

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS – ICE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA – DQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ

Desenvolvimento de metodologias cromatográficas para o aprimoramento do controle de qualidade e autenticidade de óleos de copaíba (*Copaifera* sp. – Fabaceae).

MILENA CAMPELO FREITAS DE LIMA

MANAUS – AM

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS – ICE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA – DQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ

MILENA CAMPELO FREITAS DE LIMA

Desenvolvimento de metodologias cromatográficas para o aprimoramento do controle de qualidade e autenticidade de óleos de copaíba (*Copaifera* sp. – Fabaceae).

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química, na área de Produtos Naturais.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

COORIENTADORA: Larissa Silveira Moreira Wiedemann

MANAUS – AM

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L732d Lima, Milena Campelo Freitas de
Desenvolvimento de metodologias cromatográficas para o aprimoramento do controle de qualidade e autenticidade de óleos de copaíba (*Copaifera* sp. – Fabaceae) / Milena Campelo Freitas de Lima . 2021
189 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Junior
Coorientadora: Larissa Silveira Moreira Wiedemann
Tese (Química) - Universidade Federal do Amazonas.

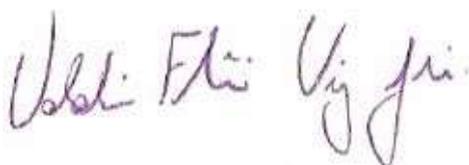
1. Oleoresina. 2. Autenticidade. 3. Cromatografia. 4. Esterificação.
I. Veiga Junior, Valdir Florêncio da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS CROMATOGRÁFICAS
PARA O APRIMORAMENTO DO CONTROLE DE QUALIDADE E
AUTENTICIDADE DE ÓLEOS DE COPAÍBA (*copaifera* sp. - Fabaceae)

MILENA CAMPELO FREITAS DE LIMA

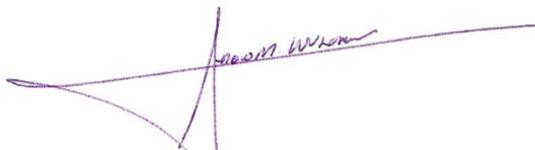
Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do
Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como
requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor(a) em Química.

Aprovada em, 27 de outubro de 2021.



VALDIR FLORÊNCIO DA VEIGA JUNIOR (PPGQ/UFAM)

Presidente/Orientador



SERGIO MASSAYOSHI NUNOMURA (PPGQ/UFAM)

Membro Interno



ALISSON MEZA NOVAIS (PPGQ/UFAM)

Membro Interno



RENATA TAKEARA HATTORI (ICET-UFAM)

Membro Externo



OLINDA MARIA FIGUEIRA CANHOTO (CBA)

Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 27 de outubro de 2021.

RESUMO

As oleoresinas de *Copaifera multijuga* são predominantemente encontradas na região Norte do Brasil, com ocorrência no Amazonas. São usadas no consumo *in natura* e em formulações farmacêuticas, devido ao seu potencial anti-inflamatório; também são utilizadas como matéria-prima nas indústrias de cosméticos e perfumes, para obtenção do seu óleo essencial e do β -cariofileno. Neste estudo, duas metodologias foram desenvolvidas utilizando a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), com o propósito de contribuir para o aprimoramento do controle de qualidade dos óleos de copaíba de forma simples, rápida e acessível. Para amenizar a grande problemática na esterificação dessas oleoresinas, também propôs-se uma metodologia de esterificação *in situ*, empregando o reagente trimetilsilildiazometano (TMSD) e comparou-se com as metodologias usuais. A autenticidade dos óleos de copaíba foi confirmada por cromatografia em fase gasosa (CG-EM), que é a técnica clássica usada para análises de óleos de copaíba. As análises em CG-EM possibilitaram a identificação de 44 constituintes, com predominância dos sesquiterpenos (86,21% - 96,26%). O β -cariofileno foi o constituinte majoritário em 9 dos 10 óleos analisados (24,87% - 70,67%) e o *trans*- α -bergamoteno foi o majoritário em apenas 1 óleo (37,64%). A quantificação do β -cariofileno e do seu óxido mostrou uma grande variação entre os espécimes, e a concentração do β -cariofileno variou de 31,7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 886 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e do óxido de cariofileno variou de 4,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 27,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O Fator de Retenção Relativo (Rf_r) possibilitou a rápida identificação dos principais marcadores químicos dos óleos de copaíba, sem a necessidade do isolamento dos constituintes ou da esterificação dos óleos, que é uma condição necessária para a identificação dos diterpenos por CG. O método desenvolvido foi aplicado em três óleos de *C. multijuga* e seus principais marcadores químicos foram identificados satisfatoriamente. A CCDAE também mostrou-se adequada na detecção de adulterantes nos óleos dessa espécie. As adulterações com óleos vegetais mostraram maior sensibilidade na CCDAE e apresentaram menor limite de detecção visual (2,3%), ao contrário das adulterações com óleo diesel que foram detectadas apenas a partir de 23%. As adulterações foram confirmadas por CCDAE-EM e análises quimiométricas de HCA, PCA e PLS-DA. Quanto às metodologias de esterificação, todas causaram algum tipo de dano aos óleos de copaíba, algumas promoveram a degradação e oxidação dos constituintes e outras, a formação de artefatos; porém, todas as metodologias mostraram-se ineficientes na esterificação dos diterpenos; a esterificação com ácido sulfúrico foi a que mais se aproximou do perfil esperado para um óleo de copaíba autêntico, contudo, o número de diterpenos observado, ainda foi inferior ao esperado. A esterificação com TMSD mostrou-se adequada aos óleos de copaíba, promovendo a completa esterificação dos diterpenos em curto tempo reacional, com número reduzidos de etapas e quantidades mínima da amostra. Todas as metodologias propostas mostraram-se adequadas aos óleos de copaíba e podem contribuir satisfatoriamente para o aprimoramento do controle de qualidade dessas oleoresinas, de forma simples, rápida e acessível.

Palavras - chave: oleoresina, autenticidade, cromatografia, esterificação.

ABSTRACT

Copaifera multijuga oleoresins are predominantly found in the northern region of Brazil, occurring in the Amazon biome. They are used *in natura* consumption and in pharmaceutical formulations, due to their anti-inflammatory potential; being used as a raw material in the cosmetics and perfume industries as well, to obtain their essential oil and β -caryophyllene. In this study, two methodologies were developed using high performance thin layer chromatography (HPTLC), with the purpose of contributing to the improvement of the quality control of copaiba oils in a simple, fast and accessible way. The esterification of these oleoresins faces some obstacles, which ones were attenuated with an *in situ* esterification methodology proposed, using the reagent trimethylsilyldiazomethane (TMSD) and comparing it with the current and usual methodologies. The authenticity of copaiba oils was confirmed by gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS), which is the most classic technique used for analysis of copaiba oils. The GC-MS analysis led up to the identification of 44 constituents, with a predominance of sesquiterpenes (86.21% - 96.26%). β -caryophyllene was the major constituent in 9 of the 10 oils analyzed (24.87% - 70.67%) and trans- α -bergamotene was the major constituent in only 1 oil (37.64%). The quantification of β -caryophyllene and its oxide showed a great variation among the specimens, and the concentration of β -caryophyllene ranged from 31.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to 886 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and of caryophyllene oxide varied from 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to 27.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The Relative Response Factor (R_{fR}) was essential to quickly identify the main chemical markers of copaiba oils, without the need to isolate the constituents or esterify the oils, which is a necessary condition for the identification of diterpenes by GC. The developed method was applied to three *C. multijuga* oils and their main chemical markers were satisfactorily identified. The HPTLC also proved to be adequate in the detection of adulterants in the oils of this species. Adulterations with vegetable oils showed greater sensitivity in HPTLC and had a lower limit of visual detection (2.3%), unlike adulterations with diesel oil, which were detected only above 23%. The adulterations were confirmed by HPTLC-MS and chemometric analysis of HCA, PCA and PLS-DA. Regarding to the esterification methodologies, all of them caused some sort of damage to copaiba oils, some promoted the degradation and oxidation of the constituents and others, the formation of artifacts; however, all methodologies proved to be inefficient in the esterification of diterpenes; the esterification with sulfuric acid was the closest to the expected profile for an authentic copaiba oil, except by the number of diterpenes observed that was lower than expected. The esterification with TMSD proved to be adequate for copaiba oils, promoting the complete esterification of the diterpenes in a short reaction time, with a reduced number of steps and minimum sample amounts. All the proposed methodologies proved to be suitable for copaiba oils and can contribute satisfactorily to the improvement of the quality control of these oleoresins, in a great, speedy and accessible way.

Keywords: oleoresin, authenticity, chromatography, esterification.

*Todo aprendizado seja para Ti,
meu Senhor e meu Deus, por meio
da edificação da minha vida.*

Agradecimentos

A **Deus**, pelo dom da minha vida e por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional que tive ao longo do doutorado.

A minha querida e amada família, de modo muito especial a minha princesa, **Gabriela Lima** e a meu amor **Max Lima**, por todo apoio, carinho, compreensão e paciência.

Ao meu querido e amado pai, **José Lídio**, meu orgulho, minha inspiração e minha força de todos os dias, aquele que cuidou e cuida de mim com tanto carinho, dedicação e amor.

Aos meus pibic's maravilhosos **Larissa Silva** e **Steve manickchand** por toda dedicação, carinho e abertura de coração em partilhar comigo momentos de lutas e vitórias, dias intensos e longos, fins de semanas e feriados que pareciam não ter fim.

Às minhas amigas de outrora **Lidian Leandro**, **Joelma Alcântara**, **Priscila Oliveira** e **Klenicy Yamaguchi** que plantaram no meu coração o desejo em fazer sempre o melhor em tudo, a essência da dedicação, o zelo pelo trabalho e acima de tudo o respeito e o cuidado com o outro.

Às minhas amigas **Glaucia Manço**, **Emily Marcelle**, **Simone Braga**, **Isadora Moita** e **Yasmin Cunha** por todos os momentos maravilhosos de descontração, alegria e aprendizado.

Ao meu grande amigo **Felipe Moura** pelo apoio, disponibilidade, solicitude e atenção.

Aos meus colegas do ABC-NP **Leandro Lima** e **Filipi Kayodè** pelo companheirismo e receptividade no Instituto Militar de Engenharia (IME) e às copaibeiras **Rayssa Ribeiro** e **Josiane Elizabeth Almeida** por todo carinho.

Ao prof. **Samir Cavalcante** e toda a equipe do Instituto de Defesa Química, Biológica, Radiológica e Nuclear (IDQBRN), no Centro Tecnológico do Exército (CTEX) pela hospitalidade e oportunidade em trabalhar no CCDAE-EM.

Ao meu orientador prof. **Valdir Florêncio da Veiga Junior** pela acolhida, por toda confiança, por todo aprendizado, paciência e dedicação em me orientar.

À minha co-orientadora profa. **Larissa Silveira Moreira Wic** dedicação e disponibilidade em me orientar.

A **Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas**, em especial ao laboratório de cromatografia gasosa (LABCG) por todas as análises realizadas.

Aos professores **Sérgio Nunomura, Alan Diego e Priscila Aquino** pelas contribuições dadas no exame de qualificação da referida tese.

Ao grupo de pesquisa **QBiomA** pela formação profissional e pessoal a mim concedida e pelo carinho de todos esses anos.

À **FAPEAM** pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta tese.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição química dos 10 OCM's analisados por CG-EM.....	75
Tabela 2. Valores calculados para avaliar a repetibilidade intra-corrída (concentrações em mg.mL ⁻¹).	80
Tabela 3. Quantificação do β-cariofileno e óxido de cariofileno nos óleos de <i>C. multijuga</i>	81
Tabela 4. Resumo dos principais fragmentos de íons dos padrões terpênicos obtidos por CCDAE-EM.	89
Tabela 5. Dados de Rf relativo, variação percentual, parâmetros da curva analítica e coeficiente de explicação para os biomarcadores terpênicos.	97
Tabela 6. Dados de limites de predição do Rfr para identificação de biomarcadores terpênicos em óleos de copaíba (<i>Copaifera</i> sp.) de acordo com a concentração do óxido de linalol.	98

Lista de Quadros

Quadro. 1. Dados de composição das adulterações dos óleos de <i>C. multijuga</i> com óleos de soja, milho e diesel.	62
Quadro. 2. Limite de detecção visual (LD) dos adulterantes nos óleos de <i>C. multijuga</i>	105
Quadro. 3. Íons mais importantes para o agrupamento dos espectros de massas dos Rf's e uma possível identificação para eles com base na literatura.	119
Quadro. 4. Taxa de classificação para o PLS-DA com 2 e 4 componentes principais (Ncomp).....	120
Quadro. 5. Rendimentos das reações de esterificação.	126

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema com as principais utilizações dos óleos de copaíba (<i>Copaifera sp.</i>).....	27
Figura 2. Principais sesquiterpenos identificados nos óleos de copaíba (<i>Copaifera sp.</i>).....	31
Figura 3. Estruturas dos principais diterpenos identificados nos óleos de copaíba (<i>Copaifera sp.</i>).....	33
Figura 4. Esqueletos dos principais diterpenos identificados nos óleos de copaíba (<i>Copaifera sp.</i>).....	35
Figura 5. Componentes principais do cromatógrafo a gás.	43
Figura 6. Ilustração das etapas para obtenção dos cromatogramas por CCDAE com aplicação semiautomática.	47
Figura 7. Ilustração das etapas para obtenção dos espectros de massas por CCDAE-EM.	48
Figura 8. Delineamento Experimental.....	52
Figura 9. Óleos de <i>Copaifera multijuga</i> (OCM) coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke.....	53
Figura 10. Ilustração das análises em CCDAE-UV.	58
Figura 11. Ilustração das análises em CCDAE-EM.	59
Figura 12. Fluxograma das metodologias utilizadas para a esterificação dos óleos de <i>C. multijuga</i> e <i>C. reticulata</i>	69
Figura 13. Óleos de <i>C. multijuga</i> utilizados para a quantificação do β -cariofileno e do óxido de cariofileno.	71
Figura 14. Cromatogramas dos óleos de <i>C. multijuga</i> obtidos por CG-EM (sobrepostos).	73
Figura 15. Sobreposição dos cromatogramas dos OCM's na região de eluição do β -cariofileno (A); Expansão da região A (B).....	77
Figura 16. Curvas analíticas do β -cariofileno (A) e o óxido de cariofileno (B).....	78
Figura 17. Perfil cromatográfico dos principais biomarcadores terpênicos detectados em óleos de copaíba (<i>Copaifera sp.</i>) por CCDAE.	86

Figura 18. Espectros de massas dos ácidos copálico, hidroxí-copálico, acetoxi-copálico e agático, obtidos por CCDAE-EM.	91
Figura 19. Espectros de massas dos ácidos poliáltico e hardwickiico e dos sesquiterpenos β -cariofileno e óxido de cariofileno obtidos por CCDAE-EM.	92
Figura 20. Ilustração prática da aplicação do fator de retenção relativo (Rfr).	95
Figura 21. Curvas analíticas dos padrões terpênicos para obtenção do Rfr.	96
Figura 22. Identificação dos principais marcadores terpênicos dos óleos de <i>C. multijuga</i> pelo Rfr.	99
Figura 23. Cromatograma dos 10 óleos de <i>C. multijuga</i> obtidos por CCD. Revelação a 366 nm (esquerda) e a luz visível (direita).	102
Figura 24. Perfil cromatográfico dos óleos adulterantes obtidos por CCD.	103
Figura 25. Cromatogramas dos OCM's selecionados para análise em CCDAE-EM. Revelação a 366 nm (esquerda) e a luz visível (direita).	108
Figura 26. Mapa dos scores das duas primeiras componentes principais dos espectros de massas obtidos por CCDAE-EM dos OCM's autênticos e adulterados.	112
Figura 27. Dendograma obtido pela Análise Hierárquica de Cluster (HCA) dos espectros de massas obtidos por CCDAE-EM dos OCM's autênticos e adulterados.	113
Figura 28. Densidade dos pesos positivos dos íons dos EM de acordo com os clusters formados na HCA.	116
Figura 29. Classificação dos OCM's autênticos e adulterados por PLS-DA.	122
Figura 30. Cromatogramas dos óleos de copaíba esterificados (OCM e OCR) obtidos por CCDAE.	129
Figura 31. Cromatogramas obtidos por CG-EM dos OCM (A) e OCR (B) esterificados com TMSD.	131
Figura 32. Cromatogramas obtidos por CG-EM (região sesquiterpênica) dos OCM's esterificados com TMSD (A), H ₂ SO ₄ (B) e HCl (C).	134
Figura 33. Cromatogramas obtidos por CG-EM (região sesquiterpênica) dos OCM's esterificados com TMSD (A), BF ₃ /MET (B) e BF ₃ /JAC (C).	136
Figura 34. Cromatogramas obtidos por CG-EM (região diterpênica) dos OCM's esterificados com TMSD (A), H ₂ SO ₄ (B), HCl (C), BF ₃ /MET (D) e BF ₃ /JAC (E).	138
Figura 35. Cromatogramas obtidos por CG-EM dos OCR esterificados com TMSD (A), H ₂ SO ₄ (B) e HCl (C).	140
Figura 36. Cromatogramas obtidos por CG-EM dos OCR esterificados com TMSD (A), BF ₃ /MET (B) e BF ₃ /JAC (C).	141
Figura 37. Cromatogramas expandidos da região de eluição dos diterpenos.	143

Figura 38. Cromatogramas obtidos por GC-EM dos OCM's esterificados com H ₂ SO ₄ (Expansão da região sesquiterpênica).	145
Figura 39. Cromatogramas obtidos por GC-EM dos OCM's esterificados com BF ₃ /MET (Expansão da região diterpênica).	146
Figura 40. Cromatogramas obtidos por GC-EM dos OCM's esterificados com HCl (Expansão da região diterpênica).	147
Figura 41. Cromatogramas obtidos por GC-EM dos OCR's esterificados com BF ₃ /MET (Expansão da região sesquiterpênica).	148

Lista de anexos

Anexo 1. Sobreposição dos cromatogramas dos OCM's na região de eluição do óxido de cariofileno.....	168
Anexo 2. Sobreposição dos cromatogramas dos OCM's na região de eluição do β -cariofileno (A); Expansão da região A (B).....	168
Anexo 3. Gráfico de resíduos para os ácidos hardwickiico, acetoxi-copálico, agático e hidroxí-copálico - Homocedasticidade dos resíduos (Teste de Breusch – Pagan).	169
Anexo 4. Gráfico de resíduos para o β -cariofileno, óxido de cariofileno e os ácidos copálico e hardwickiico - Homocedasticidade dos resíduos (Teste de Breusch – Pagan).	170
Anexo 5. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo C27 , adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.	171
Anexo 6. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo C20 , adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.	171
Anexo 7. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo C8 , adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.....	172
Anexo 8. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo C29 , adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.	172
Anexo 9. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo C33 , adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.	173
Anexo 10. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo C41 , adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.	173
Anexo 11. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo C14 , adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.	174
Anexo 12. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo C11 , adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.	174
Anexo 13. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo C30 , adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.	175
Anexo 14. Espectros de massas obtidos por CCDAE-EM do óleo de <i>C. multijuga</i> (C8) adulterados com óleo de soja.....	176

Anexo 15. Espectros de massas obtidos por CCDAE-EM do óleo de <i>C. multijuga</i> (C8) adulterados com óleo diesel.....	177
Anexo 16. Espectros de massas obtidos por CCDAE-EM dos óleos de <i>C. multijuga</i> (C20) adulterados com óleo de soja.....	178
Anexo 17. Espectros de massas obtidos por CCDAE-EM dos óleos de <i>C. multijuga</i> (C20) adulterados com óleo diesel.....	179
Anexo 18. Espectro de massas do eperuato de metila na esterificação com TMSD....	180
Anexo 19. Espectro de massas do eperuato de metila na esterificação com BF ₃ /MET.	180

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo Geral.....	24
2.2. Objetivos Específicos	24
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
3.1. Características gerais do gênero <i>Copaifera</i>	26
3.2. Produção dos óleos de copaíba (<i>Copaifera</i> sp.).....	26
3.3. Composição química dos óleos de copaíba (<i>Copaifera</i> sp.).....	29
3.4. Adulteração dos óleos de copaíba (<i>Copaifera</i> sp.)	35
3.5. Oleoresinas de <i>Copaifera multijuga</i>	37
3.6. Caracterização Química dos óleos de copaíba.....	40
3.6.1. Cromatografia em fase gasosa	42
3.6.2. Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE)	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1. Coleta das oleoresinas.....	53
4.2. Quantificação do β-cariofileno e óxido de cariofileno em óleos de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne por cromatografia em fase gasosa (CG-EM).....	53
4.2.1. Derivatização dos óleos de copaíba	53
4.2.2. Análises por CG-EM	54
4.2.3. Caracterização química das oleoresinas de <i>C. multijuga</i> por CG.....	54
4.2.4. Linearidade	55
4.2.5. Repetibilidade intra-corrída	55
4.2.6. Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	56
4.2.7. Quantificação do β -cariofileno e óxido de cariofileno nos óleos de <i>C. multijuga</i>	56
4.3. Caracterização de marcadores químicos nos óleos de copaíba (<i>Copaifera</i> sp.) utilizando Fator de Retenção Relativo (Rfr) por CCDAE-UV e CCDAE-EM. ...	56
4.3.1. Reagentes	56
4.3.2. Caracterização química dos padrões terpênicos por CCDAE-UV	57
4.3.3. Caracterização química dos padrões terpênicos por CCDAE-EM (CCDAE-EM)	58
4.3.4. Fator de retenção Relativo (Rfr)	59

4.3.5. Análises estatísticas	60
4.4. CCDAE Fingerprinting: detecção de adulterantes em óleos de copaíba (<i>Copaifera multijuga</i> Hayne) e confirmação por CCDAE-EM e análises quimiométricas.....	61
4.4.1. Reagentes	61
4.4.2. Adulteração dos óleos de <i>C. multijuga</i>	61
4.4.3. Análises em CCDAE-UV	62
4.4.4. Análises em CCDAE-EM.....	63
4.4.5. Análises Estatísticas.....	64
4.5. Esterificação dos óleos de copaíba (<i>Copaifera</i> sp.).....	65
4.5.1. Métodos de esterificação utilizados	65
4.5.1.1. Método de esterificação proposto por Metcalfe, Schmitz e Pelka (1966) (MET)	65
4.5.1.2. Método de esterificação proposto por Joseph e Ackman (1992) (JAC).....	66
4.5.1.3. Método de esterificação proposto por Jham, Teles e Campos (1982) (JHA) 66	
4.5.1.4. Método de esterificação proposto por Hartman e Lago (1973) (HLA)	67
4.5.1.5. Método de esterificação proposto por Migowska e colaboradores (2010)....	68
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1. Quantificação do β-cariofileno e óxido de cariofileno nos óleos de copaíba de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne por cromatografia em fase gasosa (CG - EM)	71
5.1.1. Caracterização química dos óleos de copaíba de <i>Copaifera multijuga</i> por cromatografia em fase gasosa (CG-EM).....	71
5.1.2. Linearidade	78
5.1.3. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	79
5.1.4. Repetibilidade intra-corrída	79
5.1.5. Quantificação do β -cariofileno e óxido de cariofileno nos óleos de <i>C. multijuga</i>	80
5.2. Caracterização de marcadores químicos nos óleos de copaíba (<i>Copaifera</i> sp.) utilizando Fator de Retenção Relativo (Rfr) por CCDAE e CCDAE-EM.	83
5.2.1. Caracterização química dos padrões terpênicos por CCDAE-UV	84
5.2.2. Caracterização química dos padrões terpênicos por CCDAE-EM	86
5.2.3. Fator de retenção relativo (Rfr).....	93
5.2.4. Aplicação do Fator de retenção relativo (Rfr) nos óleos de <i>C. multijuga</i>	99
5.3. CCDAE Fingerprinting: detecção de adulterantes em óleos de copaíba (<i>Copaifera multijuga</i> Hayne) e confirmação por CCDAE-EM e Análises quimiométricas.....	100

5.3.1. Caracterização dos OCM's autênticos e adulterados por CCD.....	101
5.3.2. Caracterização química dos OCM's autênticos e adulterados por CCDAE....	103
5.3.3. Caracterização das adulterações por cromatografia em camada fina de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CCDAE-EM).....	107
5.4. Esterificação dos óleos de copaíba (<i>Copaifera sp.</i>).....	123
5.4.1. Rendimentos	124
5.4.2. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE-UV).....	127
5.4.3. Análises dos óleos esterificados por Cromatografia em fase gasosa hifenada a Espectrometria de Massas (GC-EM)	130
5.4.3.1. Esterificação dos óleos de copaíba (OCM e OCR) com Trimetilsilildiazometano (TMSD)	130
5.4.3.2. Comparação das metodologias de esterificação dos óleos de <i>Copaifera multijuga</i> (OCM)	132
5.4.3.3. Comparação das metodologias de esterificação dos óleos de <i>Copaifera reticulata</i> (OCR)	139
5.4.3.4. Reprodutibilidade das metodologias de esterificação	144
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	151
7. REFERÊNCIAS	155
8. ANEXOS	168

1. Introdução Geral



Óleo de copaíba: fonte natural de terpenoides

Fonte: o autor.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos de copaíba são oleoresinas constituídas por terpenos voláteis (Dwyer, 1951). São bastante conhecidos por suas propriedades medicinais e por sua utilização nas indústrias de cosméticos e perfumes; são usados para curar diversas enfermidades, mas, sua principal aplicação está relacionada com seu efeito anti-inflamatório; são utilizados *in natura* para tratamentos tópicos na cicatrização de feridas, e também por via oral, para tratar diversas inflamações respiratórias. Nas indústrias farmacêuticas e cosméticas são empregados na formulação de diversos produtos, devido a suas propriedades antimicrobiana; Nas indústrias de perfumes a principal aplicação está relacionada com o óleo essencial de copaíba, usado como fixador de fragrâncias (Veiga-Junior e Pinto, 2002). Em outros casos, os óleos de copaíba são utilizados como insumos farmacêuticos para obtenção do β -cariofileno, constituinte maioritário em algumas espécies do gênero *Copaifera*; esse sesquiterpeno apresenta forte aroma amadeirado (Sköld et al., 2006), tem muitas atividades biológicas relevantes (Leandro et al., 2012; Ames-Sibin et al., 2018; Hwang et al., 2020) e estudos têm mostrado seu potencial no sistema endocanabinoide (Irrera et al., 2020; Picciolo et al., 2020).

