazometano foram analisadas, tanto na fração sesquiterpênica quanto na fração diterpênica.

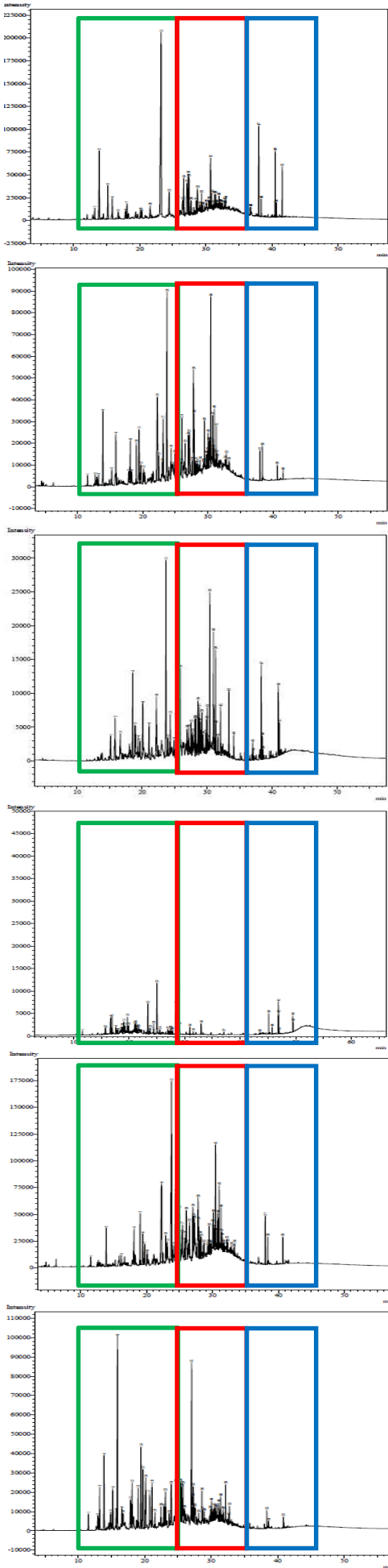
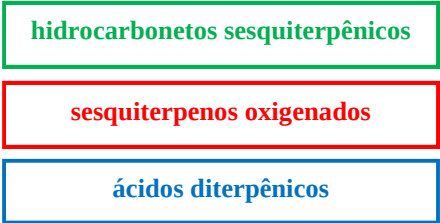


Figura 37. Cromatograma da amostra M43-C1 esterificada com diazometano, analisada recentemente para a comparação das metodologias de esterificação.

Figura 38. Cromatograma da amostra M43-C1 esterificada com BF₃/MeOH - Bannon, analisada recentemente para a comparação das metodologias de esterificação.

Figura 39. Cromatograma da amostra M43-C1 esterificada com BF₃/MeOH - Metcalf, analisada recentemente para a comparação das metodologias de esterificação.

Figura 40. Cromatograma da amostra M43-C1 esterificada com BF₃/MeOH – Joseph & Ackman analisada recentemente para a comparação das metodologias de esterificação.

Figura 41. Cromatograma da amostra M43-C1 esterificada com H₂SO₄/MeOH, analisada recentemente para a comparação das metodologias de esterificação.

Figura 42. Cromatograma da amostra M43-C1 esterificada com HCl/MeOH, analisada recentemente para a comparação das metodologias de esterificação.

Quanto à fração sesquiterpênica, comparando os cromatogramas referentes às análises da amostra M43-C1 esterificada com diazometano e as demais metodologias, foi possível perceber que todos os métodos, com exceção do método descrito por Hartman & Lago (1973) – $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (Figura 48), forneceram maiores teores de sesquiterpenos oxigenados quando comparados à metodologia de diazometano, sugerindo que tenha ocorrido oxidação dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Resultado contrário ao esperado, já que o ácido sulfúrico possui alto poder oxidante. No entanto, a fração diterpênica obtida na amostra esterificada por $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$, mostrou que o método não foi eficiente, visto que apenas três dos seis picos detectados na amostra esterificada por diazometano foram detectados. Quanto à fração diterpênica foi possível perceber que apenas a metodologia proposta por Metcalf *et al* (1966) - BF_3/MeOH (Figura 46) foi eficiente na esterificação dos ácidos diterpênicos presentes no óleo-resina de copaíba, pois de todos os métodos foi o que mais se aproximou do resultado obtido nas amostras esterificadas por diazometano, tendo sido detectados 7 picos na região dos diterpenos, um a mais que na amostra esterificada por diazometano, em teores semelhantes. Os outros 4 métodos testados mostraram o desaparecimento de picos na região de diterpenos. Já era esperado que essas metodologias afetassem os resultados quantitativos devido a vários fatores como: conversão incompleta dos ácidos em seus ésteres metílicos correspondentes, mudanças na composição dos ácidos durante a esterificação, causadas principalmente pela isomerização na configuração das cadeias carbônicas insaturadas dos ácidos e formação de artefatos que poderiam erroneamente ser identificados como ácidos, comumente relatada em metodologias de esterificação de ácido graxos por BF_3/MeOH ; que também apresentam como desvantagens o custo elevado, tempo de vida útil limitado, além de ser extremamente tóxico. Para um resultado preciso seriam necessárias novas análises qualitativas e quantitativas, monitoradas por injeção de padrões internos, já que a alteração na composição química dos óleos-resina de copaíba inviabilizou a identificação dos constituintes

formados após as reações de esterificação, já que não existem dados de sesquiterpenos oxigenados na literatura.