Os óleos de *Copaifera multijuga* são particularmente importantes, pois apresentam características de grande interesse para o setor farmacêutico, de cosméticos e perfumes. Essas oleoresinas têm alta concentração do β -cariofileno (20,0 - 70,0%), elevado teor da fração sesquiterpênica (90,0%) e excelentes propriedades anti-inflamatórias. Além disso, são constituídas por um número reduzido de diterpenos, que facilita a purificação do seu óleo essencial (Barbosa et al., 2012; Barbosa et al., 2013; De Lima et al., 2020); é uma espécie bastante investigada em suas propriedades biológicas, devido à alta concentração do β -cariofileno e também à presença do ácido copálico,

diterpeno maioritário (Veiga-Junior e Pinto, 2002; Lima et al., 2003; Veiga-Junior et al., 2007; Leandro et al. 2012; Da Trindade et al., 2018). É uma espécie abundante no Amazonas, podendo ocorrer nos estados do Pará e Rondônia (Norte) e no Mato Grosso (Centro-Oeste) (Costa, 2020). O Brasil é o maior produtor mundial de óleos de copaíba e 82,0% de toda sua produção vem do Amazonas, com uma produção anual de 135 toneladas (IBGE, 2021).

Os óleos de copaíba normalmente são analisados por cromatografia em fase gasosa (CG e CG-EM) (Sousa et al., 2011; Xavier-Júnior et al., 2017). Apesar da grande sensibilidade e confiabilidade da CG, ela é uma técnica onerosa, muitas vezes inacessível em ambientes com poucos recursos laboratoriais; e no caso específico dos óleos de copaíba, exige a esterificação das oleoresinas. Os óleos de copaíba também podem ser fracionados por cromatografia em coluna aberta, por meio da fitoquímica clássica, e então caracterizados por técnicas espectroscópicas e cromatográficas; essas oleoresinas ainda podem ser destiladas, para a separação dos constituintes voláteis e resinosos e posteriormente caracterizadas. No entanto, todas as formas apresentadas são procedimentos demorados, que envolvem muitas etapas, e no caso da destilação, pode haver comprometimento da integridade dos constituintes.

As metodologias desenvolvidas nesta tese foram baseadas na cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE ou CCDAE), através do fator de retenção relativo (R_{fr}) e da detecção de adulterantes nos óleos de copaíba. O fator de retenção relativo permite a rápida detecção dos principais marcadores químicos dos óleos de copaíba, sem a necessidade da purificação das frações, do isolamento dos constituintes ou da esterificação das oleoresinas. A CCDAE também é uma técnica sensível que tem sido amplamente usada na caracterização de muitos produtos naturais (Johnson et al., 2020; Kaltbach et al., 2020; Osman et al., 2020; Rocamora et al., 2020; Alqarni et al., 2021; Melnyk et al., 2021; Mulaudzi et al., 2021); no caso específico dos óleos de

copaíba, ela permite a obtenção da impressão digital fidedigna da oleoresina, sem a necessidade de qualquer pré-tratamento da amostra. Por outro lado, a esterificação dos óleos de copaíba, muitas vezes torna-se um grande empecilho, devido ao número de etapas envolvidas, a toxicidade e o elevado custo de determinados reagentes de esterificação e principalmente pela ineficiência das metodologias. Portanto, propôs-se a utilização de uma metodologia de esterificação *in situ* para os óleos de copaíba (Migowska et al., 2010) e mostrou-se as principais influências das metodologias de esterificação normalmente utilizadas (Milinsk, 2008).

A tese consiste na abordagem de quatro aspectos principais: (i) inicialmente foi realizada a caracterização química de dez óleos de *C. multijuga* por CG-EM, para avaliar a autenticidade das oleoresinas e a variação química entre os espécimes. O segundo aspecto (ii) consistiu no desenvolvimento do fator de retenção relativo (R_{fr}) por meio da CCDAE; o R_{fr} foi desenvolvido pela relação dos padrões terpênicos com o óxido de linalol; através dessa relação foi possível identificar os principais marcadores químicos dos óleos de *Copaifera multijuga* (OCM's), sem a necessidade do isolamento dos constituintes ou purificação das frações. O terceiro aspecto da tese (iii) consistiu na utilização da CCDAE na detecção de adulterantes nos óleos de *C. multijuga*; os dez óleos de copaíba foram adulterados com óleos vegetais (soja e milho) e com óleo diesel nas proporções de 2,3%, 4,5%, 9,0%, 23,0%, 33,0% e posteriormente, analisados por CCDAE; todas as adulterações foram confirmadas por CCDAE-EM e análises quimiométricas (PCA, HCA e PLS-DA). A quarta e última abordagem da tese (iv) consistiu na utilização de uma metodologia de esterificação *in situ*, usando o trimetilsilildiazometano, e na comparação desta metodologia com as metodologias de esterificação usuais. De forma geral, esta tese tem o propósito de apresentar metodologias simples, rápidas e eficientes que possam ser usadas na caracterização química dos óleos de copaíba.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver metodologias cromatográficas e de esterificação que possam contribuir para o controle de qualidade e autenticidade dos óleos de copaíba (*Copaifera* sp.).

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Caracterizar os óleos de *C. multijuga* por cromatografia em fase gasosa e quantificar os principais marcadores químicos;

2.2.2. Desenvolver uma metodologia por cromatografia de camada fina de alta eficiência (CCDAE-UV) por meio do fator de retenção relativo (R_f), para caracterizar os principais marcadores terpênicos dos óleos de *C. multijuga*;

2.2.3. Desenvolver uma metodologia por CCDAE-UV para detecção de adulterantes nos óleos de *C. multijuga*;

2.2.4. Confirmar as adulterações por cromatografia de camada fina de alta eficiência hifenada à espectrometria de massas (CCDAE-EM) e por análises quimiométricas (HCA, PCA e PLS-DA);

2.2.5. Utilizar uma metodologia de esterificação *in situ* nos óleos de copaíba e avaliar os efeitos das metodologias comumente utilizadas na integridade dos constituintes terpênicos.

3. Revisão bibliográfica

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Características gerais do gênero *Copaifera*

As árvores do gênero *Copaifera* ou copaibeiras, como são popularmente conhecidas, são nativas de regiões tropicais da América Latina e da África Ocidental. É um gênero relativamente grande, constituído por mais de 70 espécies, que apresentam muitas características em comum. São árvores de médio porte com variações de altura e largura, podendo atingir até 40 metros de altura e 4 metros de diâmetro (Da Trindade et al., 2018). O gênero *Copaifera* encontra-se amplamente distribuído no território brasileiro, com 26 espécies e 8 variedades. A maior diversidade de espécies é relatada na região nordeste e posteriormente nas regiões Norte, Sudeste, Centro-Oeste e Sul. As espécies mais abundantes no nordeste brasileiro são *C. oblongifolia* Mar. Ex Hayne, *C. cearensis* Huber ex Ducke e *C. martii* Hayne, com ocorrência nos Estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Na região Norte, as espécies de maior ocorrência são *C. multijuga*, no Amazonas, Pará e Rondônia e *C. reticulata*, também nos Estados do Pará, Rondônia e Amapá. Embora haja uma certa especificidade em relação a distribuição das espécies nas regiões brasileiras, *C. langsdorffii* apresenta ampla distribuição por todo o Brasil, desde a Amazônia (Norte) até Santa Catarina (Sul) (Costa, 2020).

3.2. Produção dos óleos de copaíba (*Copaifera* sp.)

A principal característica do gênero *Copaifera* consiste na produção de um óleo muito desejado, que apresenta cor, densidade, viscosidade e composição química específica, de acordo com sua espécie (Rigamonte-Azevedo et al., 2004). Esses óleos foram relatados pela primeira vez, por volta de 1500, como um produto da natureza com

poder curativo extraordinário. Eram usados para curar um grande número de enfermidades, como feridas e inflamações de diversas naturezas. Seu uso não era restrito apenas a suas propriedades medicinais, também eram usados como aromatizantes (incenso) e repelentes naturais (Fig. 1). Hoje em dia, os óleos de copaíba são bastante conhecidos e estão entre os produtos naturais mais utilizados na medicina popular (Veiga-Junior e Pinto, 2002).



Figura 1. Esquema com as principais utilizações dos óleos de copaíba (*Copaifera* sp.).
Fonte: o autor.

Os óleos de copaíba são exsudatos obtidos por extração direta dos troncos das árvores do gênero *Copaifera*. Apesar da produção de oleoresinas ser a principal característica deste gênero, nem todas as árvores de copaíba produzem óleos. A produção desses óleos por árvore pode variar entre 0,3 L e 3,0 L, podendo alcançar uma produção máxima de até 30,0 L. A variação na produtividade dos óleos de copaíba é muito grande e diversos estudos já foram realizados, a fim de descobrir quais fatores podem influenciar nessa produtividade.

A produção dos óleos de copaíba pode variar de acordo com a espécie e também com as características morfológicas numa mesma espécie. Estudos têm mostrado que as variações morfológicas observadas em *Copaifera reticulata* tem influenciado na produção dessas oleoresinas e também em suas características físico-químicas, como a

coloração dos óleos. Dependendo das características morfológicas, a produção dessas oleoresinas pode variar de 0,35 L a 6,17 L. Quatro morfotipos já foram descritos para *C. reticulata* (copaíba preta, copaíba amarela, copaíba branca e copaíba vermelha) e a copaíba preta mostrou maior produtividade de óleos em relação aos demais morfotipos, com rendimento médio de 3,84 L por árvore (Rigamonte-Azevedo et al., 2006).

Em *Copaifera multijuga* o diâmetro (DAP) das copaibeiras parece exercer influência na produção das oleoresinas. Medeiros e Vieira (2008) mostraram que as árvores de *C. multijuga* mais robustas, ou seja, aquelas com diâmetros dos troncos maiores ($DAP \geq 41,0$ cm) apresentam maior produtividade de óleos. Sua produtividade é cerca de quatorze vezes superior (4,2 L/árvore) às árvores pequenas, cujo diâmetro variou entre 30,0 e 40,0 cm. A infestação por cupins também mostrou forte tendência na produtividade dos óleos de *Copaifera multijuga*, indicando que a produção dessas oleoresinas pode estar relacionada ao mecanismo de defesa das copaibeiras. Apesar da sazonalidade não mostrar uma relação direta com a produção dessas oleoresinas, a infestação por cupins é mais propensa a acontecer no período de maior precipitação, cuja umidade é mais elevada (Medeiros e Vieira, 2008).

A maior produção das oleoresinas de *Copaifera multijuga* em árvores com grandes diâmetros pode estar relacionada com o percentual do cerne das copaibeiras. Árvores com diâmetros pequenos possuem alburno, mas, não possuem cerne e com o crescimento radial do tronco, o cerne torna-se cada vez mais espesso (Medeiros et al., 2018). Estudos mais detalhados mostraram que não há diferenças anatômicas entre árvores produtivas e não produtivas. No entanto, as árvores produtivas apresentam maior diâmetro dos vasos e a quantidade de células portadoras de óleo é superior às árvores improdutivas. Contudo, o óleo é armazenado no cerne das copaibeiras, indicando que a carência do cerne pode influenciar diretamente no armazenamento da oleoresina (Medeiros et al., 2020).

Muitos fatores ambientais, tal como a cobertura florestal (floresta aberta e floresta densa), natureza do ambiente edáfico (baixio e terra firme) e a textura do solo já foram investigadas. Entretanto, cada espécie do gênero *Copaifera* tende a responder de uma forma diferente. Em *C. reticulata* e *C. paupera* a cobertura florestal e a natureza do ambiente edáfico não apresentaram nenhuma influência na produtividade dos óleos de copaíba. Embora haja relatos da influência positiva desses fatores na produção de alguns óleos (Rigamonte-Azevedo et al., 2006).

A textura do solo também parece influenciar na produtividade dos óleos de *C. multijuga*. No Amazonas, a maior produtividade dos óleos de copaíba dessa espécie foi observada nas árvores cultivadas em solos argilosos, com rendimentos de 0,23 L por árvore (Alencar, 1982). Estudos mais recentes têm corroborado a maior produtividade dos óleos dessa espécie nesse tipo de solo, com rendimentos bem superiores aos já relatado. Cinquenta e três por cento das árvores de *C. multijuga* cultivadas em solos argilosos, também no Amazonas, apresentaram alta produtividade de óleos com rendimentos de até 7,2 L por árvore (Medeiros e Vieira, 2008).

3.3. Composição química dos óleos de copaíba (*Copaifera* sp.)

Os óleos de copaíba são oleoresinas constituídas por substâncias voláteis e resinosas. A composição volátil dessas oleoresinas é formada predominantemente por sesquiterpenos e a composição resinosa, por diterpenos. O teor desses terpenoides pode variar de acordo com a particularidade de cada espécie. Algumas espécies apresentam alto teor sesquiterpênico e outras, apresentam alto teor diterpênico. A composição desses constituintes também pode variar qualitativamente, quantitativamente e também quanto ao número de substâncias (Cascon e Gilbert, 2000; Veiga-Junior et al., 2007). Entre os espécimes, as variações quantitativas são mais frequentes (Herrero-Jáuregui et al., 2011; Barbosa et al., 2012; Barbosa et al., 2013; De Oliveira et al., 2017). Algumas características

são comuns no gênero *Copaifera*, como a presença do β -cariofileno e do ácido copálico; esses dois constituintes estão presentes em todos os óleos de copaíba em concentrações variáveis (Leandro et al., 2012).

Os sesquiterpenos são os terpenoides mais abundantes nos óleos de copaíba. Aproximadamente 110 sesquiterpenos distintos já foram identificados nesses óleos (Leandro et al., 2012). O β -cariofileno, o *trans*- α -bergamoteno e o β -bisaboleno são os sesquiterpenos majoritários em muitos óleos de copaíba. No entanto, outros sesquiterpenos, como o β -elemeno, α -copaeno e δ -cadineno também são relatados em um grande número de óleos, porém, em menor concentração (Fig. 2). Embora, os sesquiterpenos oxigenados, como o α -cadinol, guaiol e bisabolol também sejam relatados nos óleos de copaíba, a maior parte da composição sesquiterpênica é constituída por hidrocarbonetos sesquiterpênicos (Veiga-Junior et al., 2007; Bardají et al., 2016; Da Silva et al., 2020).

Os diterpenos correspondem à composição resinosa dos óleos de copaíba e dependendo da espécie, o seu teor pode variar até 68,0 % da composição do óleo. *Copaifera multijuga* é uma das espécies do gênero *Copaifera* que apresenta o menor percentual diterpênico. Mesmo considerando as variações na sua composição química, que na maioria das vezes são causadas por fatores ambientais, o teor diterpênico nessa espécie não ultrapassa 20,0 % da composição do óleo (Cascon e Gilbert, 2000; Veiga-Junior et al., 2007; Barbosa et al., 2012; Barbosa et al., 2013). Por outro lado, *C. guianensis* e *C. Duckei* são constituídas majoritariamente por diterpenos, com teores aproximados de 56,5 % e 68,0 %, respectivamente (Cascon e Gilbert, 2000; Veiga-Junior et al., 2007). Outras espécies do gênero, como *C. cearensis* e *C. officinalis* (Jacq.) L. apresentam uma composição intermediária, em torno de 30,0 % (Veiga-Junior et al., 2007; Galúcio et al., 2016). Cerca de 42 diterpenos distintos já foram detectados nos óleos de copaíba. Os diterpenos ácidos são os mais abundantes e os ácidos copálico, poliáltico,

hardwickiico, clorechínico e caurenoico são os diterpenos mais comuns nos óleos de copaíba (Cascon e Gilbert, 2000; Veiga-Junior et al., 2007; Galúcio et al., 2016).

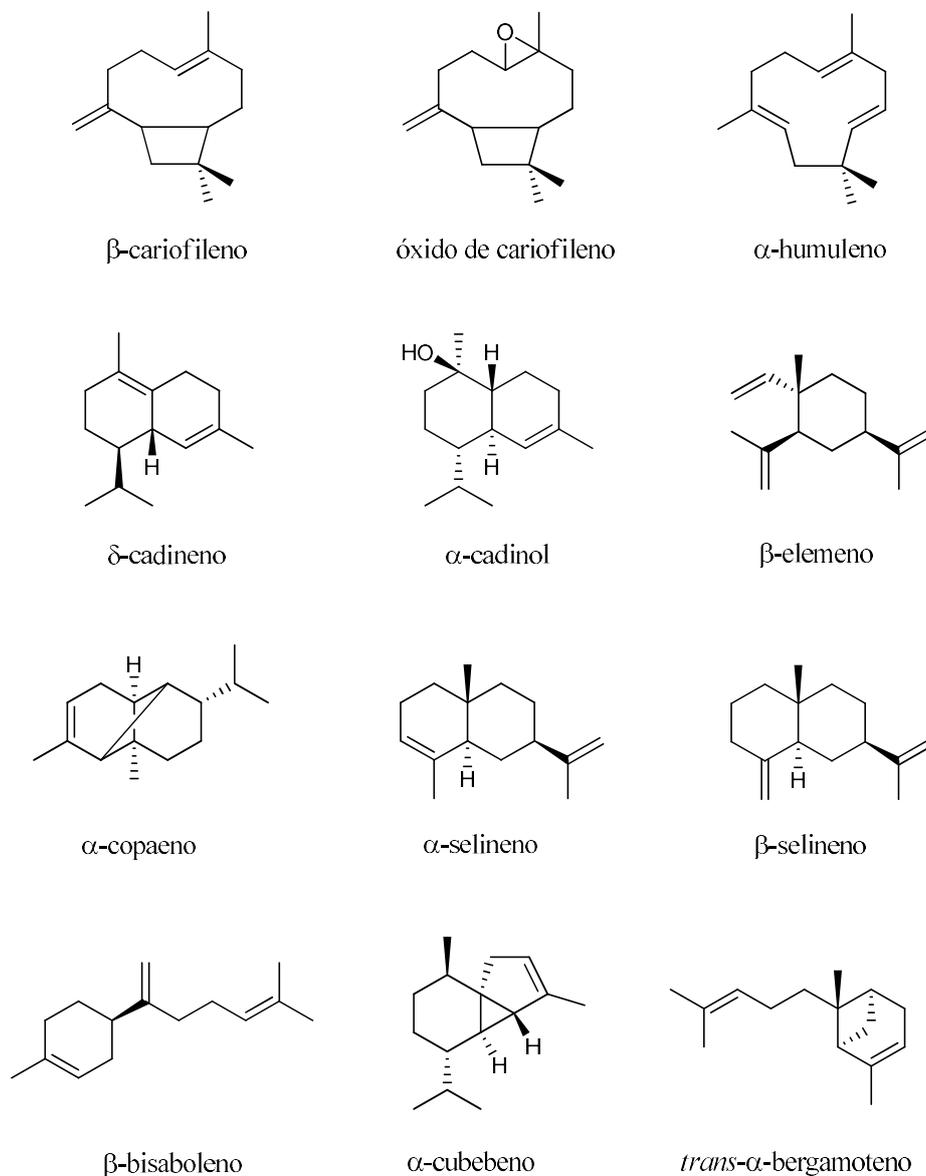


Figura 2. Principais sesquiterpenos identificados nos óleos de copaíba (*Copaifera* sp.).

As oleoresinas do gênero *Copaifera* apresentam uma certa especificidade quanto a sua composição química, devido à produção desigual dos seus constituintes. Alguns óleos como os de *C. multijuga* apresentam uma produção abundante do β -cariofileno (13,0 % a 70,0 %) e do ácido copálico (0,15 % - 11,0 %) (Barbosa et al., 2012; Barbosa et al., 2013; De Lima et al., 2020); outros, como os de *C. guianensis* e *C. Duckei* apresentam alto teor dos ácidos poliáltico (10,0 % a 28,0 %), hardwickiico (11,0 % a 24,0

%) e caurenoico (17,0 % a 25,0 %) (Cascon e Gilbert, 2000), e as oleoresinas de *C. reticulata* são fontes abundantes do *trans*- α -bergamoteno (21,99 %), do β -bisaboleno (24,91 %) e também do ácido caurenoico (Bardají et al., 2016).

Essas particularidades se estendem também a outras características como cor, densidade e viscosidade dos óleos de copaíba. Alguns óleos são mais viscosos e outros são menos, alguns apresentam alta densidade, outros baixa e suas cores podem variar do amarelo ao marrom, em tons mais claros a mais escuros (Rigamonte-Azevedo et al., 2004). Os óleos de copaíba mais viscosos apresentam maior teor de diterpenos em sua composição, enquanto que os menos viscosos, normalmente apresentam baixo teor desses constituintes. Os óleos de copaíba menos viscosos, ou seja, aqueles com características mais líquidas e aromáticas, são preferencialmente utilizados pelas indústrias de cosméticos e perfumes, devido ao alto teor sesquiterpênico que apresentam. O teor sesquiterpênico desses óleos e a presença maioritária de alguns terpenos voláteis como o β -cariofileno, têm favorecido a utilização dessas oleoresinas na formulação de muitos cosméticos. De forma similar, os óleos mais escuros e viscosos são preferencialmente utilizados para fins medicinais (Veiga-Junior e Pinto, 2002).

A composição volátil dos óleos de copaíba apresenta aplicações importantes nas indústrias de cosméticos e perfumes, onde são usados como fixadores de fragrâncias e aromatizantes. Por muitos anos, essa fração foi extensivamente estudada e foi responsável pelas grandes exportações no Brasil (Veiga-Junior e Pinto, 2002). Desde as primeiras utilizações dos óleos de copaíba até os dias atuais, tanto a extração dessas oleoresinas quanto a obtenção da sua fração volátil foram aprimoradas ao longo dos anos. Várias formas de obtenção da fração volátil como a hidrodestilação (Da Silva et al., 2019), a destilação molecular (Galúcio et al., 2016; Ribeiro et al., 2018) e a extração por headspace (Dias et al., 2012; Da Silva et al., 2020) já foram investigadas.

Embora a composição volátil seja bastante estudada, a composição resinosa dos óleos de copaíba (Fig. 3) também tem sido amplamente investigada. Vários estudos têm sido desenvolvidos a fim de associar a utilização medicinal dos óleos de copaíba com seus diterpenos isolados ou até mesmo com misturas menos complexas que o próprio óleo (Veiga-Junior et al., 2006; Abrão et al., 2015; Borges et al., 2016; Alves et al., 2017; Nakamura et al., 2017; Barbosa et al., 2019; Dalenogare et al., 2019).

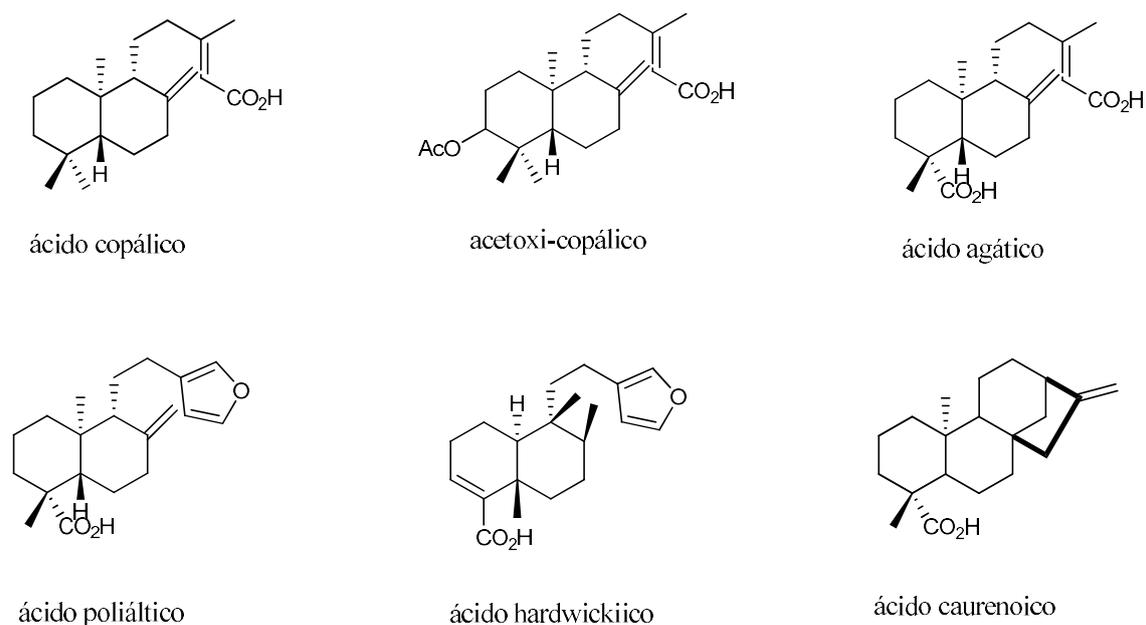


Figura 3. Estruturas dos principais diterpenos identificados nos óleos de copaíba (*Copaifera* sp.).

A oleoresina de *C. reticulata* e suas frações neutra e ácida foram investigadas quanto ao seu efeito antibacteriano. Tanto a oleoresina quanto a fração ácida e seus respectivos diterpenos mostraram atividades significativas contra as bactérias gram-positiva *Enterococcus faecium* (IC₅₀ de 4,2 e 4,8 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* (5,3 e 7,2 µg/mL), indicando ser essa a fração responsável por tal atividade. Com exceção do ácido agático, todos os outros diterpenos que constituíam a fração ácida mostraram-se ativos contra as duas cepas bacterianas, sendo que os ácidos caurenico (2,3 e 3,4 µg/mL⁻¹), colavênico (2,2 e 3,0 µg/mL⁻¹) e (13*E*) – *ent* - labda - 7,13 - dien-15 - oico (1,6 e 2,5 µg/mL⁻¹) mostraram-se fortemente ativos. Dos seis diterpenos que constituíam a fração

ácida, o ácido poliáltico mostrou-se altamente promissor por apresentar não somente atividade antibacteriana, mas também fungicida contra dermatófitos de *Trichophyton*. Esses resultados, associados a muitos outros disponíveis na literatura, justificam a utilização medicinal dessa oleoresina contra infecções da pele e do trato urinário (Barbosa et al., 2019).

Outras oleoresinas também já foram avaliadas quanto às suas propriedades biológicas e de seus compostos isolados. Em *C. multijuga* os constituintes mais investigados são o ácido copálico e seus derivados hidroxilado e acetoxilado. As atividades antifúngicas dessa oleoresina contra as cepas *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum gypseum* também já foram investigadas e são atribuídas à presença do ácido copálico, diterpeno maioritário com forte potencial fungicida (Nakamura et al., 2017). Estudos também indicam que efeito protetor dessa oleoresina contra carcinógenos do cólon pode estar relacionado a esse diterpeno (Alves et al., 2017). Em *C. Duckei* o efeito esquistossomicida relatado a sua oleoresina é atribuído ao ácido poliáltico, que mostrou-se altamente promissor nos ensaios realizados *in vitro* (Borges et al., 2016) e o efeito analgésico da oleoresina de *C. officinalis* foi atribuído ao ácido caurenoico (Dalenogare et al., 2019).