6. Considerações Finais

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises de cromatografia em fase gasosa acoplada à detectores de ionização de chama (CG-DIC) e espectrometria de massas (CG-EM) permitiram a identificação de trinta e cinco constituintes, sendo: nove hidrocarbonetos sesquiterpênicos, nove sesquiterpenos oxigenados e quatro ácidos diterpênicos. Enquanto a análise por CGxCG permitiu a identificação de outros treze sesquiterpenos e sete monoterpenos, inéditos em óleos-resina de copaíba.

Das quarenta e três amostras analisadas, vinte e nove eram constituídas majoritariamente por β -cariofileno, onze eram constituídas majoritariamente por óxido de cariofileno, enquanto o *trans*- α -bergamoteno e o germacreno D foram os constituintes majoritários em duas e uma amostras, respectivamente. Esses resultados confirmam os dados já descritos na literatura, de que os óleos-resina da espécie *Copaifera multijuga* Hayne são caracterizados pela presença majoritária de β -cariofileno e seu óxido, que também descarta a possibilidade de o óxido de cariofileno ser um artefato produzido por armazenamento inadequado, embora isso possa ocorrer.

As análises hierárquica por agrupamento e de componentes principais evidenciou a existência de dois grupos distintos formados por amostras com diferentes composições químicas e perfis cromatográficos. Ambos apresentaram amostras que possuíam o β -cariofileno ou seu óxido com constituinte majoritário. No entanto, as amostras foram agrupadas de acordo com o tipo de solo em que as árvores fornecedoras das amostras de óleo-resina se encontravam no momento da coleta, sugerindo uma possível influência do tipo de solo sobre a composição química dos óleos. De modo geral, as amostras de árvores provenientes de solos argilosos, pobres em nutrientes, apresentaram perfis cromatográficos

mais complexos em comparação com as amostras de árvores provenientes de solos arenosos, rico em nutrientes. Outros fatores analisados, como sazonalidade e DAP, anteriormente descritos como possíveis influências sobre a composição química desses óleos-resina, não mostraram influência significativa sobre a composição química dos óleos desta espécie.

Quanto aos cinco métodos de esterificação envolvendo catálise ácida testados, apesar de as análises terem sido reprodutíveis e terem fornecido resultados semelhantes, as metodologias não se mostraram eficientes. Todas as metodologias testadas, com exceção de BF_3/MeOH – Jham, apresentaram cromatogramas mais complexos que as amostras originalmente esterificadas com diazometano e não permitiram a identificação dos constituintes formados. De todas as metodologias adotadas neste trabalho, a esterificação utilizando diazometano, apesar de usar reagente tóxico e de alto custo, ainda é o método mais eficiente quando aplicado à análise de óleos de copaíba.



7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured, Illinois, 2007.

ALENCAR, J.C.; ALMEIDA, R.A.; FERNANDES, N.P. Fenologia das espécies florestais em floresta tropical úmida de terra firme na Amazônia Central. *Acta Amazônica*, v.9, n.1, p.163-198, 1979.

ALENCAR, J.C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne - Leguminosae, na Amazônia Central. 1. Germinação. *Acta Amazônica*, v.11, n.1, p.3-11, 1981.

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.

ALENCAR, J.C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne - Leguminosae, na Amazônia Central. 4. Interpretação de dados fenológicos em relação a elementos climáticos. *Acta Amazônica*, v.18, n.3-4, p.199-209, 1988.

ARAÚJO-JÚNIOR., F.A.; BRAZ, M.N.; ROCHA NETO, O.G.; COSTA, F.D.; BRITO, M.V.H. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.20, n.1, p.93-99, 2005.

ARRHENIUS, S.P.; FOSTER, G.E.; EDMONDS, C.G.; LANGENHEIM, J.H. Sesquiterpenes in leaf pocket resins of *Copaifera* species. *Phytochemistry*, v.22, n.2, p.471-472, 1983.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, v.78, n.5, p.431-41, 2005.

BAIMA, A.M.V.; SANTOS, L.S.; NUNES, D.S.; CARVALHO, J.O.P. Produção de óleo de copaíba na região de Tapajós. Belém: EMBRAPA, 3p. (Comunicado Técnico, 103), 1999.

BANNON, C. D.; CRASKE, J.D.; HAI, N.T.; HARPER, N.L.; O'ROURKE, K.L. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. II. Methylation of fats and oils with boron trifluoride methanol. *Journal of Chromatography A*, v.247, n.1, p.63-69, 1982.

BARBOSA, K.S. Óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne (LEG-CAESALPINOIDEAE): Produção e análise química na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé, Manaus-Am. Dissertação (Mestrado) – Biotecnologia E Recursos Naturais/Universidade do Estado do Amazonas-UEA, 2007.

BARBOSA, K.S.; SCUDELLER, V.V.; ROSA, A.L. Potencial de produção de óleo resina de *Copaifera multijuga* Hayne nos dois períodos climáticos amazônicos na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé, Manaus-AM. Biotupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central, v.2. UEA Edições, Manaus, 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.

BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E.F.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; PEIXOTO, A.L. Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: UFV, v.2, 377p., 1991.

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.

BAYLAC, S.; RACINE, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *International Journal of Aromatherapy*, v.13, n.2-3, p.138-142, 2003.

BAYLAC, S.; RACINE P. Inhibition of human leukocyte elastase by natural fragrant extracts of aromatic plants. *International Journal of Aromatherapy*, v.14, n.4, p.79-182, 2004.

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.

BONATO, P.S. Cromatografia Gasosa. In: BONATO, P.S.; BRAGA, G.L.; COLLINS, C.H. *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas-SP: Editora Unicamp, p.203-272, 2006.

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

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*, v.33, n.1, p.229-239, 2010.

BRITO, N.M.B.; SIMÕES, M.J.; PESSOA, A.F.; MELO, M.C.F. Efeitos do óleo de copaíba na cicatrização de feridas cutâneas abertas de ratos. *Revista Paraense de Medicina*, v.12, n.1, p.28–32, 1998.

BRITO, N.M.B.; SIMÕES, M.J.; GOMES, P.O.; PESSOA, A.F.; MELO, M.C.F. Aspecto microscópicos da cicatrização de feridas cutâneas abertas tratadas com óleo de copaíba em ratos. *Revista Paraense de Medicina*, v.13, n.1, p.12–17, 1999.

BRITO, M.V.H.; MOREIRA, R.J.; TAVARES, M.L.C.; CARBALLO, M.C.S.; CARNEIRO, T.X.; SANTOS, A.A.S. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.20, n.3, p.243–246, 2005.

BRITO, N.M.B.; BRITO, M.V.H.; CARVALHO, R.K.V.; MATOS, L.T.M.B.; LOBATO, R.C.; CORREA, S.C.; BRITO, R.B. The effect of copaiba balsam on Walker 256 carcinoma inoculated into the vagina and uterine cervix of female rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.25, n.2, p.176–180, 2010.

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

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

BULÖW, N.; KÖNIG, W.A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene Biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry*, v.55, n.2, p.141-168, 2000.

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

CARVALHO, P. E. R. *Espécies Florestais Brasileiras; Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso de Madeira*. Curitiba: EMBRAPA/CNPQ; Brasília: EMBRAPA-SPI, 640 p. 1994.

CARVALHO, J.C.T.; CASCON, V.; POSSEBON, L.S.; MORIMOTO, M.S.S.; CARDOSO, L.G.V.; KAPLAN, M.A.C.; GILBERT, B. Topical anti-inflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. *Phytotherapy Research*, v.19, n.11, p.946–950, 2005.

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

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

CASTRO-E-SILVA JR., O.; ZUCOLOTO, S.; RAMALHO, F.S.; RAMALHO, L.N.Z.; REIS, J.M.C.; BASTOS, A.A.C.; BRITO, M.V.H. Antiproliferative activity of *Copaifera duckei* oleoresin on liver regeneration in rats. *Phytotherapy Research*, v.18, n.1, p.92-94, 2004.

CETINKAYA, M.; KARAOSMANOGLU, F. Optimization of Base-Catalyzed Transesterification Reaction of Used Cooking Oil. *Energy Fuels*, v.18, n.6, p.1888-1895, 2004.

CHANG, H.J.; KIM, H.J.; CHUN, H.S. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. *Life Sciences*, v.80, n.9, p.835-841, 2007.

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

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

CHEN-CHEN, L.; SENA, M.A. Atividade tóxica e mutagênica do óleo de copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) em camundongos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.5, n.1, p.37–40, 2002.

CHENG, S.S.; WU, C.L.; CHANG, H.T.; KAO, Y.T.; CHANG, S.T. Antitermitic and antifungal activities of essential oil of *Calocedrus formosana* leaf and its composition. *Journal Chemical Ecology*, v.30, n.10, p.1957–1967, 2004.

CLAY, J.W.; SAMPAIO, P.T.B.; CLEMENT, C.R. Biodiversidade Amazônica: Exemplos e Estratégias de Utilização. INPA, Manaus AM, 206, 2000.

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

COMELLI-JÚNIOR, E.; SKINOVSKI, J.; SIGWALT, M.F.; BRANCO, A.B.; LUZ, S.R.; BAULÉ, C.P. Rupture point analysis of intestinal anastomotic healing in rats under the action of pure Copaíba (*Copaifera langsdorfii*) oil. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.25, n.4, p.362–367, 2010.