A maior parte das atividades biológicas dos óleos de copaíba pode estar relacionada a esses diterpenos, visto que, muitos deles já foram investigados isoladamente e comprovado seu potencial biológico. Todavia, a ação combinada dos vários constituintes que compõem os óleos de copaíba pode contribuir positivamente, como é o caso da maior parte das oleoresinas, mas também, pode ter efeito contrário, com a redução das atividades biológicas. Os óleos de *C. langsdorffi* mostraram-se inativos quanto às suas propriedades antiproliferativas e antibacteriana, no entanto, o ácido copálico, isolado dessa mesma oleoresina mostrou-se fortemente ativo (Abrão et al., 2015).

Além dos óleos de copaíba apresentarem um grande número de aplicações medicinais comprovadas cientificamente, eles também funcionam como matéria-prima para obtenção de terpenos bioativos (Vargas et al., 2015). Os diterpenos relatados nos óleos de copaíba apresentam esqueletos cauranos, clerodanos e labdanos, os dois últimos correspondem a maior parte dos diterpenos já relatados (Fig. 4). Essa especificidade na produção dos diterpenos possibilita a formação de um grande número de diterpenos com características estruturais próximas (Veiga-Junior e Pinto, 2002). Nesse sentido, com pequenas modificações estruturais é possível potencializar muitas das atividades biológicas já relatadas para esses diterpenos e investir na descoberta de novas atividades biológicas. Essas modificações incluem desde a inserção de novos grupos funcionais à simples substituição de alguns grupos (De Souza et al., 2019; Çiçek et al., 2020).

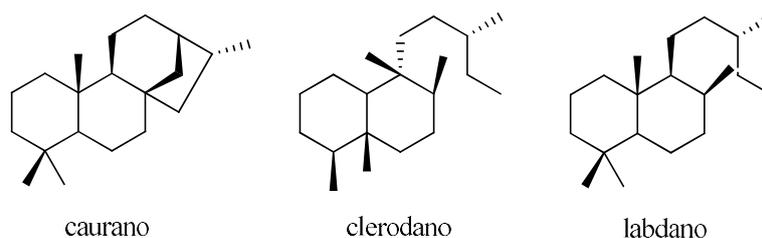


Figura 4. Esqueletos dos principais diterpenos identificados nos óleos de copaíba (*Copaifera* sp.).

3.4. Adulteração dos óleos de copaíba (*Copaifera* sp.)

Os diterpenos de copaíba, assim como alguns sesquiterpenos, podem atuar como marcadores químicos no controle de qualidade e na autenticidade de muitas oleoresinas do gênero *Copaifera*. O monitoramento desses marcadores auxilia no processo de caracterização e identificação das espécies desse gênero, visto que cada oleoresina apresenta uma impressão digital específica de cada espécie. A autenticidade dos óleos de copaíba envolve uma série de fatores que vão desde os cuidados básicos no momento da coleta até o armazenamento adequado nas prateleiras das farmácias e feiras. As primeiras adversidades dos óleos de copaíba já começam no momento da coleta, quando sem muita

compreensão, oleoresinas de várias espécies diferentes do gênero *Copaifera* são misturadas (Veiga-Junior, Patitucci e Pinto, 1997; Veiga-Junior e Pinto, 2002). Na maioria das vezes a distinção entre as oleoresinas é realizada com base nas características físico-químicas dos óleos ou até mesmo nas características morfológicas das copaibeiras. Hoje sabemos que esses critérios são insuficientes para classificação e definição das oleoresinas deste gênero, visto que há variações morfológicas nas copaibeiras de uma mesma espécie e também há variações na cor, densidade e viscosidade do óleo entre as diferentes espécies do gênero *Copaifera* (Rigamonte-Azevedo et al., 2006).

A prática da adulteração dos óleos de copaíba vem sendo relatada desde o início do século XX, quando essas oleoresinas eram misturadas a outros óleos de menor valor agregado, visando maior rentabilidade, como os óleos de *Calophyllum brasiliense* e das espécies do gênero *Dipterocarpus* (bálsamo de gurjum), que, de forma similar aos óleos de copaíba, são obtidos dos troncos das árvores de suas espécies e também apresentam aroma amadeirado (Veiga-Junior e Pinto, 2002). Atualmente, a adulteração mais comum dos óleos de copaíba consiste na adição de óleos vegetais comestíveis, como óleos de soja. Esses óleos adulterantes apresentam cor, densidade e viscosidade parecidos aos óleos de copaíba e por isso, são facilmente despercebidos (Veiga-Junior e Pinto, 2005).

A detecção das adulterações nos óleos de copaíba tem sido realizada com êxito através da cromatografia em fase gasosa (CG-DIC e CG-EM) (Veiga-Junior, Patitucci e Pinto, 1997; Veiga-Junior e Pinto, 2005). Além dos méritos que já são conhecidos, como a rapidez em suas análises e a alta reprodutibilidade e sensibilidade, a técnica fornece uma impressão digital fidedigna dos óleos de copaíba, proporcionando a detecção dos sesquiterpenos e diterpenos numa única análise (Patitucci et al., 1995). Além dessas vantagens, a CG permite a detecção das adulterações mais comuns nos óleos de copaíba que são as adulterações com óleos vegetais e minerais (Veiga-Junior e Pinto, 2005).

Essas adulterações são detectadas por CG pela mudança no perfil cromatográfico dos óleos de copaíba e pela presença de íons característicos dos óleos adulterantes. As adulterações com óleos vegetais são caracterizadas pela redução do número de picos na região sesquiterpênica e pela presença de picos de ácidos graxos na região diterpênica. Por outro lado, as adulterações com óleos minerais são percebidas pela abundante presença de picos de hidrocarbonetos lineares na região central do cromatograma (Veiga-Junior e Pinto, 2005). As misturas entre óleos de várias espécies do gênero *Copaifera* também podem ser detectadas por cromatografia em fase gasosa. O aumento do número de picos de forma exacerbada no perfil cromatográfico dessas oleoresinas, seja na região sesquiterpênica ou diterpênica é o principal indicativo (Veiga-Junior, Patitucci e Pinto, 1997).

Técnicas mais simples, como a espectroscopia no infravermelho próximo, também têm sido relatadas na detecção da pureza e autenticidade dos óleos de copaíba. Moreira e colaboradores (2018) descrevem a utilização de um espectrofotômetro portátil como método alternativo para análises *in loco* da pureza dos óleos de *Copaifera langsdorffi*. Outras metodologias comuns em análises de óleos vegetais, como índice de acidez, também são comumente usadas nas análises de óleos de copaíba como parâmetro de autenticidade do óleo. Entretanto, apesar do baixo custo e de não exigir grandes estruturas laboratoriais, o índice de acidez não considera a grande variação na composição química que existe entre as oleoresinas das espécies do gênero *Copaifera* (Vasconcelos e Godinho, 2002).

3.5. Oleoresinas de *Copaifera multijuga*

As oleoresinas de *C. multijuga* são conhecidas pela alta concentração do β -cariofileno e pelo elevado teor da sua composição sesquiterpênica. Cerca de 90,0% da composição dessas oleoresinas são constituídas por terpenos voláteis com características

aromáticas. Esses óleos apresentam forte aroma amadeirado (Sköld et al., 2006) devido ao alto teor do β -cariofileno, cuja concentração relativa pode atingir até 70,0% da composição do óleo. Sua composição resinosa é constituída por um número reduzido de diterpenos, com predominância do ácido copálico (Cascon e Gilbert, 2000; Veiga-Junior e Pinto, 2007; Barbosa et al., 2012; Barbosa et al., 2013; De Lima et al., 2020).

Os óleos de *C. multijuga* também apresentam variações na sua composição química. Devido ao forte efeito anti-inflamatório dessas oleoresinas, vários estudos foram desenvolvidos a fim de investigar essas variações. A concentração do β -cariofileno pode variar de 5,08% a 64,04% nos óleos dessa espécie. O óxido de cariofileno, também é comumente relatado e sua concentração relativa pode variar de 0,20% a 36,43% (Cascon e Gilbert, 2000; Barbosa et al., 2012; Barbosa et al., 2013; De Lima et al., 2020); e ainda, alguns óleos de *C. multijuga* podem apresentar uma composição maioritária do *trans*- α -bergamoteno e do germacreno D. A composição química dos óleos dessa espécie tende a variar com a composição do solo. Oleoresinas originadas de árvores cultivadas em solos arenosos tendem a apresentar uma composição química mais complexa (maior número de constituintes terpênicos) que aquelas cultivadas em solos argilosos (Barbosa et al., 2012).

Mesmo as oleoresinas de uma mesma espécie coletadas sob as mesmas condições, como sazonalidade, tipo de solo e diâmetro à altura do peito, tendem a apresentar variação na sua composição química. A variação dos constituintes terpênicos entre os espécimes de *C. multijuga* é relativamente grande. O número de sesquiterpenos pode variar de 17 a 39 e de 2 a 10 para os diterpenos. Além das variações qualitativas, as variações quantitativas também são pronunciadas. Mas, de forma geral e simplista, os óleos de *C. multijuga* podem apresentar três perfis principais de composição química. O mais comum e recorrente, é a oleoresina com alta concentração do β -cariofileno, com teor superior a 50,0 % da composição do óleo. Mas também é possível encontrar aquelas cujo

teor do β -cariofileno é inferior a 50,0%. Por outro lado, também é possível encontrar óleos de *C. multijuga* em que a composição principal é constituída pelo óxido de cariofileno (Barbosa et al., 2013). Embora haja relatos que mostrem a presença autêntica desse sesquiterpeno oxigenado nos óleos de copaíba (Cascon e Gilbert, 2000; De Lima et al., 2020), alguns estudos sugerem sua presença como produto da oxidação do β -cariofileno (Barbosa et al., 2012; Leandro et al., 2012).

Ainda que o β -cariofileno seja o principal constituinte terpênico dos óleos de *C. multijuga*, outros sesquiterpenos como o α -copaeno, α -humuleno, α e β -selineno, β -bisaboleno, δ -cadineno, α e δ -cadinol, α -santalol e germacreno B e D também foram relatados nos óleos dessa espécie (Veiga-Junior e Pinto, 2002; Sant'Anna et al., 2007; Barbosa et al., 2012; Barbosa et al., 2013; De Lima et al., 2020). Esses constituintes terpênicos são particularmente importantes devido suas aplicações nas indústrias de cosméticos, perfumes e farmacêutica (Veiga-Junior e Pinto, 2002). O β -cariofileno, especificamente, apresenta excelentes propriedades emolientes, é de fácil absorção na pele, é um excelente fixador de fragrâncias; e ainda apresenta atividades anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, entre muitas outras (Fernandes et al., 2007; Leandro et al., 2012; Ames-Sibin et al., 2018).

Tendo em vista a alta concentração desse sesquiterpeno, a maior parte dos estudos sobre os óleos de *C. multijuga* associam seu uso medicinal ao β -cariofileno (Veiga-Junior et al., 2007). Outras investigações visam a desenvolver o potencial farmacológico dessas oleoresinas com preparação de nanoemulsões e complexação com ciclodextrinas (Dias et al., 2014; Lucca et al., 2015; Pinheiro et al., 2017). O desenvolvimento de nanoemulsões com óleos dessa espécie tem contribuído para o aumento da capacidade de absorção na pele, potencializando os efeitos anti-inflamatórios dos óleos de *C. multijuga* (Lucca et al., 2015). De forma análoga, a complexação dessas oleoresinas com β -ciclodextrinas também tem sido relatada como alternativa para melhorar a estabilidade e solubilidade

aquosa dos óleos de *C. multijuga*, melhorando sua biodisponibilidade oral (Pinheiro et al., 2017).

3.6. Caracterização Química dos óleos de copaíba

A cromatografia em fase gasosa (CG) é a técnica clássica utilizada para caracterização química dos óleos de copaíba (Cascon e Gilbert, 2000; Veiga-Junior e Pinto, 2005; Veiga-Junior et al., 2007; De Lima et al., 2020). A rápida detecção da CG associada à alta eficiência das colunas capilares permite que misturas complexas, como os óleos de copaíba, sejam analisadas numa única análise, em curto período de tempo (Patitucci et al., 1995). As análises dos óleos de copaíba normalmente são realizadas por cromatografia em fase gasosa com detector de chamas (CG-DIC) e por cromatografia em fase gasosa com detector de massas (CG-EM) (Barbosa et al., 2012; Barbosa et al., 2013, Xavier-Junior et al., 2017).

A CG-DIC e a CG-EM são técnicas cromatográficas complementares que fornecem informações quantitativas e qualitativas a respeito do analito. Tendo em vista que grande parte dos compostos orgânicos é constituído por carbono e hidrogênio, a CG-DIC atende satisfatoriamente a detecção e quantificação de um grande número de substâncias (Bonato, 2006). A variedade de fontes de ionização também permite que a espectrometria de massas seja aplicada a um grande número de analitos; quando acoplada à cromatografia a gás, ela fornece informações específicas sobre a massa molecular e os principais fragmentos de íons dos constituintes analisados; além disso, a EM fornece informações relevante sobre a pureza de um determinado composto (Do Nascimento et al., 2018). Entretanto, apesar de todas as vantagens que a CG oferece, a esterificação dos óleos de copaíba, que é uma condição necessária para análise dessas oleoresinas por CG, parece ser uma grande limitação. As dificuldades incluem a ineficiência das reações de esterificação, o número de etapas envolvidas, que na maioria das vezes são muitas, a

qualidade do produto formado, que geralmente envolve a degradação dos constituintes terpênicos, formação de artefatos, e o alto custo dos reagentes de esterificação (Bonato, 2006).

Como alternativa simples e barata, os óleos de copaíba têm sido destilados para separação da fração volátil da resinosa, dispensando a derivatização. Dessa forma, os constituintes voláteis dos óleos de copaíba são analisados por cromatografia em fase gasosa (CG-DIC/CG-EM) (Sousa et al., 2011) e os constituintes resinosos, remanescentes do processo de destilação, na maioria das vezes são analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Bardají et al., 2016; Da Silva et al., 2017; Carneiro et al., 2018). No entanto, a destilação das oleoresinas pode levar à perda dos constituintes por evaporação, e também, por outros processos envolvidos na destilação do óleo; além de possíveis oxidações, que contribuem para o aumento do percentual dos constituintes oxigenados (Veiga-Junior e Pinto, 2002).

Embora haja relatos sobre a destilação dos óleos de copaíba, estudos indicam a baixa eficiência na hidrodestilação desses óleos (Xavier-Júnior et al., 2017). Outra alternativa que também tem sido relatada, porém, não tão acessível quanto a hidrodestilação, é a destilação molecular (Galúcio et al., 2016; Ribeiro et al., 2018) e a extração por headspace, combinada com a CG (Da Silva et al., 2019). As duas técnicas de extração são direcionadas para obtenção e/ou purificação da fração volátil; são realizadas com tempo de extração e quantidade de oleoresinas bem reduzida em relação a hidrodestilação, e em condições muito mais brandas (Da Silva et al., 2020).

Os óleos de copaíba *in natura* também podem ser analisados integralmente por cromatografia líquida de alta eficiência; quando analisados por CLAE não necessitam da etapa da esterificação, mas, devido sua composição diterpênica, demandam de tempos longos de análises (Souza et al., 2012). Alternativamente, podem ser destilados ou fracionados; porém, envolvem muitas etapas desde a purificação das frações ou

isolamento dos constituintes até as análises em CLAE (Carneiro et al., 2018), ao contrário da CG (Patitucci et al., 1995).

3.6.1. Cromatografia em fase gasosa

A CG é uma técnica analítica bastante utilizada devido ao seu alto poder de resolução e sensibilidade. Com o advento das colunas capilares, em 1958, e sua hifenação com a espectrometria de massas (CG-EM), a CG se estendeu a muitos outros seguimentos, além da química de produtos naturais. É uma técnica altamente sensível com detecção de 0,20 nanogramas e por isso não necessita de grandes quantidades da amostra. O funcionamento básico de um cromatógrafo a gás consiste em três etapas principais, que correspondem a: (i) injeção da amostra, (ii) separação e (iii) detecção dos constituintes (Fig. 5). Para tanto, alguns critérios como a volatilidade e estabilidade térmica dos constituintes devem ser considerados (Harris, 2012).

A injeção da amostra pode ocorrer de forma manual ou automatizada e no caso das injeções em CG-DIC e CG-EM são realizadas com controle de temperatura. O sistema de injeção é constituído pela seringa de injeção, septo e liner. A amostra é introduzida no sistema cromatográfico pelo injetor, que permite que haja divisão de fluxo do analito. O divisor de fluxo (*split* e *splitless*) permite que amostras de baixa concentração ou em quantidades traços sejam analisadas com eficiência pela CG. O injetor deve ser previamente aquecido a uma temperatura superior ao ponto de ebulição dos constituintes, de forma que favoreça sua volatilização e os introduza na coluna cromatográfica. O controle da temperatura deve ser ajustado conforme as características de cada amostra, no entanto, temperaturas excessivamente altas podem levar a decomposição dos constituintes. Devido à alta sensibilidade da CG, grandes volumes da amostra pode interferir na qualidade dos cromatogramas, gerando picos largos e assimétricos (Do Nascimento et al., 2018).

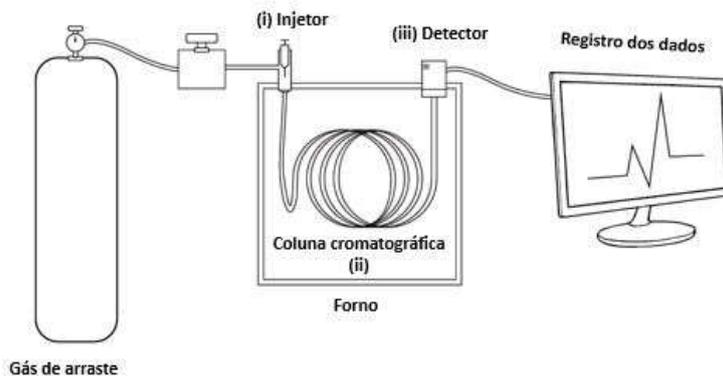


Figura 5. Componentes principais do cromatógrafo a gás.

Fonte: o autor.

A separação dos constituintes é realizada na coluna cromatográfica, que consiste em tubos inertes contendo a fase estacionária. Com o aprimoramento da cromatografia a gás, as colunas recheadas foram substituídas gradativamente por colunas capilares; essas colunas consistem em tubos muito finos (0,10 a 0,75 mm) em relação as colunas recheadas, têm maior comprimento (10 a 100 metros) e são revestidas internamente por um filme fino contendo a fase estacionária. A redução no diâmetro das colunas capilares e o aumento do seu comprimento têm contribuído para análises mais eficientes em amostras complexas em tempo reduzido de análise. As colunas capilares diferem entre si quanto as suas dimensões (comprimento, diâmetro interno e espessura do filme) e quanto as suas estruturas internas. As mais comuns, são as colunas capilares com parede recoberta, que têm a parede interna do capilar revestida por um filme da fase estacionária líquida (0,1 a 5 μm); também estão disponíveis colunas capilares em que o revestimento interno possui uma camada de um adsorvente, que são partículas sólidas; esses adsorventes podem ou não estar envolvidos pelo filme líquido da fase estacionária; as primeiras são chamadas de colunas capilares com suporte recoberto, por apresentarem um filme da fase estacionária sobre a camada do adsorvente; quando a coluna capilar é revestida internamente apenas pelo adsorvente são chamadas de colunas capilares com camada porosa (Bonato, 2006).

A escolha da fase estacionária líquida depende das características estruturais do analito, colunas com revestimento interno apolar (ex.: 100% de dimetilpolisiloxano) são mais indicadas para caracterização de analitos apolares e revestimentos polares (ex.: polietilenoglicol) para constituintes polares (Harris, 2012). Outra característica que deve ser considerada na seleção da fase estacionária consiste em sua estabilidade física e química, que influencia diretamente no bom funcionamento da coluna; esses aspectos são importantes porque a estabilidade física proporciona maior aderência do filme líquido no suporte, evitando danificação e perda de fase por volatilização, devido as altas vazões do gás de arraste. A estabilidade química proporciona maior resistência do filme líquido em altas temperaturas, evitando decomposição da fase (Bonato, 2006).

Os detectores mais usados na CG são o detector de ionização de chamas (DIC) e o detector de massas (EM). O detector de ionização de chamas é bastante popular devido aos seus níveis de detecção (2 pg/s) e resposta quase universal, uma vez que detecta a maioria dos compostos orgânicos. O princípio da ionização de chamas consiste na queima do analito e na formação e detecção de íons. Após a injeção da amostra e separação dos constituintes na coluna cromatográfica, com o auxílio do gás de arraste, os constituintes são levados até o detector, onde são queimados numa chama, alimentada por gás hidrogênio (fonte de ignição) e oxigênio (comburente); a queima das moléculas leva a formação dos íons, que são coletados por um eletrodo e registrados, na forma de um cromatograma. O detector de ionização de chamas é sensível ao fluxo da massa que passa por ele num determinado tempo, e sua resposta é proporcional ao número de átomos de carbono e hidrogênio na molécula; a qualidade da chama também pode interferir na detecção dos íons (Bonato, 2006; Harris, 2012).

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica que tem ganhado muita repercussão por sua grande aplicabilidade; sua combinação com técnicas cromatográficas como a CCD, CLAE e CG tem contribuído consideravelmente para sua expansão e

caracterização de um grande número de constituintes (polares e apolares). Quando combinada com a cromatografia a gás (CG-EM), a EM confirma a identidade dos constituintes separados por CG, através dos seus principais fragmentos de íons; além disso, fornece informações relevantes sobre a pureza do analito, sendo bastante usada no monitoramento da autenticidade e adulterações de muitos produtos comerciais (Do Nascimento et al., 2018). A detecção na CG-EM consiste em três etapas que envolve a fonte de ionização, o analisador e a detecção dos íons; os constituintes separados na coluna cromatográfica são introduzidos no espectrômetro de massas, com o auxílio do gás de arraste, e passam pela fonte de ionização, onde são ionizados.

A ionização por impacto de elétrons é mais comum na CG-EM; nesse tipo de ionização os constituintes da amostra são bombardeados na fase gás com um feixe de elétrons de alta energia (70 eV) produzindo um cátion radical, que corresponde ao íon molecular; a energia excedente promove a fragmentação do íon molecular, gerando o espectro de massas específico de cada composto (Silverstein et al., 2010). Os íons formados são transferidos para o analisador de massas, onde são separados conforme seus valores de massa/carga (m/z); os íons separados são detectados e registrados na forma de espectros de massas (Skoog et al., 2006).

3.6.2. Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE)

A cromatografia em camada fina de alto desempenho (CCDAE ou CCDAE) é uma técnica analítica emergente que surgiu nas últimas décadas; ela consiste na forma aprimorada da cromatografia em camada delgada (CCD ou TLC) e apresenta uma série de vantagens em relação à CCD. A CCDAE tem sido usada na obtenção de impressões digitais de extratos (Pedan et al., 2018; Ebrahimi-Najafabadi et al., 2019; Johnson et al., 2020; Mulaudizi et al., 2021), produtos comerciais (Frommenwiler et al., 2019) e óleos essenciais (Rocamora et al., 2020); é amplamente empregada na detecção (Liu et al.,

2020), quantificação (Alqarni et al., 2021; Kaltbach et al., 2020) e monitoramento de marcadores químicos em diferentes matrizes como chás (Melnik et al., 2021), leguminosas (Sallam et al., 2021) e extratos vegetais (Mulaudzi et al., 2021). Também tem sido empregada na autenticação de produtos como açafrão (Amirvarese et al., 2020) e *Ginkgo biloba* (Frommenwiler et al., 2019); outras aplicações que também têm sido relatadas consistem no monitoramento de substâncias bioativas, através da bioautografia (Osman et al., 2020; Rocamora et al., 2020) e no monitoramento de muitos processos de extração (Makowicz et al., 2018; Rouhani, 2019).

A principal diferença entre a CCDAE e a CCD consiste nas características de suas placas cromatográficas; as placas de CCDAE são empacotadas com sílica gel 60 com tamanhos de partículas menores que as placas de CCD; portanto, são mais compactas e finas, e por isso, apresentam maior resolução de detecção que as placas de CCD; outras vantagens consistem no maior número de amostras analisadas em menor tempo e na reprodutibilidade das separações. As etapas envolvidas no processo de caracterização das amostras são as mesmas da CCD e consistem na preparação e aplicação do analito e na eluição e detecção dos constituintes (Fig. 6); entretanto, na CCDAE essas etapas podem ser parcialmente ou totalmente automatizadas, contribuindo pra uma maior reprodutibilidade da separação.

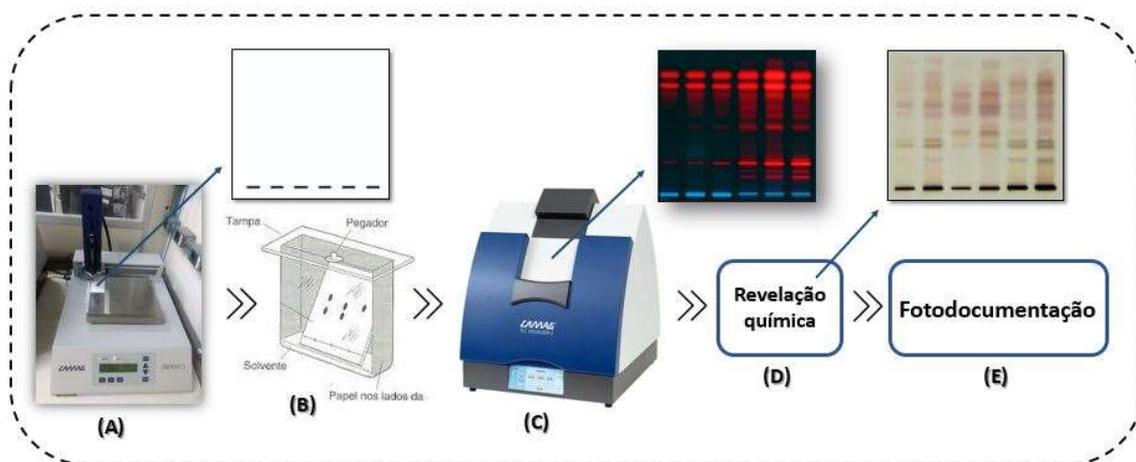


Figura 6. Ilustração das etapas para obtenção dos cromatogramas por CCDAE com aplicação semiautomática.