CORDEIRO, A.D.; JUNIOR, L.C.; RODRIGUES, L.S.; FRAGA, A.C.; NETO, P.C.; CARDOSO, M.G. Potencialidade de produção de óleos de espécies florestais. III-Copaíba. I Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel. *Anais*. Varginha-MG, 2004.

CORREIA, P.R.M.; FERREIRA, M.M.C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Química Nova*, v.30, n.2, p.481-487, 2007.

CORREIA, A.F.; SEGOVIA, J.F.O.; GONÇALVES, M.C.A.; OLIVEIRA, V.L.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J.C.T.; KANZAKI, L.I.B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v.12, n.6, p.369–380, 2008.

COSTA NETO, A.R. *Fitogeografia do gênero Copaifera Linn.* (Caesalpiniaceae). Monografia (Graduação) - Universidade Federal do Amazonas-UFAM, 1991.

CRAVEIRO, A. A.; MAIA, J. G. S.; VAREJÃO, M. J. C.; FILHO, W. W.; MOURÃO, P.; ALENCAR, J. W. *Acta Amazonica*, v.8, n.4, p.705, 1978.

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

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.

DALLÜGE, J.; BEENS, J.; BRINKMAN, U.A.T. Comprehensive two dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. *Journal of Chromatography A*, v.1000, n.1-2, p.69-108, 2003.

DESTY, D. H.; *Advances in Chromatography*, v.1, p.852, 1965.

DEUS, R.J.A.; CARVALHO, A.S.C.; BANNA, D.A.D.S.; ARRUDA, M.S.P.; ALVES, C.N.; SANTOS, A.S. Efeito fungitóxico *in vitro* do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.11, n.3, p.347–353, 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 Medicinais*, v.13, n.1, p.1–7, 2011.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: Um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, n.7, p., 21-25, 1998.

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

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

DUCKE, A. Notas sobre a flora neotrópica. II – As leguminosas da Amazônia Brasileira. *Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte*, v.18, p. 81-83, 1949.

DUCKE, A. Notas adicionais às leguminosas da Amazônia Brasileira. *Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte*, Belém, 36: p. 73-74, 1958.

DWYER, J. D. The Central American, West Indian and South American species of *Copaifera* (Caesalpiniaceae). *Brittonia*, v.7, n.3, p.143-172, 1951.

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

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, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*, v.569, n.3, p.228–236, 2007.

FERRARI, M.; PAGNONI, U. M.; PELIZZONI, F.; LUKES, V.; FERRARI, G. Terpenoids from *Copaifera langsdorfii*. *Phytochemistry*, v.10, n.4, p.905-907, 1971.

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, 2001.

FERREIRA, L.A. Potencial de extração e comercialização do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp): um estudo de caso na Floresta Estadual do Antimary, Acre. Dissertação (Mestrado) – Ecologia e Manejo de Recursos Naturais, Universidade Federal do Acre-UFAC, 1999.

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELLGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. QUIMIOMETRIA I: ANÁLISE MULTIVARIADA, UM TUTORIAL. *Química Nova*, v.22, n.5, p.724-731, 1999.

FREISE, F.W. Brazilian copaíba balsam. *Perfumery Essential Oil Record*, v.25, p.218-219, 1934.

FICALHO, Apoth. Ztg. 1904, 86, em C. Wehmer “Die Pflanzenstoffe”, G. FISHER, JENA, 1929, v.1, p.499, 1894.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; MANNELLI, L.D.C.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. *Il Farmaco*, v.56, n.3, p.387–389, 2001.

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

GOREN, A.C.; PIOZZI, F.; AKCICEK, E.; KILIÇ, T.; ÇARIKÇI, S.; MOZIOGLU, E.; SETZER, W.N. Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. *Phytochemistry Letters*, v.4, n.4, p.448–453, 2011.

GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity of Amazonian copaiba oils. *Journal of Ethnopharmacology*, v.109, n.3, p.486–492, 2007.

GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; HOVELL, A.M.C.; LANDGRAF, R.G.; MATHEUS, M.E.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid ehrlich tumor. *Journal of Ethnopharmacology*, v.119, n.1, p.179–184, 2008.

GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. *Journal of Ethnopharmacology*, v.128, n.1, p.177–183, 2010.

GOTTLIEB, O. R. Study of copaiba balsam. *Revista de Química Industrial*, v.14, p.20-21, 1945.

GRAMOSA, N.V. Estudo Químico-Farmacológico de *Copaifera langsdorffii* Desf. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará-UFCE, 2001.

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

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

HERRERO-JÁUREGUI, C.; CASADO, M.A.; ZOGHBI, M.G.B.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V. Chemical variability of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin. *Chemistry & Biodiversity*, v.8, n.4, p.674-684, 2011.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. *Laboratory Practice*, v.22, p.474-476, 1973.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2012.