Legenda: **A** = Aplicação semiautomática da amostra; **B** = Eluição manual dos constituintes; **C** = Detector ultravioleta e Fotodocumentação dos cromatogramas; **D** = Revelação química; **E** = Fotodocumentação.

A espectrometria de massas (EM) tem sido empregada como técnica complementar à CCDAE. A hifenação dessas duas técnicas (CCDAE-EM) tem potencializado consideravelmente a utilização da CCDAE na caracterização de produtos naturais. A obtenção dos espectros de massas das substâncias *in loco*, sem a necessidade de purificação ou isolamento, é uma das principais vantagens da CCDAE-EM; além disso, considerando a disponibilidade das fases estacionárias, (polar, apolar, CCD, CCDAE e EM), e as interfaces disponíveis para o acoplamento com a EM, um grande número de substâncias pode ser analisada com eficiência pela CCDAE-EM (Zhang et al., 2020).

A introdução do analito no espectrômetro de massas pode ser feita por eluição ou por dessorção; no caso da eluição, os processos de aplicação, eluição, raspagem, purificação e concentração do constituinte de interesse são feitos manualmente e o analito é introduzido no espectrômetro de massas na fase líquida; no caso da dessorção, após o processo de separação na placa cromatográfica, o analito de interesse é vaporizado diretamente da camada de sílica e transferido para o espectrômetro de massas (Fig. 7).

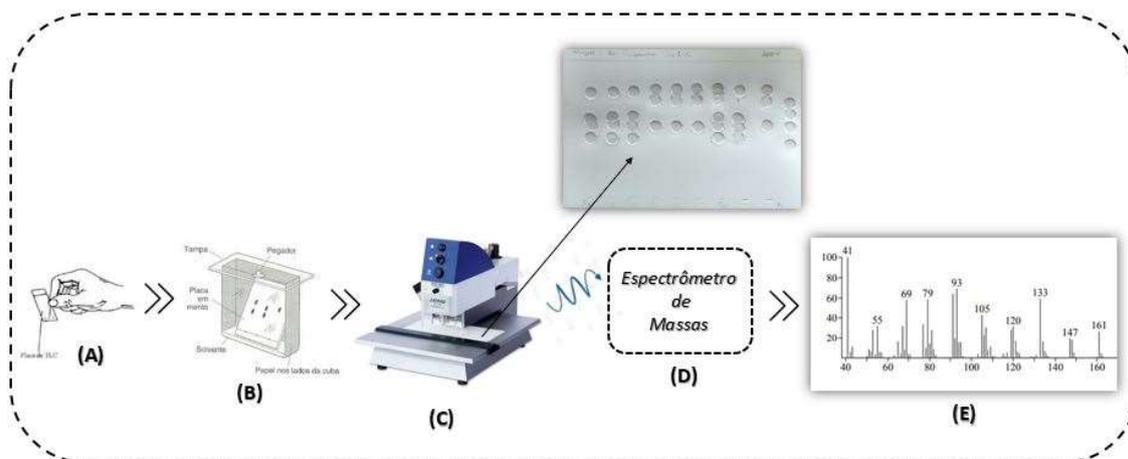


Figura 7. Ilustração das etapas para obtenção dos espectros de massas por CCDAE-EM.

Legenda: **A** = Aplicação da amostra; **B** = Eluição dos constituintes; **C** = Extração do analito de interesse Da placa de CCDAE na interface do CCD-MS; **D** = Espectrômetro de massas hifenado a interface do CCD-EM; **E** = Espectro de massas obtido da mancha de interesse.

4. Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Na Figura 8 é apresentado o fluxograma do delineamento experimental dos diferentes passos executados no projeto. Os óleos de *C. multijuga* inicialmente foram esterificados e analisados por cromatografia em fase gasosa, para confirmação de suas autenticidades e para avaliar a variação na composição química entre os 10 espécimes; devido à importância do β -cariofileno e do óxido de cariofileno nos óleos de copaíba, esses dois sesquiterpenos foram quantificados e as suas concentrações foram expressas em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após a confirmação da autenticidade dos 10 óleos de *C. multijuga*, utilizou-se a CCDAE como técnica alternativa para análises dos óleos de copaíba. Dois métodos foram propostos; o primeiro consiste na rápida detecção dos principais marcadores terpênicos, por meio do desenvolvimento do fator de retenção relativo (Rfr); e o segundo consiste na detecção de adulterantes nos óleos de *C. multijuga*.

Para o desenvolvimento do Rfr foram utilizados 8 padrões terpênicos (2 sesquiterpenos e 6 ácidos diterpênicos (previamente isolados e caracterizados no laboratório) e 1 padrão comercial de referência, o óxido de linalol; o desenvolvimento do Rfr envolveu duas etapas principais, a primeira consistiu na otimização das condições cromatográficas e na caracterização química dos padrões terpênicos por CCDAE e CCDAE-EM; a segunda etapa consistiu no desenvolvimento da curva analítica da mistura dos padrões terpênicos em função do óxido de linalol, que é nossa referência no estudo; e por fim foi estabelecido uma relação entre cada padrão terpênico e o óxido de linalol (vários outros padrões foram analisados mas o óxido de linalol foi o que apresentou os melhores resultados quanto à pureza, forma de eluição e fator de retenção diferente das regiões de sesquiterpeno e diterpenos. Estes resultados preliminares de escolha do padrão não serão mostrados). Para detecção dos adulterantes, os óleos de *C. multijuga* foram

adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções percentuais (v/v) e analisados por CCDAE; as adulterações foram confirmadas por CCDAE-EM e análises quimiométricas (HCA, PCA e PLS-DA).

A última etapa da tese teve por objetivo dar suporte às análises realizadas por CG, através da utilização de uma metodologia de esterificação rápida e eficiente para os óleos de copaíba. Para a esterificação dos óleos foram utilizadas quatro metodologias, comumente empregadas na esterificação de produtos naturais, e comparadas com uma esterificação *in situ*, realizada com TMSD; para avaliar a influência das metodologias de esterificação em óleos de copaíba com diferentes teores de ácidos diterpênicos, foram utilizadas duas oleoresinas: 1 obtida de *C. multijuga* (baixo teor diterpênico) e 1 obtida de *C. reticulata* (alto teor diterpênico); após a realização de todas as esterificações, os óleos de copaíba foram analisados por CCDAE e CG-EM. No fluxograma a seguir (Fig. 8) é apresentado o resumo dos procedimentos experimentais realizados e nas sessões 4.1 a 4.6 são apresentados com mais detalhes.

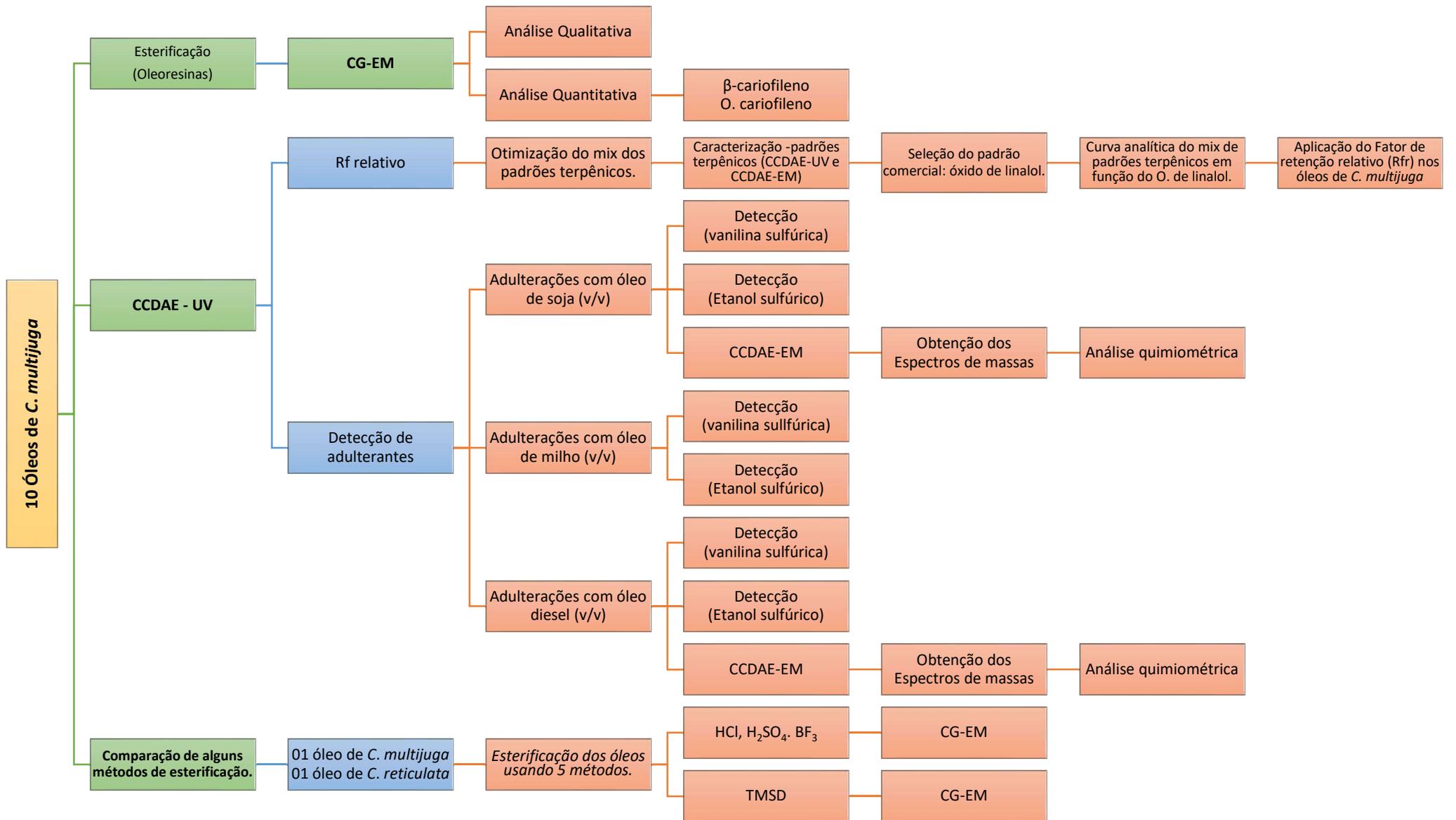


Figura 8. Delineamento Experimental.

4.1. Coleta das oleoresinas

Dez (10) oleoresinas de 10 espécimes diferentes de *Copaifera multijuga* foram coletadas nos meses de junho, julho e agosto de 2012, na Reserva Florestal Adolpho Ducke, no município de Manaus, Amazonas, Brasil (28° 57' 43'' S, 59° 55' 38'' W). As oleoresinas foram obtidas por extração direta de dez (10) árvores de *C. multijuga* (SisGen: A09F694), através de incisões no tronco com broca manual de metal. A coloração dos óleos variou de amarelo bem suave (quase incolor) ao amarelo mais intenso (Fig. 9) e visualmente observou-se uma certa variação na viscosidade das oleoresinas coletadas. Após a coleta, as oleoresinas foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas em geladeira, protegidas da luz e calor.

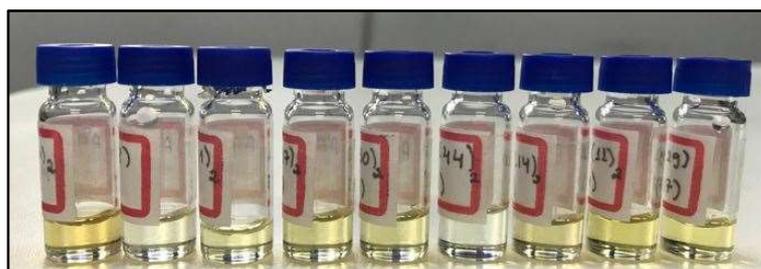


Figura 9. Óleos de *Copaifera multijuga* (OCM) coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke.

4.2. Quantificação do β -cariofileno e óxido de cariofileno em óleos de *Copaifera multijuga* Hayne por cromatografia em fase gasosa (CG-EM)

4.2.1. Derivatização dos óleos de copaíba

As oleoresinas de *C. multijuga* foram derivatizadas com o objetivo de converter os ácidos diterpênicos em ésteres correspondentes. A esterificação foi realizada utilizando o trimetilsilildiazometano (TMSD), que é um reagente de esterificação comercial, pronto para uso e disponível numa solução em hexano 2,0 molar (Sigma Aldrich). As oleoresinas foram esterificadas por uma reação *in situ*, de acordo com a metodologia descrita por

Migowska e colaboradores (2010) com pequenas modificações. Adicionou-se 220 µL de uma solução de metanol a 10% em acetona em 1,0 mg da oleoresina de *C. multijuga*. Agitou-se por 30 segundos em agitador de tubos (Prolab) e em seguida, adicionou-se 30 µL do reagente de esterificação (TMSD). Após a adição do reagente de esterificação as amostras ficaram em repouso por 20 minutos, em seguida foram avolumadas para 1,0 mL com diclorometano e injetadas no cromatógrafo em fase gasosa.

4.2.2. Análises por CG-EM

As análises de CG foram realizadas no Laboratório de cromatografia a gás (LABCG) da Central Analítica da UFAM (CAM/UFAM) em CG-EM, Thermo Scientific), equipado com auto-amostrador TriPlus RSH e coluna capilar (Tr-5; 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm). As amostras foram inseridas no sistema cromatográfico (1 µL) por meio de injetor a 250 °C, com taxa de divisão 1:50 e vazão de 2 mL/min, utilizando hélio ultrapuro como gás de arraste e detector a 250 °C. As condições de temperatura do forno foram baseadas numa rampa que inicia em 90 °C até 160 °C (2,5 °C/min.) e de 160 °C à 290 °C (10,0 °C/min.) com uma isoterma final de 3 minutos. As amostras foram ionizadas por impacto de elétrons com energia de 70 eV e varredura de 40 a 600 uma.

4.2.3. Caracterização química das oleoresinas de *C. multijuga* por CG

A identificação dos constituintes voláteis (Sesquiterpenos) dos óleos de copaíba foi realizada por comparação dos índices de retenção (IR) obtidos experimentalmente e comparados com os IR teóricos (Adams, 2007). A identidade dos constituintes foi confirmada pela comparação dos espectros de massas obtidos experimentalmente com aqueles disponíveis na biblioteca Wiley 8ª. edição e pela co-injeção de padrões autênticos. Cada substância presente nos óleos de copaíba foi representada em termos percentuais,

onde a área de cada substância foi dividida pela área total de todos os constituintes que compõem o cromatograma e multiplicado por cem.

4.2.4. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada pelo desenvolvimento das curvas analíticas de padrões comerciais autênticos do β -cariofileno e do óxido de cariofileno (pureza $\geq 80,0\%$). As curvas analíticas foram preparadas em diferentes concentrações, por diluição da solução mãe ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) em diclorometano (P.A.) e as concentrações foram selecionadas com base no teor do β -cariofileno e do seu óxido nos 10 óleos de *C. multijuga*. As soluções foram preparadas em duplicatas nas concentrações de 0,130; 0,212; 0,285; 0,420; 0,619 mg.mL^{-1} para o β -cariofileno e 0,031; 0,046; 0,077; 0,094; 0,216 mg.mL^{-1} para o óxido de cariofileno. Todas as soluções foram analisadas por cromatografia em fase gasosa e a linearidade foi avaliada pela resposta do sistema de detecção em função da concentração do β -cariofileno e do óxido de cariofileno.

4.2.5. Repetibilidade intra-corrída

A repetibilidade intra-corrída para o β -cariofileno e o óxido de cariofileno foi realizada em duplicata com intervalo de 24 horas, no mesmo equipamento, em dias consecutivos. As análises foram realizadas nas mesmas condições analíticas e cromatográficas e os resultados foram expressos pelo coeficiente de variância e exatidão, calculados segundo o DOQ-CGCRE-008, baseado na equação 1.

$$\text{Exatidão} = (\text{média da concentração experimental} / \text{concentração teórica}) \times 100 \quad (1)$$

4.2.6. Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram determinados com base na curva analítica desenvolvida para o β -cariofileno e o óxido de cariofileno por regressão linear e calculados a partir das equações (2 e 3) sugeridas pelo DOQ-CGCRE-008.

$$LD = 3,3x \frac{s}{b} \quad (2)$$

Onde, s = desvio padrão do menor nível da curva analítica; b= coeficiente angular.

$$LQ = 10xs/b \quad (3)$$

Onde, s = desvio padrão do menor nível da curva analítica; b= coeficiente angular.

4.2.7. Quantificação do β -cariofileno e óxido de cariofileno nos óleos de *C. multijuga*

As 10 oleoresinas de *C. multijuga* foram analisadas em triplicata na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹. A quantificação do β -cariofileno e do óxido de cariofileno foi realizada pela equação da reta de regressão de cada padrão e expressas em valores médios, seguido do desvio padrão das réplicas.

4.3. Caracterização de marcadores químicos nos óleos de copaíba (*Copaifera* sp.) utilizando Fator de Retenção Relativo (Rfr) por CCDAE-UV e CCDAE-EM.

4.3.1. Reagentes

Os padrões de ácidos diterpênicos utilizados neste experimento foram isolados de óleos de copaíba (*Copaifera* sp.) e caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear (¹H e ¹³C) em trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa; os padrões de β -cariofileno ($\geq 80\%$), óxido de cariofileno ($\geq 95\%$) e óxido de linalol ($\geq 97\%$) foram adquiridos comercialmente da Sigma Aldrich. Como fase móvel no sistema de CCDAE-UV utilizou-se hexano e acetato de acetila, grau P.A. (TEDIA) e para solubilizar os

padrões utilizou-se uma mistura de diclorometano e acetato de etila (1:1), grau P.A. (TEDIA). Como fase móvel/solvente de extração para as análises no CCDAE-EM utilizou-se um sistema constituído por metanol/ácido fórmico 0,1%, onde o metanol foi de grau cromatográfico (MERCK) e o ácido fórmico P.A. (98% - 100%).

4.3.2. Caracterização química dos padrões terpênicos por CCDAE-UV

As análises em CCDAE-UV foram realizadas no laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônia, da Universidade Federal do Amazonas (QBiomA-Ufam). As soluções padrão do óxido de cariofileno ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e dos ácidos copálico ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$), hidróxi-copálico ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), acetóxi-copálico ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), agático ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), hardwíckiico ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), poliáltico ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram preparadas em acetato de etila (P.A.), a partir da solução estoque de cada marcador terpênico ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$); a concentração de cada padrão foi selecionada de acordo com sua sensibilidade na placa cromatográfica. A separação dos constituintes foi realizada utilizando um sistema de CCDAE-UV equipado com aplicador de amostras semiautomático (CAMAG Linomat 3), *software* integrado Win-CATS versão 1.4.3 e visualizador de placas. As análises foram realizadas em placas de CCDAE-UV, de alumínio e pré-revestidas com gel de sílica 60F254 (10,0 x 5,0 cm, Merck, Alemanha); as placas cromatográficas foram pré-lavadas com metanol, secas e ativadas em estufa de ar quente a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min. Aliquotas de $10 \mu\text{L}$ de cada padrão (nas concentrações descritas anteriormente) foram carregadas como bandas de 6 mm nas placas de CCDAE-UV, com um dispositivo de aplicação semiautomático (CAMAG Linomat 3) com uma seringa de $500 \mu\text{L}$ (Hamilton, Bonaduz, Suíça). As posições de aplicação foram definidas a 11 mm dos lados (esquerdo e direito) e 5 mm das extremidades inferior e superior da placa. A fase móvel foi preparada no momento da eluição, com 10 minutos de saturação da cuba (12 cm x 12 cm) e foi

constituída por uma mistura binária de hexano/acetato de etila (30%). Após a aplicação dos padrões, as placas foram eluídas, reveladas na luz ultravioleta (254 nm e 366 nm), em vanilina sulfúrica e em etanol sulfúrico. Posteriormente, foram secas usando ar quente e fotodocumentadas no TLC-visualizer 2 (CAMAG) conforme ilustrado de forma sucinta na figura 10.

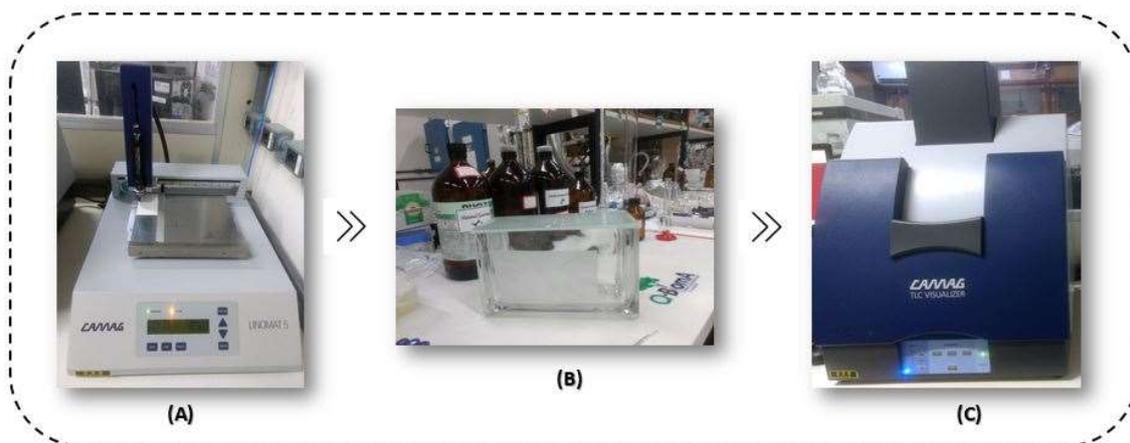


Figura 10. Ilustração das análises em CCDAE-UV.

Legenda: A = Aplicação da amostra; B = Eluição dos constituintes; C = fotodocumentação das placas.

4.3.3. Caracterização química dos padrões terpênicos por CCDAE-EM (CCDAE-EM)

As análises cromatográficas por CCDAE-EM foram realizadas no Instituto Militar de Engenharia (IME), em colaboração com o Centro Tecnológico do Exército (CTEX), no Instituto de Defesa Química, Biológica, Radiológica e Nuclear (IDQBRN). As análises dos padrões terpênicos foram realizadas nas concentrações de 10, 40, 100 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, nas mesmas condições cromatográficas das análises de CCDAE-UV (Seção 4.3.2.). Os espectros de massas foram obtidos no modo de ionização negativo e positivo, utilizando a fonte electrospray (ESI) com energias de ionização de 5, 70 e 100 eV. As análises foram realizadas no CCDAE-EM (CAMAG) interface 2 hifenado a um espectrômetro de massas (EM) triplo quadrupolo (Agilent, modelo 6410), conforme ilustrado na figura 11. Os dados foram adquiridos em modo de varredura com amplitude de massa entre m/z 40 e 700 Da. Exceto a energia de ionização, os parâmetros da fonte foram os mesmos para as

análises de todos os padrões - temperatura da fonte: 300 °C, gás nebulizador: 15 psi, gás de secagem (N₂): 6 L min⁻¹ e voltagem capilar: 4 kV.

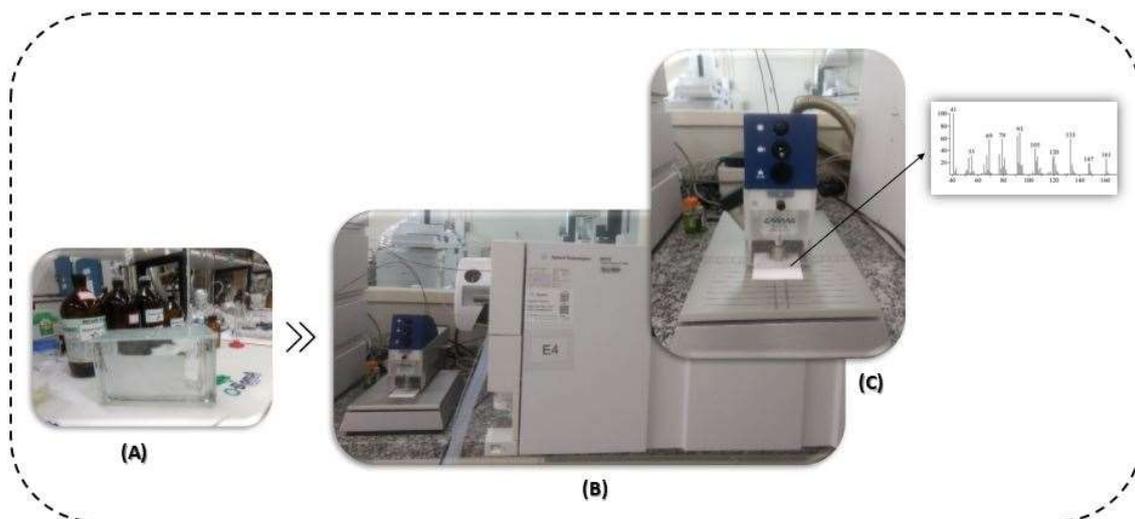


Figura 11. Ilustração das análises em CCDAE-EM.

Legenda: **A** = Eluição dos constituintes da amostra; **B** = Extração e transferência dos constituintes para o espectrômetro de massas; **C** = Ampliação da extração dos constituintes.

Para aquisição dos dados e análises subsequentes utilizou-se o *software* MassHunter Qualitative Analysis B.06.00. Os padrões terpênicos foram aplicados nas placas de CCDAE, nas concentrações discriminadas anteriormente (Seção 4.3.2.), eluídos em hexano:acetato de etila 30,0% e por dessorção cada padrão foi inserido ao espectrômetro de massas, conforme mostrado na figura 11.