JANSEN, D. Tropical Blackwater Rivers, Animals, and Mast Fruiting by the Dipterothripidae. *Biotropica*, v.6, n.2, p.69-103, 1974.

JHAM, G.N.; TELES, F.F.F.; CAMPOS, L.G. Use of Aqueous HCl/MeOH as Esterification Reagent for Analysis of Fatty Acids Derived from Soybean. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v.59, n.3, p.132-133, 1982.

JOSEPH, J.D.; ACKMAN, R. G. Capillary column gas-chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl-esters - Collaborative study. *Journal of AOAC International*, v.75, n.3, p.488-506, 1992.

KANIS, L.A.; PROPHIRO, J.S.; VIEIRA, E.S.; NASCIMENTO, M.P.; ZEPON, K.M.; KULKAMP-GUERREIRO, I.C.; SILVA, O.S. Larvicidal activity of *Copaifera* spp. (Leguminosae) oleoresin microcapsules against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Parasitology Research*, v.110, n.3, p.1173–1178, 2012.

KUBO, I.; CHAUDHURI, S.K.; KUBO, Y.; SANCHEZ, Y.; OGURA, T.; SAITO, T.; ISHIKAWA, H.; HARAGUCHI, H. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Médica*, v.62, n.5, p.427–430, 1996.

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

KVIST, L.P.; CHRISTENSEN, S.B.; RASMUSSEN, H.B.; MEJIA, K.; GONZALEZ, A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology*, v.106, n.3, p.390–402, 2006.

LAFONT, J.J.; PÁEZ, M.S.; LANS, E. Composición fisicoquímica de la semilla y del aceite de La semilla del canime (*Copaifera officinalis* L.). *Información Tecnológica*, v.22, n.3, p.19-26, 2011.

LAMEIRA, O.A.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; ZOGHBI, M.G.B.; OLIVEIRA, E.C.P. Seasonal variation in the volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer growing wild in the State of Pará, Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, v.21, n.2, p.105-107, 2009.

LANÇAS, F. M. Cromatografia em Fase Gasosa. 1º edição. *Acta Eventos*, v.1, São Carlos, 1993.

LANGENHEIM, J.H. 1990. Plant resins. *American Scientist*, n.78, p.16-24.

LANGENHEIM, J. H.; CONVIS, C.L.; MACEDO, C.A.; STUBBLEBINE, W.H. *Hymenaea* and *Copaifera* leaf sesquiterpenes in relation to lepidopteran herbivory in Southeastern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.14, n.1, p.41-49, 1986.

LANGENHEIM, J. H.; MACEDO, C.A.; ROSS, M.K.; STUBBLEBINE, W.H. Leaf development in the tropical leguminous tree *Copaifera* in relation to microlepidopteran herbivory. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.14, n.1, p.51-59, 1986.

LANGENHEIM, J. H. Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany. Publisher: (Timber, Portland, Oreg.), 608p., 2003.

LEANDRO, L.M.; VARGAS, F.S.; BARBOSA, P.C.S.; NEVES, J.K.O.; SILVA, J.A.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. *Molecules*, v.17, n.4, p.3866-3889, 2012.

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.59, n.12, p.1643–1647, 2007.

LEITE, A.M.C.; LLERAS, E. Áreas prioritárias na Amazônia para conservação dos recursos genéticos de espécies florestais nativas: fase preliminar. *Acta Botânica Brasileira*, v.7, n.1, p.61-94, 1993.

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. il. 2002.

LEITE, A.C.P. Neoeextrativismo e desenvolvimento no Estado do Acre: O caso do manejo comunitário do óleo de copaíba na Reserva extrativista Chico Mendes. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre-UFAC, 2004.

LEWIS, G.; Legumes of Bahia Kew: Royal Botanic Gardens, 1987. 369 p.

LEWIS, G.; OWEN, P.E. Legumes of the Ilha de Maracá Kew: Royal Botanic Gardens, 95p., 1989.

LIMA, S.R.M.; VEIGA, V.F., JR.; CHRISTO, H.B.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytotherapy Research*, v.17, n.9, p.1048–1053, 2003.

LIMA, C.S.; MEDEIROS, B.J.L.; FAVACHO, H.A.S.; SANTOS, K.C.; OLIVEIRA, B.R.; TAGLIALEGNA, J.C.; COSTA, E.V.M.; CAMPOS, K.J.; CARVALHO, J.C.T. Pré-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). *Phytomedicine*, v.18, n.9, p.1013–1023, 2011.

LISBOA, P.L.B.; GOMES, I.A.G.; LISBOA, R.C.L.; URBINATI, C.V. Parte III – O estilo amazônico de sobreviver: manejo dos recursos naturais. In: LISBOA, P.L.B. (org.). *Natureza, homem e manejo de recursos naturais na região de Caxiuanã, Melgaço, Pará*. Belém/PA. 37p., 2002.

LYRA, W.S.; SILVA, E.C.; DE ARAÚJO, M.C.U.; FRAGOSO, W.D.; VERAS, G. Classificação Periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes Principais. *Química Nova*, v.33, n.7, p.1594-1597, 2010.