4.3.4. Fator de retenção Relativo (R_f)

O R_f relativo foi obtido pelo desenvolvimento da curva analítica do óxido de linalol em 7 concentrações distintas: 40, 70, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg mL⁻¹, plotados na mesma placa com uma mistura dos padrões terpênicos (100 µg mL⁻¹). Foram realizadas 19 réplicas da curva analítica em quatro dias distintos sob as mesmas condições instrumentais e cromatográficas. As análises cromatográficas foram realizadas num equipamento de CCDAE-UV (CCDAE-UV) equipado com aplicador de amostras

semiautomático, conforme descrito anteriormente (Seção 4.3.2.). Os cromatogramas foram obtidos em cromatoplaça de CCDAE-UV (11,0 cm x 6,0 cm - 5,0 cm de corrida cromatográfica) com comprimento de banda de 6,0 mm, base inferior de 5,0 mm (0,5 cm) e tempo de saturação da cuba de 20,0 minutos. 10 µL da mistura dos padrões terpênicos e do óxido de linalol (em cada uma das concentrações descritas acima) foram aplicados numa cromatoplaça de CCDAE-UV (de alumínio, pré-revestida com gel de sílica 60F254 - Merck, Alemanha), previamente lavada em metanol e ativada em estufa por 5 minutos (100,0 °C). Em seguida os padrões foram eluídos em hexano/acetato de etila (30%) e revelados em etanol sulfúrico, sob aquecimento (70 à 90,0 °C gradativamente) por 7 minutos em chapa aquecedora. Após a revelação dos constituintes e a fotodocumentação dos cromatogramas, os fatores de retenção relativos foram obtidos pela razão entre o R_f de cada padrão terpênico e o R_f do óxido de linalol nas diferentes concentrações avaliadas.

4.3.5. Análises estatísticas

O tratamento estatístico dos dados foi realizado usando o software R. Os gráficos dos espectros de massas foram obtidos usando a função PlotSpec no modo ionization="ESI" do pacote InterpretMSSpectrum do R. Para construção e análise do ajuste das curvas analíticas utilizou-se as seguintes funções: lm (Linear Model) a qual forneceu a reta de regressão do R_f de cada biomarcador terpênico em função da concentração do linalol; bptest (teste de Breusch Pagam para homogeneidade dos resíduos) a qual avaliou se a variação do R_f de cada marcador pode ser considerada constante em cada nível de concentração (40, 70, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg.mL⁻¹); e qqPlot (teste para normalidade dos resíduos) à qual é essencial para verificar se os resultados do ajuste das curvas analíticas são confiáveis.

4.4. CCDAE Fingerprinting: detecção de adulterantes em óleos de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) e confirmação por CCDAE-EM e análises quimiométricas.

4.4.1. Reagentes

Os adulterantes utilizados foram óleos de soja (SOYA), da BUNGE, milho (LIZA), da CARGILL e óleo diesel (B S10). Os óleos vegetais foram adquiridos comercialmente no ano de 2018, e o óleo diesel foi fornecido pelo Laboratório de Pesquisas e Ensaio de Combustíveis (LAPEC) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no ano de 2018. Os solventes utilizados para as análises em CCDAE e CCDAE-EM foram todos grau P.A. (TEDIA), exceto o metanol, usado no sistema de transferência para o massas, que foi grau cromatográfico (MERCK).

4.4.2. Adulteração dos óleos de *C. multijuga*

Os 10 óleos de *C. multijuga* foram adulterados individualmente com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções. O teor dos óleos adulterantes nos óleos de copaíba foi selecionado a partir de estudos preliminares, realizados para avaliar a sensibilidade de cada adulterante nos óleos de copaíba; nessa fase de otimização das condições das adulterações, foram considerados o teor dos óleos adulterantes nos óleos de copaíba e a variação na composição química entre os espécimes de *C. multijuga*. Várias combinações entre cada adulterante e os óleos de copaíba foram realizadas e monitoradas por CCD; por fim, o menor percentual de adulteração para os óleos vegetais foram perceptíveis com 2,3% de adulteração e para o óleo diesel a partir de 4,5%; a ideia principal é mostrar que pequenos percentuais de adulterações podem ser detectados pela CCDAE; nesse sentido as adulterações foram realizadas com 2,3, 4,5, 9,0, 23,0 e 33,0% de óleos vegetais e a partir de 4,5% de óleo diesel. As adulterações foram realizadas em

microescala, com volumes de 25 µL da oleoresina de *C. multijuga* e os óleos adulterantes variaram entre 0,6 µL (2,30%) a 12,5 µL (33,0%), conforme mostrado no quadro 1. Após a obtenção das misturas, os óleos adulterados foram homogeneizados em agitador de tubos por 3 minutos e analisados por CCDAE-UV e armazenados para a realização das análises em CCDAE-EM.

Percentual dos adulterantes (%)	Óleo de soja	Óleo de milho	Óleo diesel
2,3	25 µL(oleoresina) + 0,6 µL(soja)	25 µL(oleoresina) + 0,6 µL(milho)	-
4,5	25 µL(oleoresina) + 1,2 µL(soja)	25 µL(oleoresina) + 1,2 µL(milho)	25 µL(oleoresina) + 1,2 µL(diesel)
9,0	25 µL(oleoresina) + 2,5µL(soja)	25 µL(oleoresina) + 2,5µL(milho)	25 µL(oleoresina) + 2,5µL(diesel)
23,0	25 µL(oleoresina) + 7,5µL(soja)	25 µL(oleoresina) + 7,5µL(milho)	25 µL(oleoresina) + 7,5µL(diesel)
33,0	25 µL(oleoresina) + 12,5 µL(soja)	25 µL(oleoresina) + 12,5 µL(milho)	25 µL(oleoresina) + 12,5 µL(diesel)

Quadro. 1. Dados de composição das adulterações dos óleos de *C. multijuga* com óleos de soja, milho e diesel.

4.4.3. Análises em CCDAE-UV

Os óleos de *C. multijuga* autênticos e adulterados foram aplicados (1,0 mg.mL⁻¹) numa placa cromatográfica e analisados por CCDAE-UV para caracterização das manchas dos óleos adulterantes. Os óleos autênticos foram solubilizados em diclorometano e os óleos adulterados foram solubilizados numa mistura de hexano:diclorometano (60,0%) para solubilização total dos constituintes mais apolares dos óleos adulterantes. A separação cromatográfica foi realizada num sistema de CCDAE-UV equipado com *software* integrado Win-CATS versão 1.4.3 e visualizador de placas. As análises foram realizadas em placas de CCDAE-UV de alumínio, pré-revestidas com sílica gel 60F254 (8 cm x 6,5 cm e 18 cm x 6,5 cm, Merck, Alemanha), pré-lavadas com metanol, secas e ativadas em estufa de ar quente em 100,0 °C durante 5 min. Alíquotas de 10 µL de cada amostra foram aplicadas em bandas de 6 mm nas placas de CCDAE, com dispositivo de aplicação semiautomático (CAMAG Linomat 3) com seringa de 500

μL (Hamilton, Bonaduz, Suíça). As posições das aplicação foram definidas a 10 mm das laterais (esquerda e direita), 10 mm da base inferior e 5 mm da base superior da placa cromatográfica. A fase móvel foi preparada no momento da eluição, com 10 minutos de saturação da cuba e constituída por uma mistura binária de hexano:acetato de etila (30%). Após a aplicação das amostras, as placas foram eluídas, reveladas na luz ultravioleta (254 nm e 366 nm), em vanilina sulfúrica e em etanol sulfúrico; posteriormente, foram secas com ar quente e fotodocumentadas no TLC-VISUALIZER 2 (CAMAG) para caracterização dos R_f 's.

4.4.4. Análises em CCDAE-EM

As análises em CCDAE-EM foram realizadas na concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, nas mesmas condições cromatográficas das análises CCDAE-UV, exceto a pré-lavagem das placas, que foi realizada em sistema composto por MeOH: água (3: 1). Os espectros de massa foram obtidos no modo de ionização positivo e negativo, utilizando a fonte electrospray (ESI) a 30, 50, 70 e 100 eV. As análises foram realizadas na interface CCDAE-EM (CAMAG) 2 hifenizada para um espectrômetro de massa triplo quadrupolo (EM) (Agilent, modelo 6410). Os resultados foram adquiridos em modo de varredura com amplitude de massa entre m/z 40 e m/z 1000 Da. Os parâmetros da fonte foram os mesmos para a análise de todas as amostras, conforme descrito a seguir: temperatura da fonte: 300 °C, gás do nebulizador: 15 psi, gás de secagem (N_2): 6 L min^{-1} e tensão capilar: 4 kV. Para aquisição dos espectros e análises subsequentes, o *software* MassHunter Qualitative Analyzes B.06.00 foi utilizado. Os óleos autênticos e adulterados foram aplicadas nas placas de CCDAE ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$), eluídas em hexano: acetato de etila 30,0% e por dessorção, cada amostra foi inserida no espectrômetro de massa

4.4.5. Análises Estatísticas

Os espectros de massas obtidos dos óleos de copaíba autênticos e adulterados por meio da CCDAE-EM passaram por uma fase de pré-processamento, que consistiu na subtração espectral do branco (Background Subtraction), descrito por Brian (2021). As adulterações foram confirmadas por meio de métodos estatísticos multivariados de HCA, PCA e PLS-DA (Pérez e Tenenhaus, 2003; Hair-Junior et al., 2005; Ferreira, 2015), a partir dos espectros de massas obtidos nos diferentes níveis de adulteração avaliados (baixo, médio e alto) e também dos espectros dos óleos autênticos. Na análise multivariada, esses dados são estruturados em forma de uma matriz X , constituída com as massas ou abundâncias dos vários íons observados nos espectros dos diversos perfis das espécies de interesse (copaíbas autênticas, copaíbas adulteradas e óleos adulterantes). Cada espectro nos fornece a abundância de cada íon que representa um vetor (linhas da matriz), enquanto o indicador da espécie de interesse é representado por um vetor y . Assim a representação do modelo estatístico para análise é $y = X + E$. Onde X é decomposta no produto CP , com C representando o efeito das espécies, P é a matriz de pesos (ou coeficientes) que quantifica a importância dos Íons em cada espécie e E é a matriz de erros (ruídos). Após a organização dos espectros, aplicaram-se as técnicas de HCA, PCA e PLS-DA através das funções *FactoMineR* e *DiscrMiner* do *software R* (Le and Husson, 2008). A análise hierárquica de cluster (HCA) consiste no agrupamento das espécies por similaridade baseada na distância euclidiana entre os espectros e são representados graficamente por um dendrograma (diagrama de árvore). A análise de componentes principais (PCA) projeta os espectros das espécies em um novo sistema de coordenadas, permitindo observar visualmente as diferenças e possíveis relações entre os espectros de cada espécie. Finalmente, visando à detecção de um padrão espectral para as amostras de *C. multijuga* foi empregada a análise discriminante por mínimos quadrados

parciais (Partial Least Squares Discriminant Analysis - PLS-DA) que consiste na classificação do espectro da amostra em autêntico ou adulterado.

4.5. Esterificação dos óleos de copaíba (*Copaifera* sp.)

Os óleos de copaíba foram esterificados utilizando quatro metodologias, que foram inicialmente desenvolvidas para a esterificação de ácidos graxos (Milinsk et al., 2011), mas, algumas vezes, também são usadas na esterificação dos óleos de copaíba. As metodologias utilizadas neste experimento foram realizadas na presença dos ácidos clorídrico (HCl), sulfúrico (H₂SO₄) e trifluoreto de boro (BF₃). Para avaliar a eficácia das metodologias de esterificação nos óleos de copaíba, foram utilizadas duas oleoresinas de espécies distintas, com diferentes teores de ácidos diterpênicos (*C. multijuga* e *C. reticulata*). Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com Milinsk e colaboradores (2011), com algumas adaptações conforme resumido na figura 12.

4.5.1. Métodos de esterificação utilizados

4.5.1.1. Método de esterificação proposto por Metcalfe, Schmitz e Pelka (1966) (MET)

Em um tubo de ensaio, cerca de 75,0 mg da oleoresina foi solubilizada em 2,0 mL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M em metanol; em seguida a mistura foi aquecida a 100 °C por 5 minutos em banho-maria, para solubilização total da amostra; após o tempo de aquecimento e a mistura atingir a temperatura ambiente, adicionaram-se 2,5 mL da solução de BF₃ a 12,0% em metanol e em seguida a mistura foi aquecida novamente em banho-maria por mais 2 minutos a 100 °C (reação exotérmica). Após alcançar a temperatura ambiente, adicionou-se 2,5 mL de uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl). Em seguida, a mistura foi particionada com 5,0 mL de hexano por 4 vezes, totalizando 20,0 mL de solvente. A fração hexânica foi coletada em um frasco de

vidro pesado e os rendimentos foram calculados após a evaporação natural do solvente; posteriormente os óleos esterificados foram armazenados na geladeira até a realização das análises cromatográficas por CCD e CG.

4.5.1.2. Método de esterificação proposto por Joseph e Ackman (1992) (JAC)

Em um tubo de ensaio, cerca de 25,0 mg da oleoresina foi solubilizada em 1,5 mL de uma solução de NaOH 0,5 M em metanol; em seguida foi aquecida a 100 °C por 5,0 minutos em banho-maria, para solubilização total dos constituintes; após atingir a temperatura ambiente, adicionou-se 2,0 mL da solução de BF₃ a 12,0% em metanol e em seguida a mistura aquecida novamente por mais 30,0 minutos a 100 °C (reação exotérmica). Após o tempo de aquecimento, o tubo de ensaio foi resfriado rapidamente em água corrente e posteriormente adicionou-se 1 mL de hexano (agitou-se lentamente por 30 segundos) e em seguida adicionou-se 5,0 mL da solução saturada de NaCl (agitou-se novamente por 30 segundos); em seguida, a amostra esterificada foi levada ao refrigerador por 30 minutos para melhor separação das fases; a fase hexânica foi coletada e a amostra esterificada foi particionada com mais 1 mL de hexano por mais duas vezes. Todas as fases hexânicas foram coletadas em um frasco único pesado e os rendimentos foram calculados após a evaporação natural do solvente; posteriormente os óleos esterificados foram armazenados na geladeira até a realização das análises cromatográficas por CCD e CG.

4.5.1.3. Método de esterificação proposto por Jham, Teles e Campos (1982) (JHA)

Em um tubo de ensaio, cerca de 50 µL da oleoresina foi solubilizada em 1,0 mL de uma solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,5 M em metanol; em seguida foi aquecida a 100 °C por 5 minutos em banho-maria, para solubilização total dos

constituintes; após atingir a temperatura ambiente, adicionou-se 400 µL da solução de HCl em metanol aquoso (4:1 v/v) e em seguida a mistura aquecida novamente por mais 15 minutos a 100 °C (reação exotérmica). Após alcançar a temperatura ambiente novamente, adicionou-se 2,0 mL de água destilada, agitou-se lentamente e a amostra esterificada foi particionada com 3 mL de éter de petróleo por duas vezes; o sobrenadante foi coletado em frasco de vidro pesado e os rendimentos foram calculados após a evaporação natural do solvente; posteriormente os óleos esterificados foram armazenados na geladeira até a realização das análises cromatográficas por CCD e CG.

4.5.1.4. Método de esterificação proposto por Hartman e Lago (1973) (HLA)

Em um balão de fundo redondo, cerca de 125,0 mg da oleoresina foi solubilizada em 2,5 mL de uma solução de NaOH 0,5 M em metanol; em seguida a mistura foi aquecida sob refluxo por 5 minutos, para solubilização total da amostra; após atingir a temperatura ambiente, adicionou-se 7,5 mL do reagente de esterificação, que foi preparado utilizando 2,0 g de cloreto de amônio solubilizados em 60,0 mL de metanol e pela adição de 3,0 mL de H₂SO₄; em seguida a mistura foi aquecida novamente por mais 3,0 minutos, sob refluxo. Após o tempo de aquecimento e a mistura alcançar a temperatura ambiente, a amostra esterificada foi transferida para um funil de separação e adicionou-se 25,0 mL de hexano (agitou-se bem) e 50,0 mL de água destilada (agitou-se bem), agitou-se bem, e após 10 minutos de descanso houve a separação das fases; descartou-se a fase aquosa e adicionou-se 25,0 mL de água destilada novamente, agitou-se bem e após 10 minutos de descanso houve a separação das fases; coletou-se a fase orgânica em um frasco de vidro pesado e os rendimentos foram calculados após a evaporação natural do solvente; posteriormente os óleos esterificados foram armazenados na geladeira até a realização das análises cromatográficas por CCD e CG.

4.5.1.5. Método de esterificação proposto por Migowska e colaboradores (2010)

Adicionou-se 1,0 mg da oleoresina em um vial de 2 mL e solubilizou-se em 220,0 μL de uma solução de metanol em acetona 10,0%. Após a solubilização da amostra, adicionou-se 30,0 μL do reagente de esterificação (TMSD – 2,0 M em hexano); após 20,0 minutos de tempo reacional, adicionou-se 750 μL de hexano e as amostras foram injetadas no cromatógrafo gasoso.

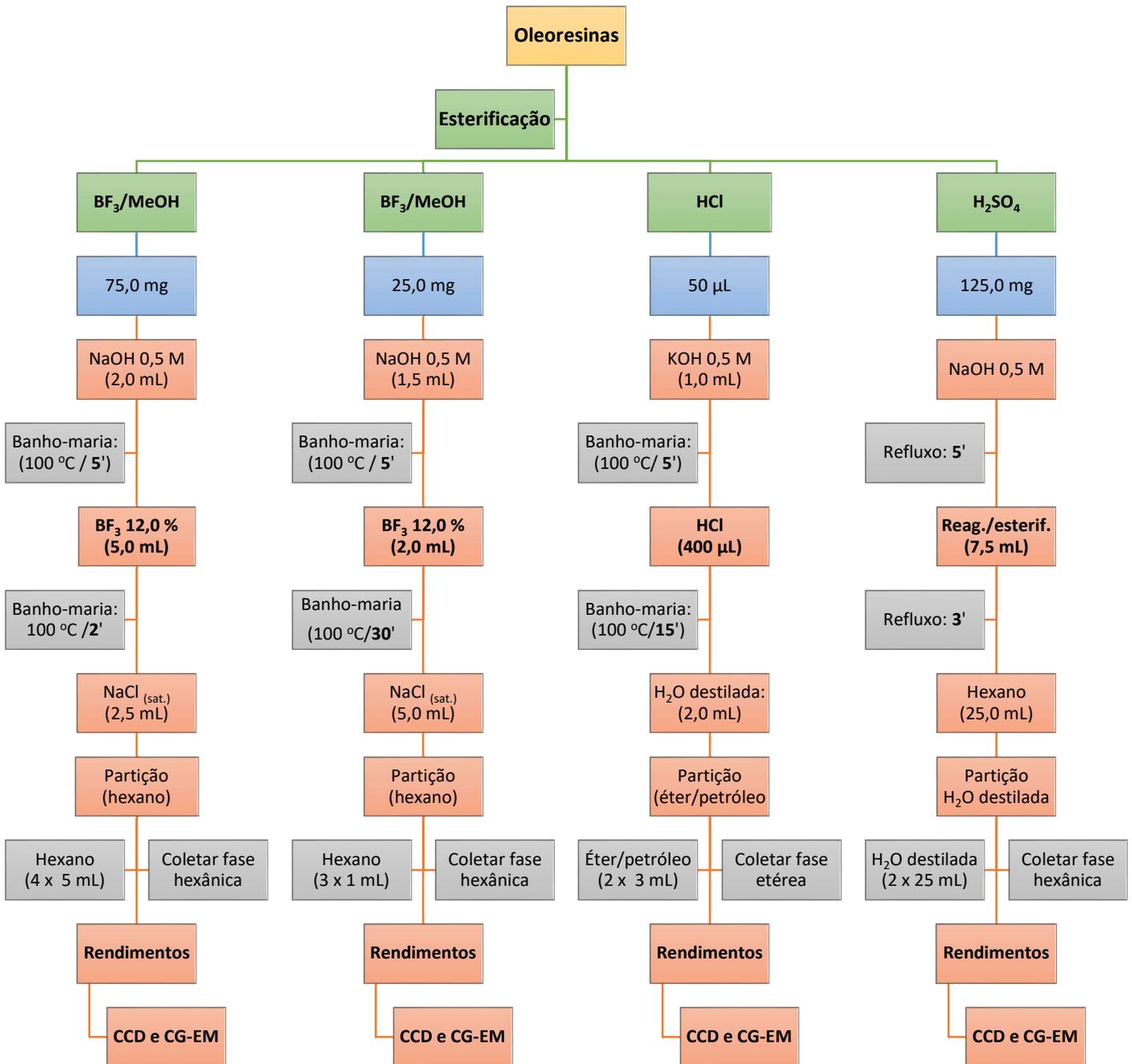


Figura 12. Fluxograma das metodologias utilizadas para a esterificação dos óleos de *C. multijuga* e *C. reticulata*.

5. Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Quantificação do β -cariofileno e óxido de cariofileno nos óleos de copaíba de *Copaifera multijuga* Hayne por cromatografia em fase gasosa (CG - EM)

Os primeiros resultados da tese são descritos nesta seção, na qual será apresentada a caracterização química dos OCM's por CG-EM e a quantificação do β -cariofileno e do seu óxido. As análises de CG-EM foram realizadas para confirmar a autenticidade das oleoresinas por meio dos perfis cromatográficos e da composição química obtida. A quantificação dos marcadores químicos foi realizada pelo desenvolvimento de curvas analíticas e os principais parâmetros do método, como a linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e a repetibilidade, foram avaliados e são apresentados nesta seção.

5.1.1. Caracterização química dos óleos de copaíba de *Copaifera multijuga* por cromatografia em fase gasosa (CG-EM)

Os dez espécimes de *Copaifera multijuga* usados para a quantificação do β -cariofileno e do óxido de cariofileno apresentaram cores diferentes, variando de amarelo claro, quase incolor, ao amarelo intenso (Fig. 13). De forma similar, também observou-se uma certa diferença na viscosidade dos óleos, alguns apresentaram aspectos mais espessos e outros mais líquidos; visualmente os mais escuros eram mais consistentes e os mais claros apresentavam-se menos viscosos.

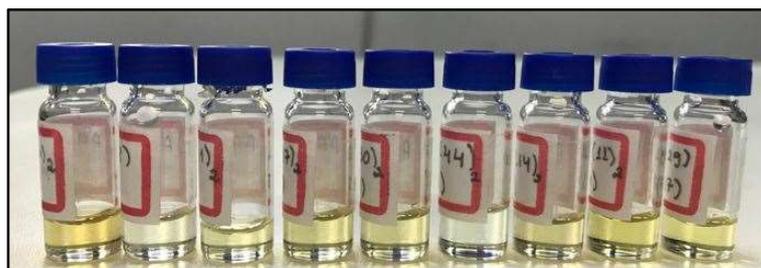


Figura 13. Óleos de *C. multijuga* utilizados para a quantificação do β -cariofileno e do óxido de cariofileno.

Os OCM's foram esterificados com trimetilsilildiazometano (TMSD) utilizando uma metodologia de derivatização *in situ*, que consiste na rápida esterificação dos óleos com uma quantidade mínima da oleoresina (Seção 4.2.1). Após a esterificação, os OCM's foram analisados por GC-EM em condições cromatográficas definidas de acordo com as características das oleoresinas, com tempo de análise de 42 minutos. Os cromatogramas obtidos mostraram perfis cromatográficos e composição química de óleos de copaíba autênticos. As duas regiões de eluição que caracterizam os óleos de copaíba foram observadas satisfatoriamente em todos os óleos analisados (Fig. 14). A primeira região corresponde a eluição dos sesquiterpenos, detectados nos primeiros 25 minutos de análise e a segunda região corresponde aos diterpenos, eluídos entre 35 e 40 minutos (Fig. 14). Algumas diferenças qualitativas foram observadas entre os 10 OCM's analisados. Porém, mesmo com essas pequenas variações foi possível observar um perfil de composição química específico para os óleos dessa espécie, constituído predominantemente por sesquiterpenos e minoritariamente por diterpenos.

As causas das variações qualitativas entre os espécimes de *C. multijuga* já foram investigadas por alguns autores. As características do solo parecem exercer algum tipo de influência na composição química dos óleos dessa espécie; oleoresinas coletadas de copaibeiras cultivadas em solos arenosos tendem a apresentar uma composição química mais complexa (com maior número de constituintes) que aquelas de solos argilosos; outros fatores, como o diâmetro das árvores e a sazonalidade também já foram investigadas, mas, não apresentaram nenhum efeito relevante sobre a composição química dos OCM's (Barbosa et al., 2012). Considerando que nossas oleoresinas foram coletadas na mesma época do ano e em solos de características similares, as variações observadas podem estar relacionadas às características genéticas da própria planta, conforme relatado por Barbosa e colaboradores (2013).

RT: 6,00 - 42,00

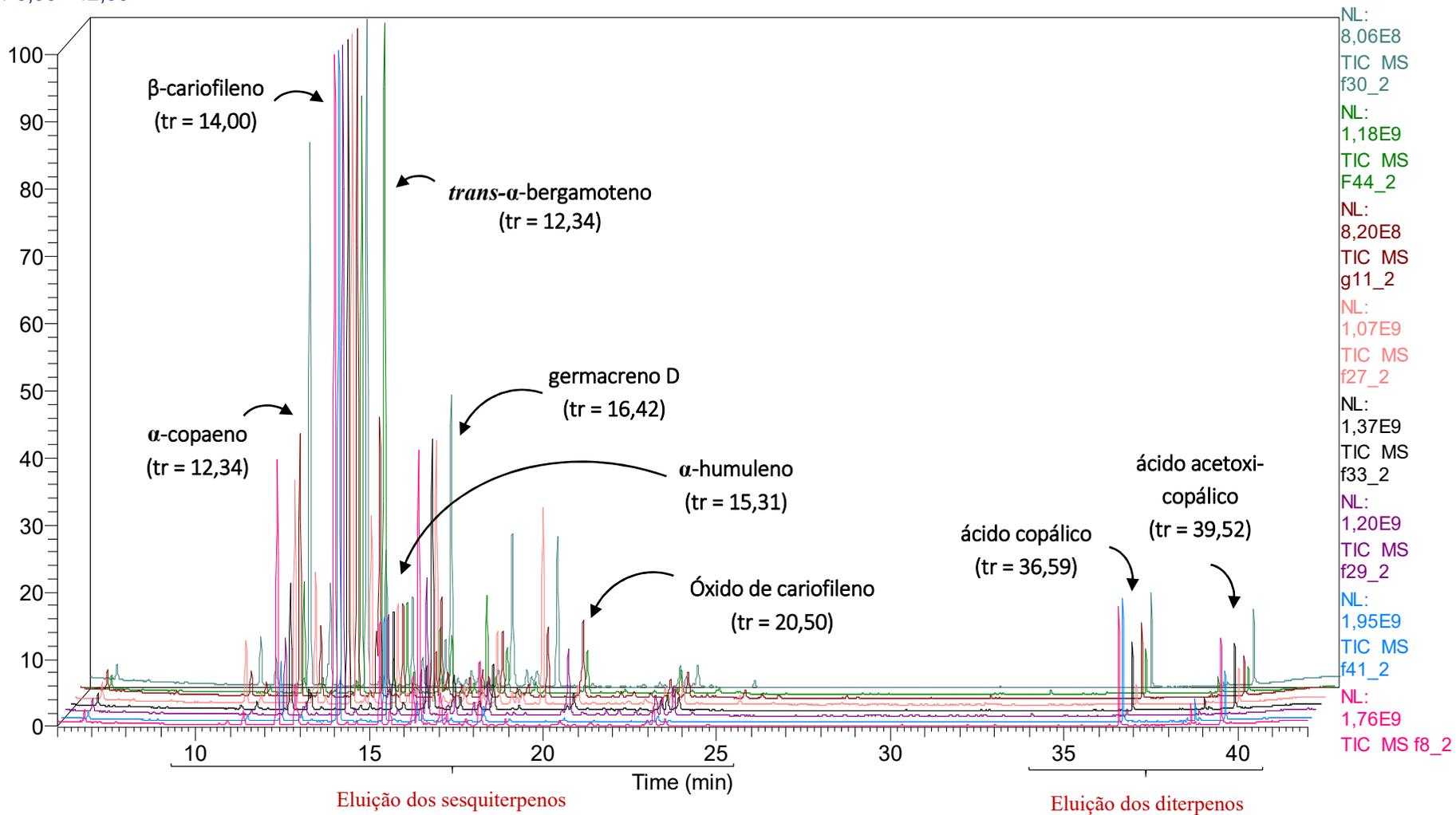


Figura 14. Cromatogramas dos óleos de *C. multijuga* obtidos por CG-EM (sobrepostos).