LITVAK, M.E.; MONSON, R.K. Patterns of induced and constitutive monoterpene production in conifer needles in relation to insect herbivory. *Oecologia*, v.114, p.531-540, 1998.

MACEDO, C.A.; LANGENHEIM, J. H. A further investigation of leaf sesquiterpene variation in relation to herbivory in two brazilian populations of *Copaifera langsdorffii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.17, n.3, p.207-216, 1989.

MACEDO, C.A.; LANGENHEIM, J. H. Intra- and interplant leaf sesquiterpene variability in *Copaifera langsdorffii*: relation to microlepidopteran herbivory. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.17, n.7-8, p.551-557, 1989.

MACEDO, C.A.; LANGENHEIM, J. H. Microlepidopteran herbivory in relation to leaf sesquiterpenes in *Copaifera langsdorffii* adult trees and their seedling progeny in a Brazilian Woodland. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.17, n.3, p.217-224, 1989.

MACIEL, H.P.F.; GOUVÊA, C.M.C.P.; TOYAMA, M.; SMOLKA, M.; MARANGONI, S.; PASTORE, G.M. Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves. *Química Nova*, v.30, n.5, p.1067–1071, 2007.

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

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

MARRIOTT, P.J.; SHELLIE, R. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, v.21, n.9-10, p.573-583, 2002.

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

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

MEDEIROS, R.S.; VIEIRA, G. Sustainability of extraction and production of copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oleoresin in Manaus, AM, Brazil. *Forest Ecology and Management*, v.256, n.3, p.282–288, 2008.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.10, n.3, p.248-28, 2006.

MENDONÇA, F.A.C.; SILVA, K.F.S.; SANTOS, K.K.; RIBEIRO JÚNIOR, K.A.L.; SANT'ANA, A.E.G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, v.76, n.7-8, p.629–636, 2005.

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

METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, v.38, n.3, p.514-515, 1966.

MILINSK, M.C. Análise comparativa entre oito métodos de esterificação na determinação quantitativa de ácidos graxos em óleo vegetal. Tese (Doutorado) – Química, Universidade Federal de Maringá-UFM, 2007.

MILINSK, M. C.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J.V.; OLIVEIRA, C.C.; SOUZA, N.E. Comparative Analysis of Eight Esterification Methods in the Quantitative Determination of Vegetable Oil Fatty Acid Methyl Esters (FAME). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.19, n.8, p.475-1483, 2008.

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

MONTI, H.; TILIACOS, N.; FAURE, R. Copaiba oil: Isolation and characterization of a new diterpenoid with the dinorlabdane skeleton. *Phytochemistry*, v.51, n.8, p.1013–1015, 1999.

MORA, C.; TITTENSOR, D.P.; SINA, A.; SIMPSON, A.G.B.; WORM, B. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean?. *Plos Biology*, v.9, n.8, p.1-8, 2011.

MOITA NETO, J.M.; MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Química Nova*, v.21, n.4, p.467-469, 1998.

NASCIMENTO, J.C.; LANGENHEIM, J. H. Leaf sesquiterpenes and phenolics in *Copaifera multijuga* on contrasting soil types in a Central Amazonian Rain Forest. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.14, n.6, p.615-624, 1986.

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.

NEWTON, P.; WATKINSON, A.R.; PERES, C.A. Determinants of yield in a non-timber forest product: *Copaifera* oleoresin in Amazonian extractive reserves. *Forest Ecology and Management*, v.261, n.2, p.255–264, 2011.

NODORI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: C.M.O. Simões *et al.* (Eds.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, 5ª Edição Revisada, Porto Alegre, cap.16, Florianópolis, 2004.

NOGUEIRA-NETO, J.; LINDOSO, M.J.S.; COELHO, L.F.; CARVALHO, R.A.F.; RODRIGUES, T.G.P.M.; ARAÚJO, A.G.P.; GIRÃO, M.J.B.C.; SCHOR, E. Changes in the volume and histology of endometriosis foci in rats treated with copaiba oil (*Copaifera langsdorffii*). *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.26, s.2, p.20–24, 2011.

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

OLIVEIRA, D.F.; PEREIRA, A.C.; FIGUEIREDO, H.C.P.; CARVALHO, D.A.; SILVA, G.; NUNES, A.S.; ALVES, D.S.; CARVALHO, H.W.P. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. *Fitoterapia*, v.78, n.2, p.142–145, 2007.

OLIVEIRA, R.V.M.; OHARA, M.T.; VILA, M.M.D.C.; GONÇALVES, M.M. *In vitro* evaluation of copaíba oil as a kojic acid skin enhancer. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, v.46, n.2, p.363–370, 2010.

OMOLO, M.O.; OKINYO, D.; NDIEGE, I.O.; LWANDE, W.L.; HASSANALI, A. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry*, v.65, n. 20, p.2797–2802, 2004.

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.

PAIVA, L.A.F.; RAO, V.S.N.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.62, n.1, p.73-78, 1998.

PAIVA, L.A.F.; CUNHA, K.M.A.; SANTOS, F.A.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytotherapy Research*, v.16, n.8, p.737–739, 2002.

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

PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; SOUSA, E.T.; SILVEIRA, E.R.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.93, n.1, p.51-56, 2004.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenácea*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.110, n.2, p.323-333, 2007.

PHILLIPS, M.A.; CROTEAU, R.B. Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science*, v.4, n.5, p.184-190, 1999.

PIERI, F.A.; JOSÉ, R.M.; GALVÃO, N.N.; NERO, L.A.; MOREIRA, M.A.S. Antimicrobial activity of autoclaved and non autoclaved copaiba oil on *Listeria monocytogenes*. *Ciência Rural*, v.40, n.8, p.1797–1801, 2010.

PIERI, F.A.; COSTA, J.C.M.; SOUZA, C.F.; SANTOS, L.; MOREIRA, M.A.S. Antimicrobial Profile Screening of Two Oils of *Copaifera* Genus. In *Proceeding of the 37th CONBRAVET*, Brazilian Congress of Veterinary Medicine (CONBRAVET): Rio de Janeiro, Brazil, July, 2010.

PIERI, F.A.; SOUZA, C.F.; COSTA, J.C.M.; BARRERO, M.A.O.; ESPESCHIT, I.F.; SILVA, V.O.; MOREIRA, M.A.S. Inhibition of *Escherichia coli* from mastitic milk by copaiba oil. *Semina Ciências Agrárias*, v.32, s.1, p.1929–1934, 2011.

PINTO, A.C.; BRAGA, W. F.; REZENDE C.M.; GARRIDO, F.M.S.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M.L.; ANTUNES, O.A.C. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v.11, n.4, p.355-360, 2000.

PROPHIRO, J.S.; SILVA, M.A.N.; KANIS, L.; ROCHA, L.C.B.P.; DUQUE-LUNA, J.E.; SILVA, O.S. First report on susceptibility of wild *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) using *Carapa guianensis* (Meliaceae) and *Copaifera* spp. (Leguminosae). *Parasitology Research*, v.110, n.2, p.699–705, 2012.

PROPHIRO, J.S.; SILVA, M.A.N.; KANIS, L.; SILVA, B.M.; DUQUE-LUNA, J.E.; SILVA, O.S. Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera* sp. in *Aedes aegypti*. *Parasitology Research*, v.110, n.2, p.713–719, 2012.

PLOWDEN, C. The ecology, management and marketing of non-timber forest products in the Alto Rio Guamá indigenous reserve (eastern Brazilian Amazon). Tese (Doutorado) – Doutorado em Ecolog, Penn State University, University Park, 2001.

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

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

RODILLA, J.M.; TINOCO, M.T.; MORAIS, J.C.; GIMENEZ, C.; CABRERA, R.; MARTÍN-BENITO, D.; CASTILLO, L.; GONZALEZ-COLOMA, A. *Laurus novocanariensis* essential oil: Seasonal variation and valorization. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.36, n.3, p.167–176, 2008.

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

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

RIBAS, J.; CARREÑO, A.M. Avaliação do uso de repelentes contra picada de mosquitos em militares na Bacia Amazônica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.85, n.1, p.33–38, 2010.

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

RIGAMONTE-AZEVEDO, O.C.; WADT, P.G.S.; WADT, L.H.O. Potencial de Produção de Óleo-resina de Copaíba (*Copaifera* spp.) de Populações Naturais do Sudoeste da Amazônia. *Revista Árvore*, v.30, n.4, p.583-591, 2006.

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

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

SACHETTI, C.G.; CARVALHO, R.R.; PAUMGARTTEN, F.J.R.; LAMEIRA, O.A.; CALDAS, E.D. Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. *Food and Chemical Toxicology*, v.49, n.5, p.1080–1085, 2011.

SAMPAIO, P. T. B. 1999. Copaíba (Copaífera multijulga). p. 206-215. in: J. Clay; P. de T. B. Sampaio & C. R. Clement. (Org.). Biodiversidade Amazonica: exemplos e estratégias de utilização. 1 ed. Manaus: SEBRAE/AM.

SAMPAIO, P.T.B. Copaíba. In: CLAY, W; SAMPAIO, P.T.; CLEMENT, C.R. Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização. Manaus: INPA, p.207-215, 2000.

SANT'ANNA, B.M.P.; FONTES, S.P.; PINTO, A.C.; REZENDE, C.M. Characterization of woody odorant contributors in copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). *Journal Brazilian and Chemistry Society*, v.18, n.5, p.984–989, 2007.

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

SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA, V.F., JR.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. 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, 2008.

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

SANTOS, A.O.; COSTA, M.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; VEIGA, V.F., JR.; LIMA, M.M.S.; NAKAMURA, C.V. *Leishmania amazonensis*: Effects of oral treatment with copaiba oil in mice. *Experimental Parasitology*, v.129, n.2, 145–151, 2011.