Os perfis cromatográficos obtidos estão em concordância com a literatura, que relata uma composição química predominante de sesquiterpenos com a presença maioritária do β -cariofileno ($t_r = 14,00$) e do ácido copálico ($t_r = 36,59$) (Fig. 14) (Veiga-Junior et al., 1997; Barbosa et al., 2012; Barbosa et al., 2013). Os sesquiterpenos representaram a maior parte da composição química dos óleos analisados, com teor variando de 86,21% a 96,26%; e os diterpenos representaram a composição minoritária, variando de 0,34% a 6,27% (Tabela 1).

O alto teor sesquiterpênico tem sido um dos principais atrativos dos OCM's, pois essas oleoresinas são fontes de sesquiterpenos importantes, principalmente do β -cariofileno; o baixo teor diterpênico nos OCM's facilita a purificação da sua fração volátil e também do β -cariofileno; contudo, os poucos diterpenos que compõem os óleos dessa espécie contribuem juntamente com o β -cariofileno para o grande potencial anti-inflamatório dos OCM's (Veiga-Junior et al., 2007; Gomes et al., 2010; Alves et al., 2017; Ames-Sibin et al., 2018).

A extensa utilização dessas oleoresinas como anti-inflamatório natural tem contribuído para o desenvolvimento de novas pesquisas, visando a explorar esse potencial através de formulações farmacêuticas por meio de micro e nanoemulsões a base dos OCM's (Lucca et al., 2015; Pinheiro et al., 2017; Neves et al., 2018). Além disso, o baixo número de diterpenos nos óleos dessa espécie facilita a obtenção e o isolamento dos seus principais diterpenos, como o ácido copálico e o acetoxi copálico (Fig. 14).

Tabela 1. Composição química dos 10 OCM's analisados por CG-EM.

Constituintes	IR	Teor (%)									
		C8	C20	C27	C29	C30	C33	C41	C44	C11	C14
α -cubebeno	1348	0,68	0,57	0,38	0,24	1,01	0,42	0,41	0,22	0,55	0,42
α -lilangeno	1373	-	-	0,26	-	-	-	-	-	-	-
α -copaeno	1374	15,59	10,39	9,81	0,24	21,47	7,74	5,13	5,22	12,89	9,60
β -cubebeno	1387	1,27	0,39	-	0,18	-	0,59	-	0,39	-	0,12
β -elemeno	1389	0,16	0,25	5,12	0,45	2,99	0,35	-	0,05	2,84	1,21
Cipereno	1398	0,10	0,18	0,29	-	-	-	-	-	-	0,40
β-cariofileno	1417	44,14	32,73	33,32	55,73	27,45	46,41	70,67	32,41	34,83	24,87
β -copaeno	1430	-	0,31	-	0,41	-	-	-	-	-	-
α-trans-bergamoteno	1432	-	2,52	-	-	-	0,38	-	37,64	11,98	-
γ -elemeno	1434	-	-	8,26	-	5,43	-	-	-	1,41	0,75
β -humuleno	1436	-	0,20	-	-	-	-	-	-	-	0,28
(Z)- β -farneseno	1440	-	-	-	-	-	-	-	1,33	-	-
α -humuleno	1452	5,81	4,43	4,47	7,14	3,62	6,67	9,68	4,49	4,83	3,67
(E)- β -farneseno	1454	-	-	-	-	-	-	-	0,45	-	-
Allo-aromadendreno	1458	0,69	0,55	0,34	-	0,95	0,36	-	-	-	0,44
Amorpha-4,7(11)-diene	1479	2,49	3,66	1,63	3,07	1,54	2,23	1,64	3,02	2,15	0,89
Germacreno D	1480	16,33	14,38	12,55	10,54	11,76	18,38	0,44	-	4,52	3,70
δ -Selineno	1492	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,26
γ -Amorfeno	1495	-	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-
Biciclogermacreno	1500	1,39	0,18	-	-	-	2,62	0,35	-	-	-
α -muuroloeno	1500	0,47	1,21	0,66	1,11	0,71	0,71	0,26	-	0,95	0,32
β -bisaboleno	1505	-	-	-	-	-	-	-	4,49	1,37	-
γ -cadineno	1513	0,31	1,07	0,62	0,76	0,72	0,59	-	-	1,01	0,32
(Z)- γ -bisaboleno	1514	-	-	-	-	-	-	-	0,38	-	-
δ -cadineno	1522	-	6,74	3,48	2,83	7,01	3,33	1,43	2,47	3,83	2,66
Zonareno	1528	-	-	0,37	-	0,64	-	-	-	-	-
α -cadineno	1537	-	0,19	-	0,10	-	-	-	-	-	-
Germacreno B	1559	-	-	10,04	-	6,69	-	-	-	3,82	0,90
Álcool cariofilenil	1570	-	0,65	-	-	-	-	-	-	-	0,58
Espatuleno	1577	-	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-
Óxido de cariofileno	1582	0,16	0,13	1,06	5,21	0,08	1,11	0,25	1,93	4,66	0,20
Ledol	1596	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rosifoliol	1600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Junenol	1618	-	10,96	-	-	-	-	-	-	-	23,55
1-epi-cubenol	1627	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
epi- α -muurolol	1640	0,32	2,11	0,89	1,60	1,08	0,78	-	-	1,12	0,63
(Torreiol) α -muurolol	1644	0,82	1,11	0,53	1,15	0,43	0,99	0,47	1,01	0,55	-
α -cadinol	1652	0,22	1,04	1,00	1,86	-	0,78	-	-	1,30	-
Selin-11-en-4- α -ol	1658	-	-	-	-	0,95	-	-	-	-	1,43
Eudesm-7(11)-en-4-ol	1700	-	-	-	-	0,33	-	-	-	-	9,01
ácido copálico		2,05	0,85	0,35	0,19	1,67	1,7	4,13	0,60	1,53	0,96
ácido 11-hidróxi-copálico		-	0,09	-	-	-	-	-	-	-	0,32
ácido agático		0,37	0,17	0,04	0,11	0,07	0,33	0,70	0,23	-	0,37
ácido 11-acetóxi-copálico		1,72	0,20	0,74	0,04	1,21	1,91	1,44	0,40	0,92	0,99
Sesquiterpenos Hidrocarbonetos		89,43	80,01	91,60	82,8	91,99	90,78	90,01	92,56	86,98	50,81
Sesquiterpenos Oxigenados		1,69	16,25	3,48	9,82	2,87	3,83	0,72	2,94	7,63	35,40
Sesquiterpenos Totais		91,12	96,26	95,08	92,62	94,86	94,61	90,73	95,5	94,61	86,21
Diterpenos		4,14	1,31	1,13	0,34	2,95	3,94	6,27	1,23	2,45	2,64
Total Identificados		95,26	97,57	96,21	92,96	97,81	98,55	97,00	96,73	97,06	88,85

A composição química obtida para os OCM's também apresentou um perfil de composição de óleos de copaíba autênticos. Cerca de 44 constituintes distintos, em diferentes concentrações, foram identificados nos óleos dessa espécie (Tabela 1); além do β -cariofileno e do ácido copálico, outros terpenos que também caracterizam essas oleoresinas foram identificados. O α -cubebeno, α -copaeno, α -humuleno, óxido de cariofileno e o ácido acetoxi copálico foram identificados em todos os óleos analisados; outros terpenos, como o germacreno D, α -muuroleno e δ -cadineno foram identificados na maior parte dos óleos. As análises químicas realizadas por CG confirmaram a autenticidade dos OCM's pela obtenção dos perfis cromatográficos autênticos (Fig. 14) e pela caracterização dos seus constituintes (Tabela 1).

O β -cariofileno foi o constituinte maioritário em 9 dos 10 óleos analisados; o teor desse sesquiterpeno variou de 24,87% a 70,67% e o óxido de cariofileno não ultrapassou a 6,0% da composição dos óleos, com teor de 0,13% a 5,21%. A identificação do β -cariofileno e do óxido de cariofileno foi realizada pela comparação do IR obtido experimentalmente com o IR teórico (Adams, 2007) e pela comparação dos EM obtidos para cada substância com os EM da biblioteca do equipamento (Wiley 8ª. edição); a identidade dos constituintes também foi confirmada pela co-injeção de padrões sesquiterpênicos autênticos do β -cariofileno e do óxido de cariofileno.

Mesmo com toda complexidade da composição sesquiterpênica dos OCM's, o método cromatográfico desenvolvido mostrou uma boa separação entre o β -cariofileno e os demais terpenos que compõem os OCM's (Fig. 15). Por outro lado, devido ao baixo teor do óxido de cariofileno em alguns dos OCM's, verificou-se uma baixa eficiência (picos largos) em alguns dos óleos analisados (Anexo 1); porém, os EM's do β -cariofileno e do óxido de cariofileno mantiveram-se constantes por toda a região do pico, demonstrando o grau de pureza na separação entre os constituintes dos óleos.

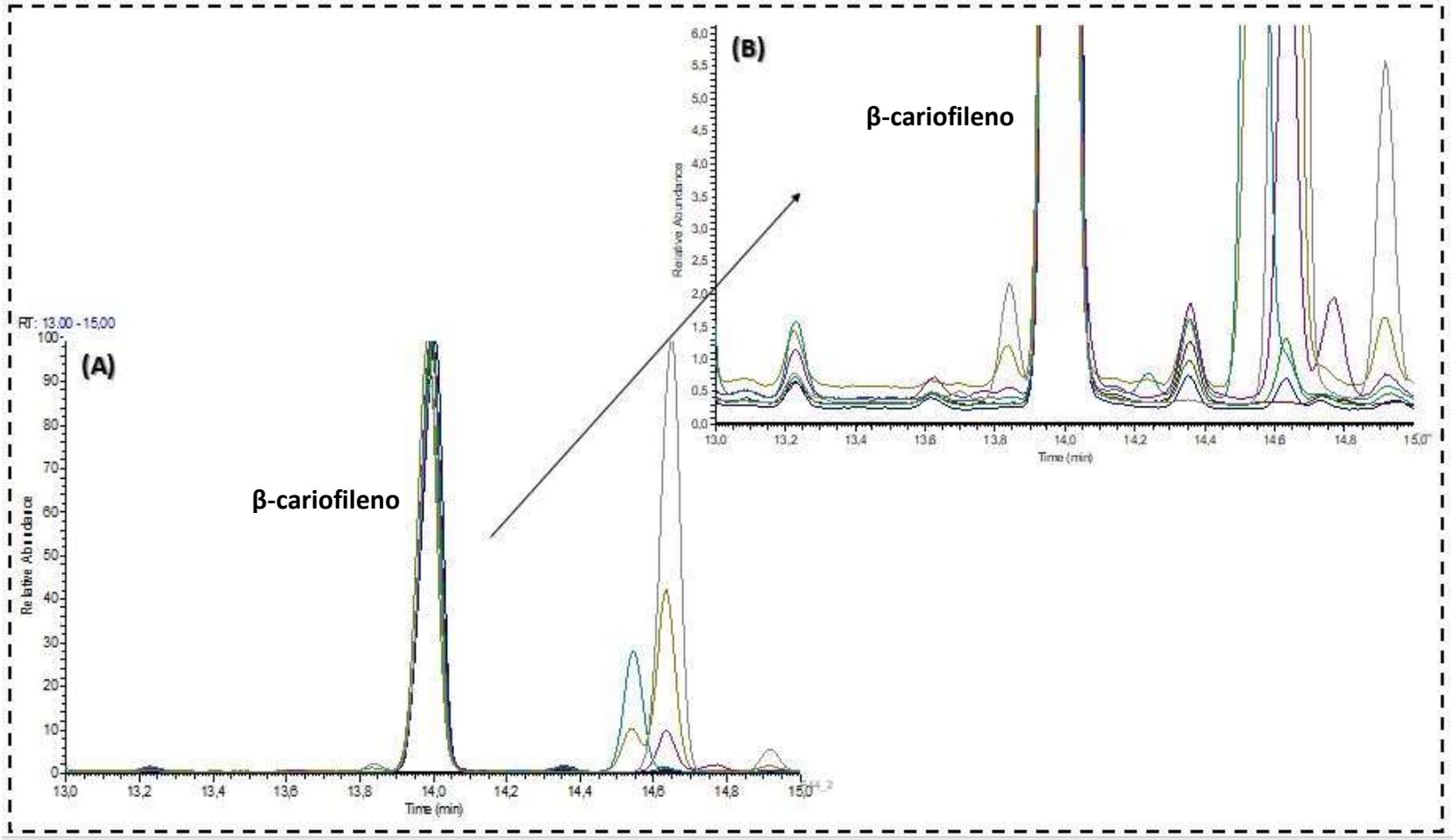


Figura 15. Sobreposição dos cromatogramas dos OCM's na região de eluição do β-cariofileno (A); Expansão da região A (B).

5.1.2. Linearidade

A linearidade do método desenvolvido para a quantificação dos 2 sesquiterpenos nos OCM's foi avaliada pelo desenvolvimento das curvas analíticas de cada padrão, conforme descrito na seção 4.2.4. As concentrações foram determinadas a partir do teor do β -cariofileno e do óxido de cariofileno nas análises semi-quantitativas dos OCM's (seção 5.1.1.); e as relações lineares foram baseadas na resposta analítica em função da concentração de cada analito. As curvas analíticas do β -cariofileno e do óxido de cariofileno demonstraram um comportamento linear com coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9917 e 0,9913 respectivamente (Fig. 16). A faixa linear para o β -cariofileno foi de 0,130 mg.mL⁻¹ a 0,619 mg.mL⁻¹, enquanto que para o óxido de cariofileno a faixa linear variou de 0,031 mg.mL⁻¹ a 0,216 mg.mL⁻¹.

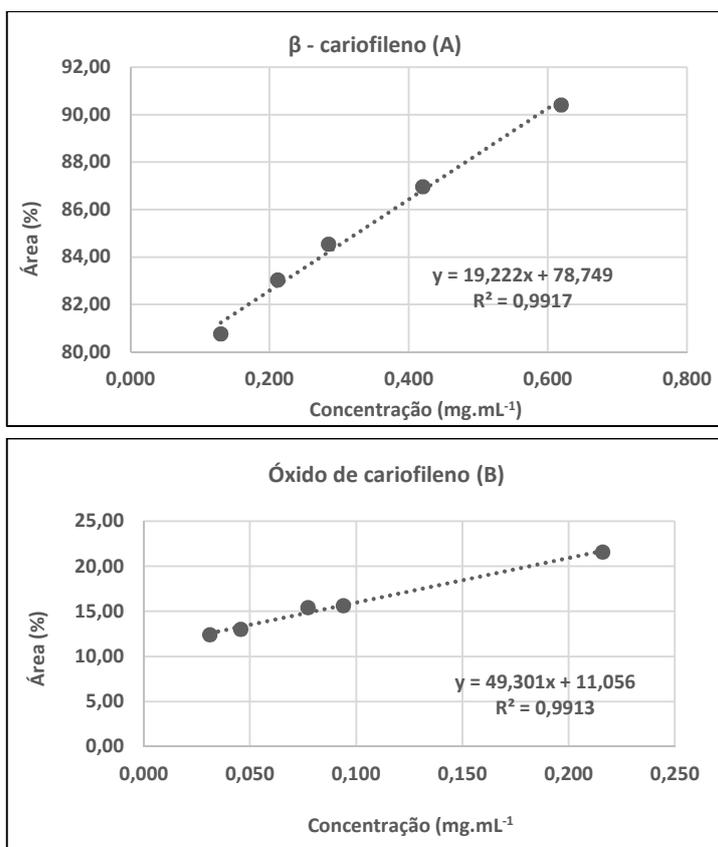


Figura 16. Curvas analíticas do β -cariofileno (A) e o óxido de cariofileno (B).

5.1.3. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram calculados com base no desenvolvimento das curvas analíticas do β -cariofileno e do óxido de cariofileno. Os resultados obtidos experimentalmente para os LD e LQ foram de 0,0089 mg.mL⁻¹ e 0,0165 mg.mL⁻¹ para o β -cariofileno e de 0,0137 mg.mL⁻¹ e 0,0280 mg.mL⁻¹ para o óxido de cariofileno, respectivamente. Xavier-Junior e colaboradores (2017) desenvolveram e validaram uma metodologia para quantificação desses dois sesquiterpenos por cromatografia em fase gasosa; os valores de LD e LQ obtidos foram de 0,01195 mg.mL⁻¹ e 0,03985 mg.mL⁻¹ para o β -cariofileno e de 0,00822 mg.mL⁻¹ e 0,02740 mg.mL⁻¹ para o óxido de cariofileno, respectivamente. Os valores de LD e LQ obtidos em nossos experimentos foram mais baixos, mostrando alta sensibilidade da CG nas análises desses sesquiterpenos e uma boa adequação do método desenvolvido. Borges e colaboradores (2013) desenvolveram uma metodologia para quantificação do β -cariofileno por HPLC e os LD e LQ obtidos foram de 0,119 μ g.mL⁻¹ e 0,398 μ g.mL⁻¹. Apesar dos LD e LQ serem muito bons, a faixa linear utilizada foi limitada ao intervalo de 5,0 μ g.mL⁻¹ a 11,0 μ g.mL⁻¹.

5.1.4. Repetibilidade intra-corrída

Após a obtenção das curvas analíticas avaliou-se a repetibilidade intra-corrída para o β -cariofileno. A repetibilidade foi obtida baseada nos coeficientes de variação (CV) do β -cariofileno para três concentrações diferentes (baixa, média e alta), realizados em duplicata com intervalo de 24 horas, no mesmo equipamento. Os resultados foram expressos pelo coeficiente de variação e exatidão, calculados segundo o DOQ-CGCRE-008 para determinar a precisão da análise e avaliar o nível de confiabilidade do método. O CV obtido está dentro dos critérios sugeridos pela ANVISA, uma vez que o mesmo foi

abaixo de 5% com exatidão (E) de $\pm 15\%$, sugerindo uma boa repetibilidade para o experimento (Tabela 2).

Tabela 2. Valores calculados para avaliar a repetibilidade intra-corrida (concentrações em mg.mL^{-1}).

Conc. Teórica	Média Conc. exp.	Média área (%)	D.P	C.V
0,13	0,10	80,77	2,45	3,03
0,28	0,30	84,55	3,88	4,58
0,62	0,61	90,41	3,81	4,22

Legenda: D. P. = Desvio padrão; C.V. = Coeficiente de variação; E = Exatidão.

5.1.5. Quantificação do β -cariofileno e óxido de cariofileno nos óleos de *C. multijuga*.

O método desenvolvido foi aplicado nos óleos de copaíba para a quantificação do β -cariofileno e do óxido de cariofileno. Os 10 OCM's foram analisados por CG-EM em triplicata e as concentrações do β -cariofileno e do óxido de cariofileno foram calculadas pela equação da reta de regressão de cada um dos sesquiterpenos. Os valores médios da concentração do β -cariofileno e do seu óxido são apresentados na tabela 3, juntamente com seus respectivos DP e CV, obtidos para cada um dos OCM's analisados.

A concentração do β -cariofileno variou de $0,317 \text{ mg.mL}^{-1}$ a $0,886 \text{ mg.mL}^{-1}$ nos OCM's analisados (Tabela 3). Os CV obtidos foram inferiores a 5,0%, mostrando pequenas variações entre as réplicas e concordância entre os resultados; sugerindo uma boa adequação do método para a quantificação do β -cariofileno. A concentração do óxido de cariofileno variou de $0,004 \text{ mg.mL}^{-1}$ a $0,272 \text{ mg.mL}^{-1}$. Entretanto, os CV obtidos na quantificação desse sesquiterpeno oxigenado mostraram grandes variações entre as réplicas, sugerindo que melhorias no método devem ser realizadas. As maiores concentrações do β -cariofileno e do óxido de cariofileno foram observadas nas amostras C41 e C29, respectivamente. A quantificação do β -cariofileno e do óxido de cariofileno

obtida em cada OCM está em concordância com as análises semi-quantitativas iniciais descritas na seção 5.1.1. (Tabela 1) e confirmam a grande variação desses sesquiterpenos nos OCM's, principalmente do β -cariofileno.

Em alguns casos, a autenticidade dos óleos de copaíba é monitorada pela presença do β -cariofileno (Boaroto et al., 2017; De Assis et al., 2019). No entanto, considerando a variação desse sesquiterpeno nos OCM's, procedimentos dessa natureza tornam-se inviáveis, pelo fato de alguns óleos de copaíba apresentarem teores baixíssimo do β -cariofileno, como é o caso de alguns espécimes de *C. reticulata*.

Tabela 3. Quantificação do β -cariofileno e óxido de cariofileno nos óleos de *C. multijuga*.

Amostras	Concentração média β -cariofileno (mg.mL ⁻¹)	CV (%)	Concentração média O. de cariofileno (mg.mL ⁻¹)	CV (%)
C08	0,535 ± 0,024	4,557	0,008 ± 0,0010	12,122
C20	0,401 ± 0,017	4,294	0,007 ± 0,0007	10,657
C27	0,415 ± 0,010	2,301	0,051 ± 0,0019	3,808
C29	0,674 ± 0,024	3,616	0,272 ± 0,0187	6,889
C30	0,345 ± 0,009	2,626	0,004 ± 0,0003	8,319
C33	0,584 ± 0,013	2,224	0,057 ± 0,0082	14,314
C41	0,886 ± 0,027	3,015	0,016 ± 0,0010	5,976
C44	0,403 ± 0,010	2,370	0,124 ± 0,0046	3,694
C11	0,441 ± 0,005	1,084	0,196 ± 0,0285	14,561
C14	0,317 ± 0,001	0,448	0,009 ± 0,0005	5,000

Apesar da alta concentração do β -cariofileno na maior parte dos OCM's, a variação na concentração desse sesquiterpeno é grande, e dificulta a obtenção de um padrão para a composição química dessas oleoresinas. Desse modo, ainda não existe uma

análise única e exclusiva que responda a autenticidade desses óleos; contudo, a CG fornece um conjunto de informações, como o perfil cromatográfico e a caracterização química dos constituintes do óleo, que nos permite inferir essa autenticidade. Embora haja uma grande variação na concentração do β -cariofileno nos OCM's, essas oleoresinas ainda são uma fonte promissora desse sesquiterpeno.

Quanto ao óxido de cariofileno, estudos mais detalhados são necessários para avaliar sua concentração nos óleos dessa espécie, já que alguns autores sugerem sua presença como consequência da degradação do β -cariofileno. No entanto, nossos resultados indicam a presença genuína do óxido de cariofileno nos OCM's, visto que foram identificados e quantificados em todos os óleos analisados em baixas concentrações.

A detecção e quantificação de vários constituintes dos óleos de copaíba têm sido descritas na literatura, porém, envolvendo outras espécies do gênero *Copaifera* e outras técnicas, como a HPLC (Sousa et al., 2011; Souza et al., 2012; Borges et al., 2013; Da Silva et al., 2017; Carneiro et al., 2018). No entanto, as análises realizadas por HPLC demandam longos tempos de análise, devido às características dos óleos de copaíba; alternativamente essas oleoresinas têm sido destiladas e posteriormente analisadas por HPLC. Entretanto, quando se trata do controle de qualidade dos óleos de copaíba ou da autenticidade dessas oleoresinas, a destilação não é a melhor escolha; a separação dos constituintes voláteis e não voláteis por meio da destilação ocorre de maneira ineficiente, levando a resultados incompletos; adicionalmente, as altas temperaturas e o longo tempo de extração utilizado na destilação do óleo, pode contribuir para a degradação dos constituintes e formação de artefatos.

Os OCM's são bastante estudados quanto à sua composição qualitativa e semi-quantitativas de seus constituintes (Veiga-Junior et al., 1997; Biavatti et al., 2006;

Sant'Anna et al., 2007; Barbosa et al., 2009; Barbosa et al., 2012; Barbosa et al., 2013; Da Silva et al., 2017; Carneiro et al., 2018) e principalmente quanto ao seu potencial anti-inflamatório (Dias et al., 2012; Lucca et al., 2015; Pinheiro et al., 2017; Neves et al., 2018). Porém, os resultados obtidos neste experimento correspondem aos primeiros relatos da quantificação do β -cariofileno e do óxido de cariofileno nos óleos de *C. multijuga* por cromatografia em fase gasosa.

5.2. Caracterização de marcadores químicos nos óleos de copaíba (*Copaifera* sp.) utilizando Fator de Retenção Relativo (Rfr) por CCDAE e CCDAE-EM.

Nesta seção é apresentado o desenvolvimento do fator de retenção relativo (Rfr), que consiste numa metodologia simples que pode ser usada na rápida identificação dos principais marcadores químicos dos OCM's, sem a necessidade do isolamento ou pré-tratamento da oleoresina. As principais etapas envolvidas no desenvolvimento do Rfr também são apresentadas nesta seção e consistem na otimização das condições cromatográficas, na caracterização química dos padrões terpênicos por CCDAE e CCDAE-EM, no desenvolvimento das curvas analíticas e na aplicação do Rfr nos óleos de copaíba.

A busca pela caracterização e controle de qualidade dos óleos de copaíba empregando técnicas mais simples, rápidas e baratas que aquelas publicadas recentemente, visou a eliminar o maior impeditivo da cromatografia a gás: analisar a oleoresina sem precisar de derivatização e mesmo na ausência de padrões autênticos para comparação, em especial os diterpenos. A aquisição de padrões muitas vezes consiste em um dos maiores obstáculos, primeiramente pela limitação de recursos financeiros, e no caso específico dos óleos de copaíba, são necessários vários padrões sesquiterpênicos; para a caracterização dos diterpenos, a situação se torna ainda mais complexa, pois a

obtenção de padrões diterpênicos só é possível através do seu isolamento, que corresponde a processos demorados e dispendiosos.

De posse de alguns padrões terpênicos, resultado de investigações anteriores, realizadas com os óleos de copaíba pelo grupo de pesquisa, desenvolveu-se uma mistura de padrões terpênicos em condições cromatográficas favoráveis a boa separação e detecção por CCDAE-UV. O fator de retenção (Rf) de cada padrão terpênico foi relacionado com o Rf de um “padrão comercial”, nossa referência. Entre dezenas de moléculas facilmente acessíveis comercialmente, buscou-se “uma” com características químicas adequadas, que não estivesse presente originalmente nos óleos de copaíba e que eluisse em região diferente dos principais marcadores químicos dos OCM's, evitando sobreposições. Devido a algumas co-eluições, e conseqüentemente, similaridades nos Rf's, os padrões terpênicos também foram caracterizados por CCDAE-EM.

5.2.1. Caracterização química dos padrões terpênicos por CCDAE-UV

Os padrões terpênicos utilizados na mistura de padrões foram escolhidos baseados em sua ocorrência nos OCM's e em sua disponibilidade em nosso laboratório. Foram utilizados 08 (oito) padrões terpênicos sendo dois (02) sesquiterpenos e seis (06) ácidos diterpênicos. Os padrões sesquiterpênicos foram adquiridos comercialmente e os padrões diterpênicos foram isolados de óleos de copaíba (*Copaifera* sp.) em projetos anteriores (seção 4.3.1.).

Todos os padrões foram analisados individualmente por CCDAE-UV, para a caracterização de seus fatores de retenção (Rf), e posteriormente numa mistura, contendo todos os padrões. Inicialmente foi realizado um estudo minucioso para definir as melhores condições de separação e eluição de cada padrão. Eles foram analisados individualmente em diferentes concentrações, volume de aplicação, sistemas de eluição e revelação;

diversos sistemas de eluentes foram testados, como solventes simples, misturas binárias e ternárias, bem como vários sistemas de visualização; após a obtenção das melhores condições de separação, todos os padrões terpênicos foram reunidos, formando a mistura de padrões.

A melhor resolução do cromatograma contendo a mistura dos padrões terpênicos foi alcançada quando 10 uL dessa mistura foi aplicada na cromatoplaça de CCDAE (Fig. 17); a mistura foi constituída pelos padrões de ácidos hidroxí-copálico, acetoxi-copálico, agático, hardwickiico e óxido de cariofileno, na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e pelos ácidos copálico e poliáltico, na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A composição da fase móvel que apresentou a melhor separação entre os padrões foi constituída por hexano:acetato de etila 30%; e a melhor visualização das manchas foi alcançada com a revelação em etanol sulfúrico a 10%, seguido de aquecimento por 5 minutos (80 °C) e visualização na luz ultravioleta com comprimento de onda 366 nm.

As análises iniciais dos padrões incluíram o β -cariofileno e o ácido caurenico. Entretanto, dificuldades na obtenção do ácido caurenico e sua coeluição com o ácido copálico nas análises em CCDAE dificultaram sua utilização. Alguns empecilhos na detecção do β -cariofileno nas condições já estabelecidas e a limitação de massa dos ácidos copálico e hardwickiico inviabilizaram a utilização do β -cariofileno na mistura de padrões. Entretanto, a caracterização do R_f desse sesquiterpeno foi realizada satisfatoriamente, conforme observado na seção 5.2.3.

Os ácidos hardwickiico (R_f = 0,40) e poliáltico (R_f = 0,39) apresentaram R_f's muito próximos (Fig. 17). No entanto, as similaridades entre eles não representaram nenhum empecilho na caracterização dos OCM's; pois, de acordo com a literatura, existe baixíssima chance do ácido poliáltico ser detectado nos óleos dessa espécie; ao contrário do hardwickiico, que já foi detectado, mesmo em pequenas concentrações (Biavatti et al.,

2006); então, no caso específico desses dois diterpenos, podemos direcionar nossa atenção para o ácido hardwickiico. Por outro lado, a presença do poliáltico na mistura de padrões poderia auxiliar na detecção desse marcador em oleoresinas de outras espécies do gênero *Copaifera*. Contudo, todos os padrões terpênicos foram caracterizados por CCDAE-EM (seção 5.2.2) e no caso particular desses dois diterpenos, foi possível distingui-los, por meio de seus principais fragmentos. A mistura de padrões desenvolvida pode ser utilizada como referência de comparação, para rápida caracterização desses marcadores terpênicos em outros OCM's, já que os principais terpenos dessa espécie estão bem representados nessa mistura, até então não relatada.

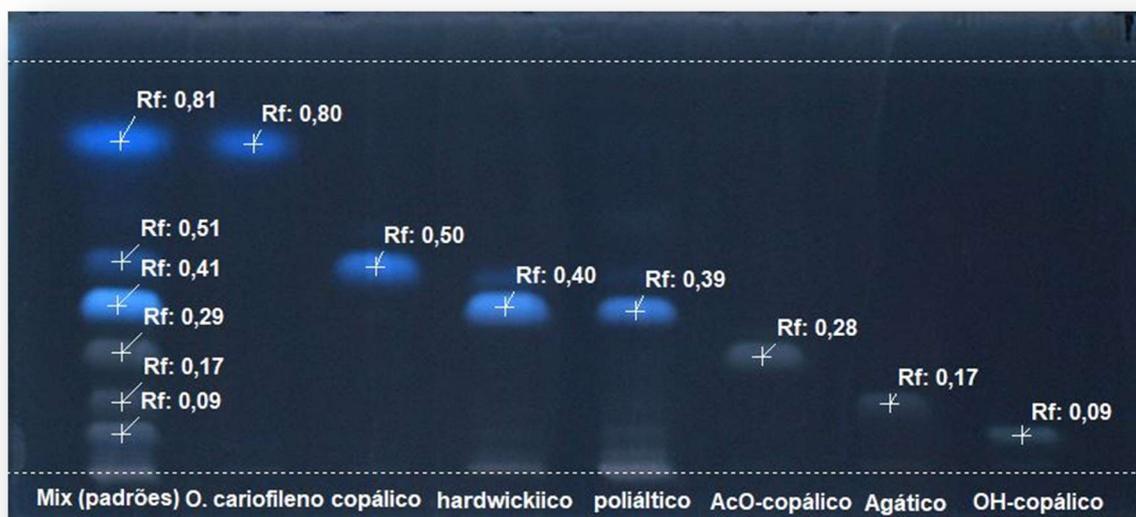


Figura 17. Perfil cromatográfico dos principais biomarcadores terpênicos detectados em óleos de copaíba (*Copaifera* sp.) por CCDAE.

5.2.2. Caracterização química dos padrões terpênicos por CCDAE-EM

Fatores de retenção e revelações empregando reagentes (ou comprimentos de onda) específicos eram as poucas ferramentas disponíveis para detectar substâncias utilizando a cromatografia em camada delgada, com resultados frágeis quando o assunto é a confirmação da identidade da molécula. A possibilidade de extrair substâncias da

placa cromatográfica e injetar diretamente no espectrômetro de massas em sistema automatizado e o aumento da resolução propiciado pelas placas de CCDAE mudou essa concepção de técnica muito preliminar de separação para uma nova técnica de identificação em misturas complexas.

Os padrões terpênicos foram caracterizados inicialmente por CCDAE-EM em diferentes condições de concentração (10, 40, 100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e energias de ionização (5, 70 e 100 eV) com o propósito de se obter o melhor perfil espectrométrico para cada padrão terpênico. Os padrões sesquiterpênicos foram caracterizados no modo positivo de ionização e os padrões diterpênicos, no modo negativo. Contudo, os melhores espectros de massas foram obtidos na concentração de 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os padrões diterpênicos e de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os padrões sesquiterpênicos, todos com energia de ionização de 5 eV.

Para a caracterização dos íons moleculares observados nos espectros obtidos por CCDAE-EM, utilizaram-se como referência as extensivas tabelas de identificação de íons moleculares observadas em ESI (Tong et al., 1999). Os íons detectados nos espectros contêm informações de íons moleculares desprotonados/protonados, fragmentos dos padrões terpênicos, íons moleculares adutos e artefatos envolvendo íons da fase móvel. Na tabela 4 é apresentado um resumo dos principais fragmentos de íons observados nos espectros obtidos de cada padrão terpênico e os espectros de massas são apresentados nas figuras 18 e 19.

A formação de adutos foi a principal característica observada nos espectros obtidos por CCDAE-EM. Com exceção do ácido hardwickiico, todos os padrões terpênicos foram detectados na forma de adutos, com 100% de abundância relativa. O ácido copálico $[\text{M} + \text{Na} - 2\text{H}]^-$, e seus derivados hidroxilado na posição 3 (hidróxi-copálico) $[\text{M} + \text{Na} - \text{H}_2\text{O}]^-$, acetilado na posição 3 (acetóxi-copálico) $[\text{M} + \text{Na} - \text{H} -$

CO_2CH_3]⁻ e carboxilado na posição 19 (agático) $[\text{M} + \text{Na} - 2\text{H}]$ ⁻ foram detectados na forma de adutos de sódio (100%). Fragmentos comuns como os íons m/z 99 ($[\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2]$ ⁻) e m/z 219 ($[\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_2]$ ⁻) foram observados nos espectros de todos os diterpenos desse grupo, correspondendo a fragmentos específicos dos diterpenos de esqueleto labdanos (Aguiar et al., 2018). Outras características comuns como perdas de moléculas de água também foram observadas, assim como a formação de adutos de cloro $[\text{M} + \text{Cl}]$ ⁻ e ácido fórmico (m/z 265) nos ácidos copálico $[\text{M} + \text{FA} - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{C}_4\text{H}_8 - \text{H}]$ ⁻ e hidróxi-copálico $[\text{M} + \text{FA} - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{C}_4\text{H}_8\text{O} - \text{H}]$ ⁻.

O espectro de massas do ácido hardwickiico foi caracterizado por fragmentos específicos da sua estrutura, como os íons m/z 175 (100%) e m/z 271 (38,5%) e em menor intensidade, pela formação dos íons m/z 317 e m/z 353, característicos de adutos do solvente $[\text{M} + \text{FA} - \text{H} - \text{CO}_2]$ ⁻ e potássio $[\text{M} + \text{K} - 2\text{H}]$ ⁻. O íon mais abundante no espectro de massas do ácido poliáltico corresponde à formação de aduto do formiato de sódio, seguido da descarboxilação do anel labdânico $[\text{M} + \text{NaFA} - \text{CO}_2 - \text{H}]$ ⁻. Outra característica relevante é a presença do íon fragmento m/z 175 comum entre os ácidos poliáltico e hardwickiico, que possivelmente corresponde à descarboxilação da molécula, seguida da perda do anel furano $[\text{M} - \text{H} - \text{CO}_2 - \text{C}_6\text{H}_8\text{O}]$ ⁻, condizente com suas estruturas. Adicionalmente, o ácido poliáltico foi o único dos ácidos diterpênicos detectado na forma desprotonada, mesmo em baixa intensidade.

Tabela 4. Resumo dos principais fragmentos de íons dos padrões terpênicos obtidos por CCDAE-EM.

Padrão Terpênico (PM)	Íon Detectado (<i>m/z</i>)	Abundância (%)	Íons e fragmentos (Sugestões)
Ácido copálico (304)	325	100,00	[M + Na - 2H] ⁻
	339	71,70	[M + Cl] ⁻
	265	57,34	[M + FA - C ₂ H ₄ - C ₄ H ₈ - H] ⁻
	99	20,70	[M-C ₁₅ H ₂₄ -H] ⁻
Ácido hidróxi-copálico (320)	325	100,00	[M + Na - H ₂ O] ⁻
	265	39,35	[M + FA - C ₂ H ₄ - C ₄ H ₈ O - H] ⁻
	355	16,35	[M + Cl] ⁻
	99	8,34	[M-C ₁₅ H ₂₄ O-H] ⁻
Ácido acetóxi-copálico (362)	325	100,00	[M + Na - H - CO ₂ CH ₃] ⁻
	249	39,59	[M-C ₆ H ₈ O ₂ -H] ⁻
	217	21,97	[M-H - H ₂ O - C ₆ H ₁₂] ⁻
	99	14,54	[M-C ₁₇ H ₂₆ O ₂ -H] ⁻
Ácido agático (334)	355	100,00	[M + Na - 2H] ⁻
	327	76,61	[M + K - 2H - CO ₂] ⁻
	99	62,25	[M-C ₁₅ H ₂₂ O ₂ -H] ⁻
	315	34,84	[M-H - H ₂ O] ⁻
Ácido poliáltico (316)	339	100,00	[M + NaFA - CO ₂ - H] ⁻
	297	38,01	[M-H - H ₂ O] ⁻
	175	26,19	[M - H - CO ₂ - C ₆ H ₈ O] ⁻
	315	21,12	[M - H] ⁻
Ácido hardwickíico (316)	175	100,00	[M - H - CO ₂ - C ₆ H ₈ O] ⁻
	271	38,52	[M - H - CO ₂] ⁻
	317	30,07	[M + FA - H - CO ₂] ⁻
	353	24,70	[M + K - 2H] ⁻
β- cariofileno (204)	167	100,00	[C ₁₀ H ₁₅] ⁺ + CH ₃ OH
	149	52,04	[C ₁₁ H ₁₇] ⁺
	103	49,03	M + 2H
	135	18,75	[C ₁₀ H ₁₅] ⁺
Óxido cariofileno (220)	167	100,00	[C ₁₀ H ₁₅] ⁺ + CH ₃ OH
	149	52,04	[C ₁₁ H ₁₇] ⁺
	135	15,14	[C ₁₀ H ₁₅] ⁺
	221	12,95	[M + H] ⁺

Diferentemente dos demais padrões terpênicos, o β -cariofileno e seu óxido foram caracterizados na fonte ESI positiva. Os íons m/z 167, m/z 149 e m/z 135 foram detectados nos espectros de ambos padrões sesquiterpênicos, mostrando similaridades estruturais pelos perfis obtidos por CCDAE-EM. O íon m/z 167 foi detectado na forma de aduto do solvente ($[C_{10}H_{15}]^+ + CH_3OH$) com 100% de abundância relativa em ambos os espectros. Os íons m/z 103 e m/z 221 correspondem a forma protonada do β -cariofileno $[M + 2H]^+$ e do seu óxido $[M + H]^+$, com abundância relativa de 49,0% e 12,9%, respectivamente. Fragmentos comuns ao cariofileno e ao óxido de cariofileno como os íons m/z 149 ($[C_{11}H_{17}]^+$) e m/z 135 ($[C_{10}H_{15}]^+$) foram detectados nos espectros de massas obtidos e já relatados na literatura, confirmando a autenticidades desses biomarcadores sesquiterpênicos (Kim et al., 2009).

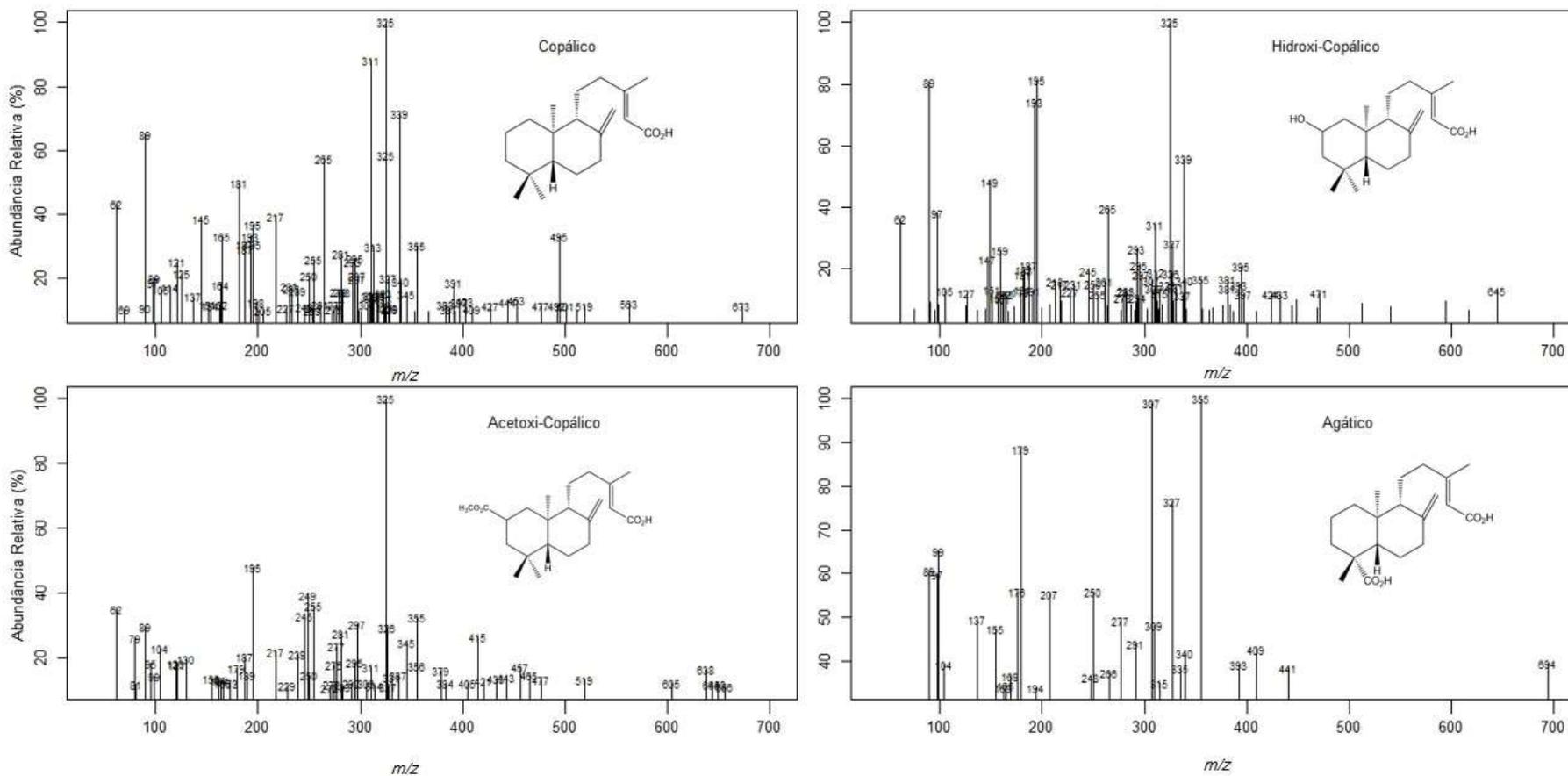


Figura 18. Espectros de massas dos ácidos copálico, hidroxi-copálico, acetoxi-copálico e agático, obtidos por CCDAE-EM.

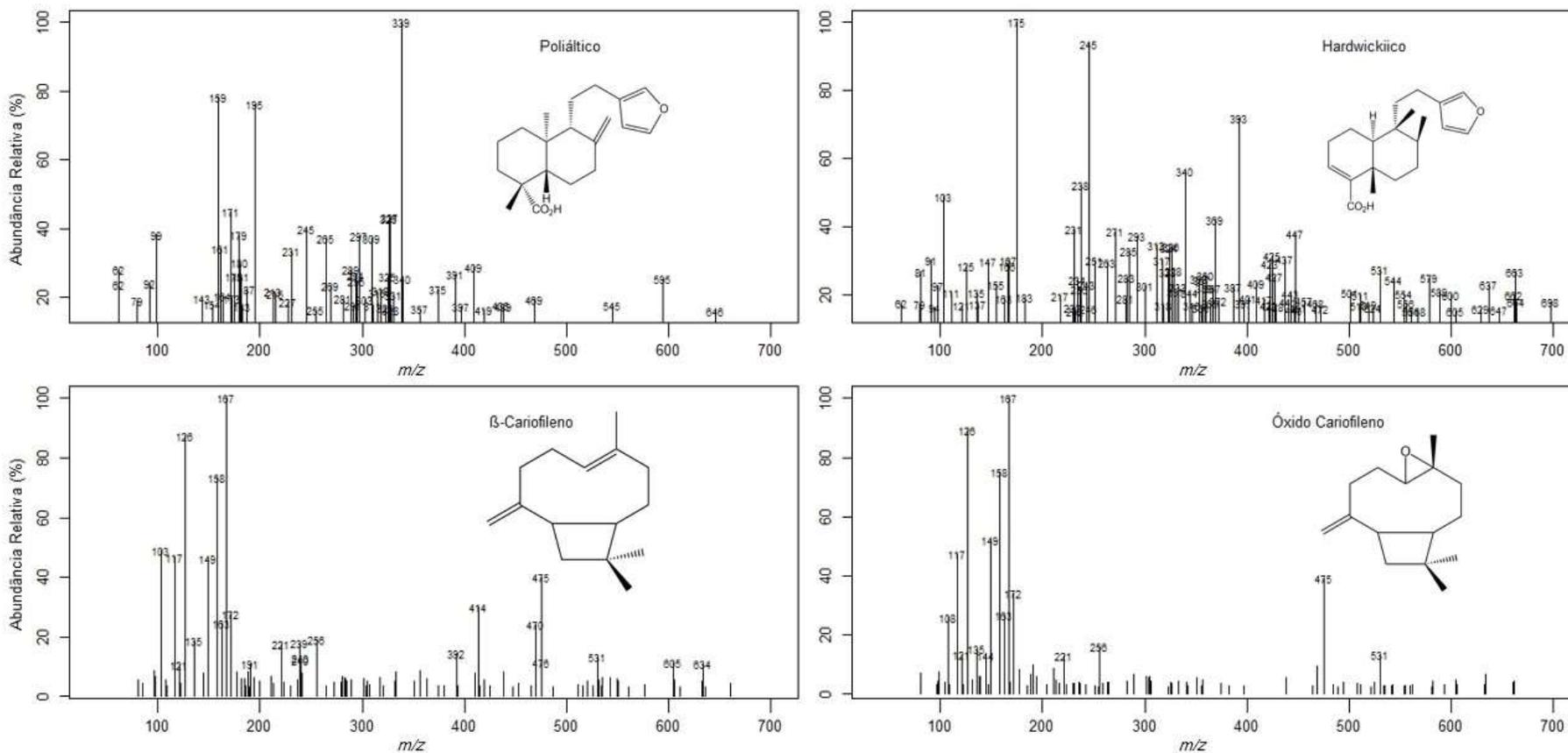


Figura 19. Espectros de massas dos ácidos poliáltico e hardwickiico e dos sesquiterpenos β-cariofileno e óxido de cariofileno obtidos por CCDAE-EM.

Adicionalmente, íons como m/z 45, m/z 62, m/z 89, m/z 113 e m/z 159, provavelmente originados do solvente de transferência para o massas ou dos aditivos utilizados na fase móvel ou até mesmo da placa cromatográfica foram observados nos espectros de massas. Esses íons são fortemente influenciados pelas características dos solventes utilizados, seja na pré-lavagem da placa, no sistema de eluição dos constituintes ou na transferência da amostra para o EM (Crotti et al., 2006; Holcapek et al., 2010; Trotsmuller et al., 2011; Morlock et al., 2014). Embora tenha sido observada a formação de clusters e artefatos, os espectros de massas de cada padrão terpênico foi caracterizado satisfatoriamente, confirmando suas autenticidades. Os principais íons foram detectados na forma de íons quase molecular, adutos e fragmentos específicos de cada molécula e comparados com a literatura.

5.2.3. Fator de retenção relativo (Rfr)

Entre diversos padrões de flavonoides, esteróis, ácidos graxos e terpenos que foram analisados com relação ao seu fator de retenção em condições próximas àquela que permitiu a observação dos principais marcadores químicos dos óleos de copaíba (resultados não apresentados), o óxido de linalol foi a substância que se mostrou mais adequada em termos de polaridade e repetibilidade das análises. Vários padrões comerciais foram experimentados para o desenvolvimento do fator de retenção relativo (Rfr). Entre os padrões empregados, alguns foram descartados por sua baixa polaridade e outros por coeluírem com os padrões terpênicos presentes na mistura de padrões. O benzoato de benzila e o caempferol são alguns dos padrões comerciais que foram testados para o desenvolvimento das curvas analíticas na fase inicial; o benzoato de benzila apresentou uma ótima banda de separação e também pouca interação com a fase estacionária, no entanto, apresentou Rf muito próximo ao do óxido de cariofileno,

gerando sobreposição das manchas; além disso, apresentou baixa absorção na detecção no ultravioleta, inviabilizando sua utilização como padrão de referência no desenvolvimento do Rfr. Por outro lado, a alta polaridade do caempferol contribuiu para interações mais fortes com a fase estacionária levando ao grande espalhamento da mancha, mesmo nas condições já otimizadas; além disso, sua alta polaridade também contribuiu para sua sobreposição com o ácido hidroxí-copálico, na região inferior da cromatoplaca. O óxido de linalol, um álcool monoterpênico, tem polaridade intermediária entre o benzoato de benzila e o caempferol e apesar de apresentar um pouco de interação com a fase estacionária, não coeluiu com nenhum padrão da mistura de padrões terpênicos; e portanto, foi o padrão de referência selecionado para o desenvolvimento do Rfr. Estabelecendo o fator de retenção do óxido de linalol, o fator de retenção relativo de cada padrão terpênico foi obtido dividindo seu valor de Rf pelo Rf do óxido de linalol (Fig. 20). Assim, as substâncias que eluem mais no sistema cromatográfico otimizado, mais apolares, e que eluíram mais que o óxido de linalol, possuem fator de retenção relativo a ele maiores que 1. Isso ocorreu para o β -cariofileno e seu óxido. O fator de retenção relativo do próprio óxido de linalol deve ser 1,00. Já os ácidos carboxílicos diterpênicos, mais polares que o padrão e que ficaram mais retidos, eluíram menos, todos com Rf menor, tiveram Rfr menores que 1.