SANTOS, R.C.V.; ALVES, C.F.S.; SCHNEIDER, T.; LOPES, L.Q.S.; AURICH, C.; GIONGO, J.L.; BRANDELLI, A.; VAUCHER, R.A. Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus* species. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.109, n.3, p.265–268, 2012.

SANTOS-JÚNIOR, H.M.; OLIVEIRA, D.F.; CARVALHO, D.A.; PINTO, J.M.A.; CAMPOS, V.A.C.; MOURÃO, A.R.B.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. *Journal of Natural Medicine*, v.64, n.2, p.231-138, 2010.

SEO, S.M.; KIM, J.; LEE, S.G.; HOONSHIN, C.H.; SHIN, S.C.; PARK, I.K. Fumigant antitermitic activity of plant essential oils and components from ajowan (*Trachyspermum ammi*), allspice (*Pimenta dioica*), caraway (*Carum carvi*), dill (*Anethum graveolens*),

geranium (*Pelargonium graveolens*), and litsea (*Litsea cubeba*) oils against Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, n.15, p.6596–6602, 2009.

SILVA, I.G.; ZANON, V.O.M.; SILVA, H.H.G. Larvicidal activity of *Copaifera reticulata* Ducke oil-resin against *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*, v.32, n.4, p.729–732, 2003.

SILVA, F.H. et al. Estudo do óleo essencial e extrato hidrometanólico de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinaceae) do cerrado e mata atlântica. In: *Reunião Nacional Da Sociedade Brasileira de Química*, v.29. Águas de Lindóia. Anais eletrônicos. São Paulo: Instituto de Química da USP, 2006.

SILVA, H.H.G.; GERIS, R.; RODRIGUES-FILHO, E.; ROCHA, C.; SILVA, I.G. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.40, n.3, p.264–267, 2007.

SILVA, J.J.L.; GUIMARÃES, S.B.; SILVEIRA, E.R.; VASCONCELOS, P.R.L.; LIMA, G.G.; TORRES, S.M.; VASCONCELOS, R.C. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. *Aesthetic Plastic Surgery*, v.33, n.1, p.104–109, 2009.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. *Fundamentos de Química Analítica*. Editora Thomson. Tradução da 8ª Edição americana, 999p., 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias das angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, p.291-328, 2005.

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

STANDEN, M.D.; CONNELLAN, P.A.; LEACH, D.N. Natural killer cell activity and lymphocyte activation: Investigating the effects of a selection of essential oils and components *in vitro*. *The International Journal of Aromatherapy*, v.16, n.3-4, p.133.139, 2006.

TAMBÉ, Y.; TSUJIUCHI, H.; HONDA, G.; IKESHIRO, Y.; TANAKA, S. Gastric Cytoprotection of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Sesquiterpene, β -Caryophyllene. *Planta Médica*, v. 62, n.5, p.469-470, 1996.

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.

TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*, v.29, n.2, p.338-350, 2006.

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

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

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. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química/Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, 1997.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. *Química Nova*, v.20, n.6, p.612-615, 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, n.6, p.476-480, 2001.

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

VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; LIMA, H.C. The essential oil composition of *Copaifera trapezifolia* Hayne leaves. *Journal of Essential Oil Research*, v.18, n.4, p. 430-431, 2006.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; ZUNINO, L.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C.; CALIXTO, J.B. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.58, n.10, p.1405–14102, 2006.

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

VEIGA-JUNIOR, V.F.; ANDRADE JUNIOR, M.A.; FERRAZ, I.D.K.; CHRISTO, H.B.; PINTO, A.C. Constituintes das sementes de *Copaifera officinalis* L. *Acta Amazônica*, v.37, n.1, p. 123-125, 2007.

VIEIRA, R.C.; BOMBARDIERE, E.; OLIVEIRA, J.J.; LINO-JÚNIOR, R.S.; BRITO, L.A.B.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.8, p.358–366, 2008.

ZHENG, G.Q.; KENNEY, P.M.; LAM, L.K.T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of Natural Products*, v.55, n.7, p.999–1003, 1992.

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

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

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; TRIGO, J.R. Chemical variation in the volatiles of *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae) growing wild in the States of Pará and Amapá, Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, v.21, n.6, p.501-503, 2009.

WANG, J. L.; LANGENHEIM, J. H. Seasonal and diurnal variations in leaf sesquiterpenes of greenhouse-grown saplings of *Hymenaea* and *Copaifera*. *Acta Botanica Yunnanica*, v.12, n.1, p.85-91, 1990.

WESTPHAL, F.L.; LIMA, L.C.; GUIMARÃES, R.A.; SOUZA, R.F.S.; COUTO, S.B.; NAKAJIMA, S.R. Avaliação das alterações pleuropulmonares após a injeção de óleo de

resina de copaíba, extrato aquoso de caju e polivinilpirrolidona iodado (PVPI) na pleura e parênquima pulmonar de ratos. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v.34, n.3, p.170–176, 2007.