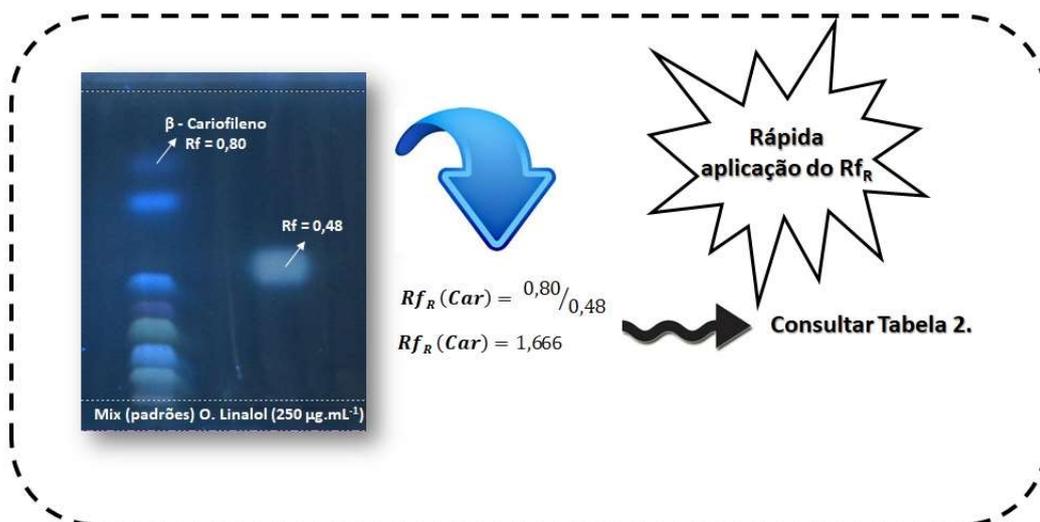


Figura 20. Ilustração prática da aplicação do fator de retenção relativo (Rfr).

O experimento foi conduzido pelo desenvolvimento da curva analítica de cada padrão terpênico em relação ao óxido de linalol. A seleção das concentrações do óxido de linalol para o desenvolvimento das curvas analíticas foi baseado em estudos preliminares, que incluíram o desenvolvimento de 9 placas feitas no CCDAE em 7 concentrações distintas. As concentrações foram selecionadas com base na sua detecção na cromatoplaça e de forma a abranger um amplo intervalo de aplicação (40 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As curvas analíticas foram obtidas pelo desenvolvimento de 10 placas cromatográficas obtidas no CCDAE, sob as mesmas condições cromatográficas e instrumentais em 6 concentrações (40, 70, 100, 250, 750, 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), gerando um total de 60 medições do Rfr para cada padrão terpênico.

Na figura 21, são apresentadas as curvas analíticas da obtenção do Rfr dos padrões terpênicos em função da concentração do óxido de linalol, juntamente com seus limites de predição. As curvas analíticas foram obtidas através de uma regressão linear em função do logaritmo neperiano (Ln) do óxido de linalol, cuja expressão matemática é descrita por

$$Y(x) = a + b \cdot \text{Ln}(x). \quad \text{Equação (1)}$$

Em que, $Y(x)$ representa o Rf_r do padrão terpênico e x a concentração do óxido de linalol. Para cada curva, o coeficiente de explicação, R^2 , obtido foi sempre maior que 99%, indicando que a variação na concentração do óxido de linalol é suficiente para explicar a variação no Rf_r dos biomarcadores. Em valores absolutos, o coeficiente de correlação, r , foi maior que 0,996, sugerindo uma excelente relação log-linear. A significância da regressão mostrou-se forte (valor $p < 0,01$) para todos os padrões terpênicos. A homocedasticidade dos resíduos e a ausência de outliers (Anexos 3-4) também foram verificados, respectivamente, através do teste de Breush-Pagan e da análise dos resíduos padronizados, evidenciando um bom ajuste da equação (1).

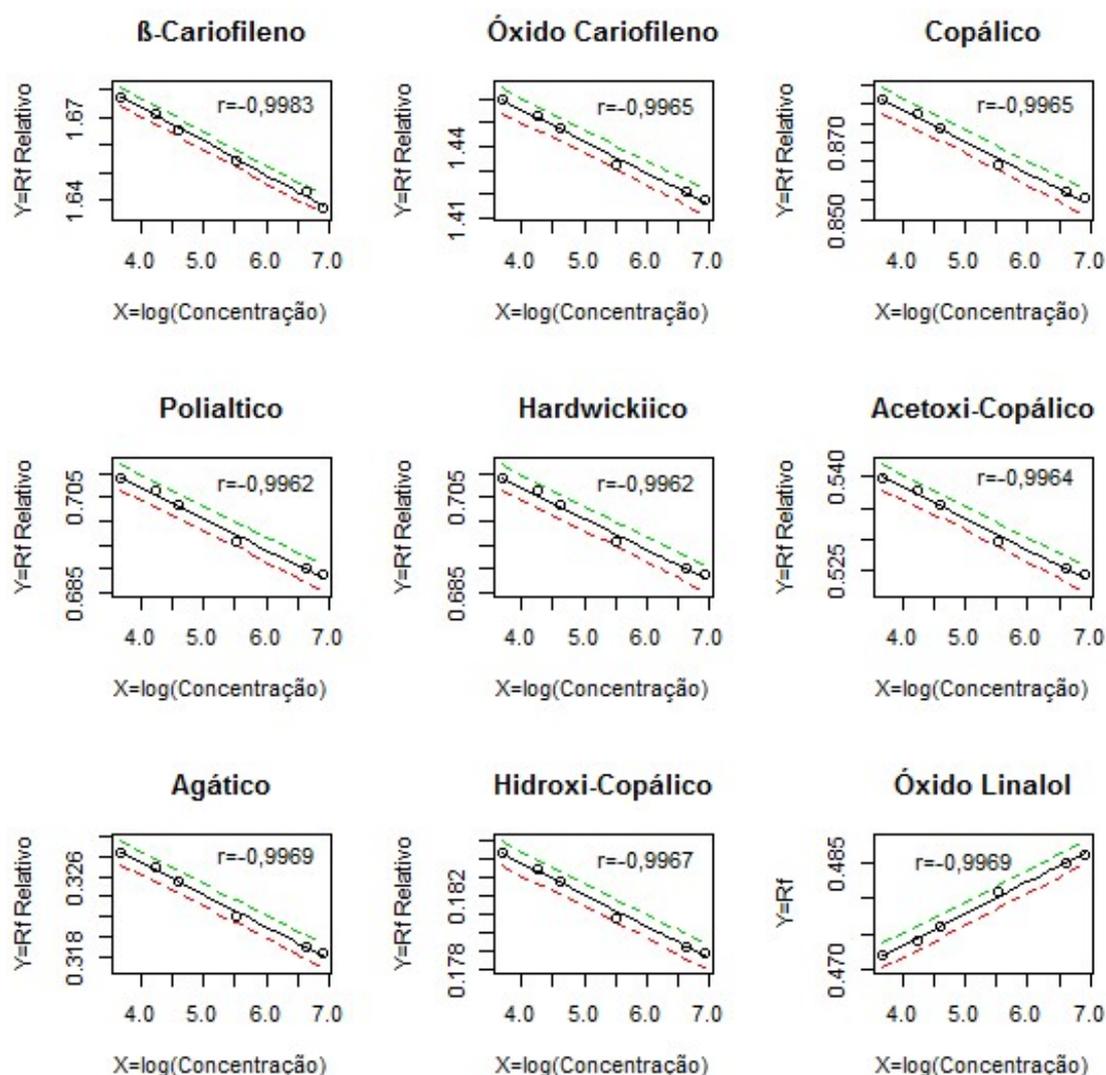


Figura 21. Curvas analíticas dos padrões terpênicos para obtenção do Rf_r.

Na tabela 5 são apresentados o fator de retenção relativo médio ($R_{fr(médio)}$), o desvio padrão (s) e a variação percentual (CV) na faixa de massa avaliada para cada padrão terpênico utilizado ($40 \mu\text{g/mL} - 750 \mu\text{g.mL}^{-1}$); assim como o coeficiente de explicação da curva, R^2 , o coeficiente de correlação associado e os parâmetros (a , b) estimados para a curva analítica de cada padrão terpênico.

Tabela 5. Dados de R_f relativo, variação percentual, parâmetros da curva analítica e coeficiente de explicação para os biomarcadores terpênicos.

Padrão terpênico	$R_{fr} \pm s$	CV (%)	a	b	r	R^2
β -cariofileno	$1,658 \pm 0,015$	0,892	1,7229	-0,0123	-0,9983	0,9968
Óxido Cariofileno	$1,437 \pm 0,016$	1,134	1,5087	-0,0133	-0,9965	0,9931
Copálico	$0,867 \pm 0,019$	1,158	0,9112	-0,0082	-0,9965	0,9930
Poliáltico	$0,698 \pm 0,008$	1,162	0,7337	-0,0066	-0,9962	0,9929
Acetoxi-Copálico	$0,532 \pm 0,006$	1,165	0,5586	-0,0051	-0,9964	0,9928
Agático	$0,323 \pm 0,004$	1,194	0,3400	-0,0032	-0,9969	0,9942
Hidroxi-Copálico	$0,181 \pm 0,002$	1,165	0,1907	-0,0017	-0,9967	0,9934

Como resultado das curvas analíticas, são apresentados na tabela 6 os limites de predição do R_{fr} obtido para cada padrão terpênico, de acordo com a concentração do óxido de linalol. A concentração do óxido de linalol foi restrita a uma faixa de massa de 50 a $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que normalmente atende as necessidades laboratoriais. A ampla faixa de massa utilizada possibilita a identificação desses marcadores químicos nos OCM's em diferentes disponibilidade do padrão autêntico de óxido de linalol; sendo possível a obtenção do R_{fr} mesmo quando há baixa disponibilidade do padrão de referência ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O R_{fr} surge também como alternativa para amenizar influencias ambientais, como a umidade relativa do ar, que afeta diretamente o R_f dos constituintes; portanto, mesmo que haja variações no R_f da substância, o R_{fr} obtido será proporcional a essas variações também.

Tabela 6. Dados de limites de predição do Rfr para identificação de biomarcadores terpênicos em óleos de copaíba (*Copaifera* sp.) de acordo com a concentração do óxido de linalol.

Concentração µg.mL⁻¹	β-cariofileno	Óxido Cariofileno	Ácido copálico	Ácido hardwickiico	Ácido acetóxi-copálico	Ácido agático	Ácido hidróxi-copálico
50	[1,671 - 1,678]	[1,451 - 1,462]	[0,876 - 0,882]	[0,705 - 0,711]	[0,537 - 0,541]	[0,326 - 0,329]	[0,183 - 0,185]
100	[1,663 - 1,669]	[1,442 - 1,452]	[0,870 - 0,877]	[0,701 - 0,706]	[0,533 - 0,537]	[0,324 - 0,327]	[0,182 - 0,183]
150	[1,658 - 1,664]	[1,437 - 1,447]	[0,867 - 0,873]	[0,698 - 0,703]	[0,531 - 0,535]	[0,323 - 0,325]	[0,181 - 0,183]
200	[1,655 - 1,661]	[1,433 - 1,443]	[0,865 - 0,871]	[0,696 - 0,701]	[0,530 - 0,534]	[0,322 - 0,324]	[0,181 - 0,182]
250	[1,652 - 1,658]	[1,430 - 1,440]	[0,863 - 0,869]	[0,695 - 0,700]	[0,529 - 0,533]	[0,321 - 0,324]	[0,181 - 0,182]
300	[1,650 - 1,656]	[1,428 - 1,438]	[0,861 - 0,868]	[0,693 - 0,699]	[0,528 - 0,532]	[0,321 - 0,23]	[0,180 - 0,181]
350	[1,648 - 1,654]	[1,426 - 1,436]	[0,860 - 0,866]	[0,692 - 0,698]	[0,527 - 0,531]	[0,320 - 0,323]	[0,180 - 0,181]
400	[1,646 - 1,652]	[1,424 - 1,434]	[0,859 - 0,865]	[0,691 - 0,697]	[0,526 - 0,530]	[0,320 - 0,322]	[0,180 - 0,181]
450	[1,645 - 1,651]	[1,422 - 1,432]	[0,858 - 0,864]	[0,691 - 0,696]	[0,526 - 0,530]	[0,320 - 0,322]	[0,179 - 0,181]
500	[1,643 - 1,650]	[1,421 - 1,431]	[0,857 - 0,863]	[0,690 - 0,695]	[0,525 - 0,529]	[0,319 - 0,322]	[0,179 - 0,181]
550	[1,642 - 1,649]	[1,420 - 1,430]	[0,856 - 0,863]	[0,689 - 0,695]	[0,525 - 0,529]	[0,319 - 0,321]	[0,179 - 0,180]
600	[1,641 - 1,648]	[1,418 - 1,429]	[0,856 - 0,862]	[0,689 - 0,694]	[0,524 - 0,528]	[0,319 - 0,321]	[0,179 - 0,180]
650	[1,640 - 1,647]	[1,417 - 1,428]	[0,855 - 0,861]	[0,688 - 0,694]	[0,524 - 0,528]	[0,318 - 0,321]	[0,179 - 0,180]
700	[1,639 - 1,646]	[1,416 - 1,427]	[0,854 - 0,861]	[0,688 - 0,693]	[0,523 - 0,528]	[0,318 - 0,320]	[0,179 - 0,180]
750	[1,638 - 1,645]	[1,415 - 1,426]	[0,854 - 0,860]	[0,687 - 0,693]	[0,523 - 0,527]	[0,318 - 0,320]	[0,179 - 0,180]

5.2.4. Aplicação do Fator de retenção relativo (Rfr) nos óleos de *C. multijuga*

A metodologia desenvolvida para a rápida identificação dos principais marcadores químicos, por meio do fator de retenção relativo (Rfr) foi aplicada a três espécimes de óleos de *Copaifera multijuga* (Fig. 22). Os óleos de copaíba (1,0 mg.mL⁻¹) e o óxido de linalol (100 µg.mL⁻¹) foram aplicados (10 µL) nas placas de CCDAE sob as mesmas condições cromatográficas para a caracterização de seus Rf's. O β-cariofileno [Rfr = (0,78/0,47 = 1,659)], o óxido de cariofileno [Rfr = (0,68/0,47 = 1,447)], o ácido copálico [Rfr = (0,41/0,47 = 0,872)] e o acetoxi-copálico [Rfr = (0,25/0,47 = 0,532)] foram identificados satisfatoriamente através do Rfr (Fig. 22). Os resultados obtidos para os valores do Rfr de cada marcador nas oleoresinas foram comparados com os limites de predição a 95% de confiança, disponíveis na tabela 6, a 100 µg.mL⁻¹ do óxido de linalol.

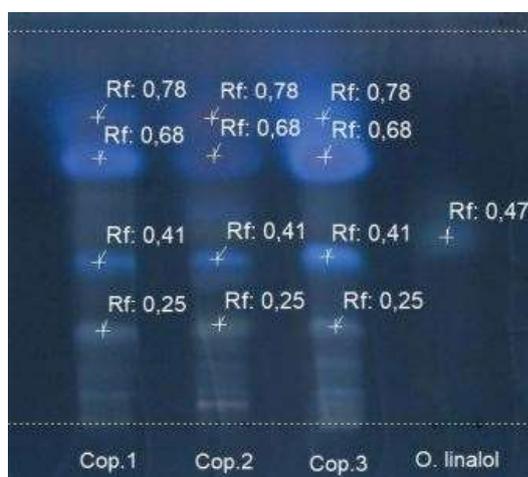


Figura 22. Identificação dos principais marcadores terpênicos dos óleos de *C. multijuga* pelo Rfr.

Legenda: β-cariofileno (Rf = 0,78); óxido de cariofileno (Rf = 0,68); ácido copálico (Rf = 0,41); acetoxi-copálico (Rf = 0,25); óleos de *C. multijuga* (Cop 1; Cop 2 e Cop.3); o óxido de linalol foi usado na concentração de 100 µg.mL⁻¹.

A principal característica dos óleos de *C. multijuga* é a presença maioritária do β-cariofileno (Rf = 0,78) e do ácido copálico (Rf = 0,41); além do β-cariofileno, seu óxido (Rf = 0,68) também é comumente relatado em concentrações variáveis (Barbosa et al.,

2012; Barbosa et al., 2013). O ácido copálico é o principal diterpeno detectado nos óleos de *C. multijuga*. Entretanto, seus derivados, os ácidos acetóxi-copálico ($R_f = 0,25$) e hidróxi-copálico, são também frequentemente relatados nos óleos dessa espécie (De Lima et al., 2020). O Rfr permitiu a caracterização e identificação desses marcadores químicos com êxito, mostrando a relevante aplicação do Rfr nos OCM's por CCDAE. A metodologia desenvolvida mostrou-se uma excelente alternativa para a caracterização dos principais marcadores químicos dos OCM's, principalmente dos ácidos diterpênicos, que são obtidos por isolamento em bancada e usualmente não estão disponíveis comercialmente. Além disso, a utilização do Rfr dispensa a derivatização das oleoresinas, que é uma etapa obrigatória nas análises por cromatografia em fase gasosa, possibilitando a rápida caracterização desses marcadores. Não obstante, o Rfr pode ser aplicado a outras oleoresinas do gênero *Copaifera* para caracterização de alguns de seus principais marcadores terpênicos.

5.3. CCDAE Fingerprinting: detecção de adulterantes em óleos de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) e confirmação por CCDAE-EM e Análises quimiométricas.

A ampla utilização dos óleos de copaíba na medicina popular e o grande potencial desses óleos nas indústrias farmacêutica e de cosméticos têm estimulado a prática da adulteração, visando a maior rentabilidade dos óleos de copaíba. As adulterações mais comuns são aquelas realizadas com óleos vegetais comestíveis, como os óleos de soja; esses óleos apresentam cor e viscosidade parecidos com os óleos de copaíba e por isso, são facilmente despercebidos visivelmente. Normalmente, a detecção das adulterações nos óleos de copaíba são realizadas por cromatografia em fase gasosa, mas, seu alto custo de aquisição e manutenção têm restringido sua utilização em muitos laboratórios.

Nesta seção, será apresentado a utilização da CCDAE como técnica alternativa para a detecção de adulterantes nos OCM's. Para tanto, foram realizadas algumas simulações de processos de adulterações com óleos vegetais (soja e milho) e óleo diesel; essas simulações foram realizadas em microescala e em baixos percentuais dos óleos adulterantes, para avaliar a sensibilidade da CCDAE quanto aos óleos adulterantes. As adulterações dos OCM's foram detectadas por CCDAE-UV, confirmadas por CCDAE-EM e análises quimiométricas.

5.3.1. Caracterização dos OCM's autênticos e adulterados por CCD.

Os 10 (dez) óleos autênticos de *C. multijuga* foram analisados inicialmente por CCD nas mesmas condições cromatográficas desenvolvidas para os padrões terpênicos na seção 5.2.1; o volume de aplicação e a concentração dos OCM's foram otimizados nesta etapa e o melhor perfil cromatográfico foi obtido quando 10 μL da oleoresina, solubilizada em 1 mL de diclorometano, foram aplicados na cromatoplaça na concentração de 1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os constituintes químicos foram detectados visualmente por absorção no ultravioleta (254 nm e 366 nm) e pela utilização de reveladores químicos (vanilina sulfúrica e etanol sulfúrico). As condições cromatográficas desenvolvidas para a separação dos padrões terpênicos na seção 5.2.1 foram aplicadas satisfatoriamente nos 10 OCM's e apresentaram boa separação dos seus constituintes.

Os cromatogramas obtidos por CCD mostraram as duas regiões que caracterizam os óleos de copaíba (Fig. 23). Os sesquiterpenos foram eluídos na região superior da placa, enquanto que os diterpenos, constituintes mais polares dos óleos de copaíba, eluíram na região inferior da cromatoplaça, com valores de R_f inferiores a 0,5. Os perfis cromatográficos obtidos por CCD estão de acordo com os perfis obtidos por CG-EM apresentados na seção 5.1.1 (Fig. 14); Algumas diferenças qualitativas foram observadas

entre os espécimes e também nas intensidades das manchas, sugerindo a ocorrência de possíveis variações quantitativas dos constituintes. No entanto, apesar dessas observações, os principais marcadores químicos dos OCM's, representados pelos Rf's 0,82, 0,69, 0,50 e 0,24 foram observados em todos os óleos analisados; essas características comuns aos 10 espécimes mostram que existe um padrão de composição química nos OCM's, mesmo que seja numa análise exploratória como na CCD.

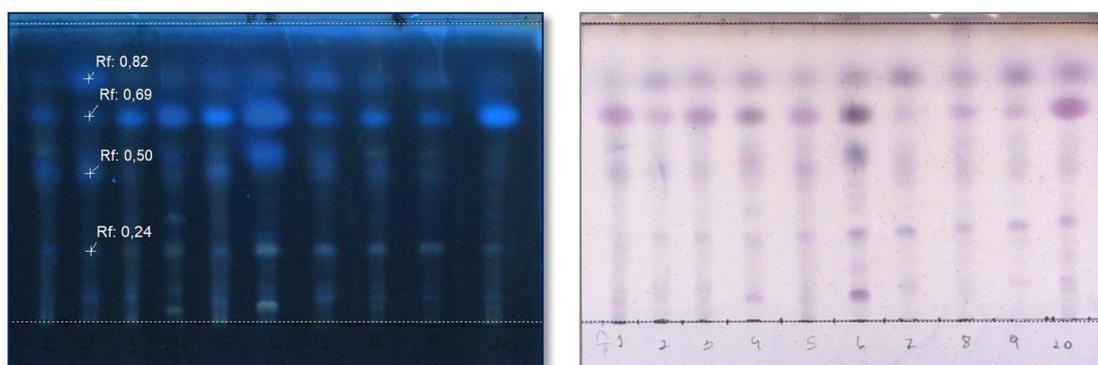


Figura 23. Cromatograma dos 10 óleos de *C. multijuga* obtidos por CCD. Revelação a 366 nm (esquerda) e a luz visível (direita).

Os óleos adulterantes também foram analisados por CCD nas mesmas condições cromatográficas aplicadas aos óleos de copaíba (Fig. 24). Por se tratarem de óleos vegetais, os óleos de soja e milho apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, ao contrário do óleo diesel, que apresentou um perfil distinto. Os perfis obtidos para os óleos de soja e milho foram típicos de óleos graxos, com detecção de quatro manchas; a principal delas foi detectada na região apolar do cromatograma (R_f [Soja] = 0,79 e R_f [Milho] = 0,80). De acordo com a composição química relatada para esses óleos vegetais, essas manchas podem estar relacionadas a triacilglicerídeos, que são os constituintes predominantes nesses óleos. As outras três manchas foram detectadas na região mais polar do cromatograma (R_f 's = 0,45; 0,53; 0,59) e possivelmente estão relacionadas aos ácidos graxos, constituintes minoritário dos óleos vegetais (Tonin et al. 2018).

A análise do óleo diesel mostrou três manchas principais (Fig. 24), duas delas na região apolar do cromatograma (R_f 's = 0,74 e 0,81) e a outra na região mais polar (R_f = 0,53), também presente nos óleos vegetais. O perfil cromatográfico obtido para o óleo diesel parece estar de acordo com a literatura que relata uma composição de hidrocarbonetos lineares, ésteres etílicos graxos e alguns compostos mais oxidados (Faria et al. 2007; Rocha et al. 2008).

Após a caracterização dos R_f 's dos principais constituintes dos óleos de *C. multijuga* e dos óleos adulterantes, deu-se início às simulações das adulterações dos OCM's, conforme descrito na seção seguinte.

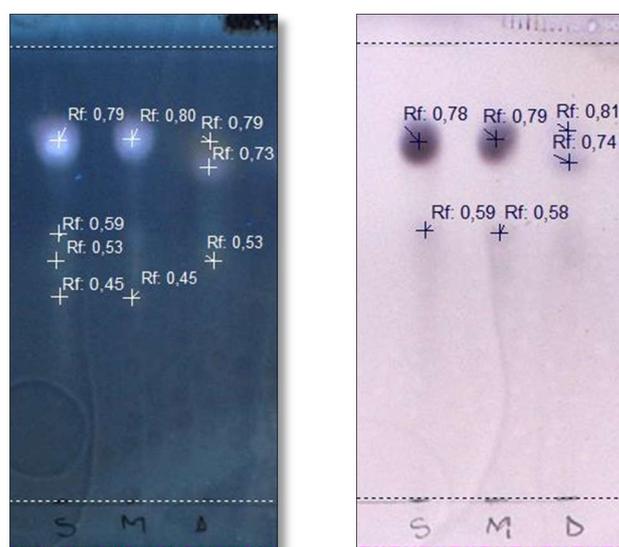


Figura 24. Perfil cromatográfico dos óleos adulterantes obtidos por CCD.

Legenda: S = óleo de soja; M = óleo de milho; D = óleo diesel; (A) = detecção em etanol sulfúrico; (B) = detecção em vanilina sulfúrica.

5.3.2. Caracterização química dos OCM's autênticos e adulterados por CCDAE.

As adulterações dos OCM's com os óleos de soja e milho foram realizadas nas mesmas proporções, e variaram de 2,3% a 33,0% dos óleos adulterantes (v/v); e as adulterações com o óleo diesel foram feitas a partir de 4,5%. Os percentuais das adulterações foram selecionados experimentalmente, baseados na sensibilidade de cada

adulterante na mistura com os óleos de copaíba, por meio da CCD. Os estudos experimentais para seleção dos percentuais das adulterações foram realizados em OCM's com características químicas distintas, de forma a incluir tanto aqueles óleos que contêm muitos sesquiterpenos, quanto aqueles que apresentam pouco sesquiterpenos. Após a definição dos percentuais das adulterações, os 10 OCM's foram adulterados com os óleos de soja, milho e diesel, nas condições pré-estabelecidas, e analisados por CCDAE para detecção das adulterações.

Os constituintes químicos dos OCM's adulterados foram detectados por meio de reveladores físicos (U. V. 254 nm e U. V. 366 nm) e químicos (vanilina e EtOH sulfúrico) e comparados com óleos autênticos de *C. multijuga* e também com os óleos adulterantes. Os cromatogramas dos OCM's adulterados obtidos por CCDAE são apresentados em anexo (Anexos 5-13) com todos os níveis de adulterações. A percepção das adulterações variou bastante entre os óleos adulterados. Além da sensibilidade dos óleos adulterantes no CCDAE, a variação na composição química dos OCM's influenciou diretamente na detecção visual das adulterações; em alguns óleos as adulterações foram facilmente observadas, principalmente naqueles, cujo teor dos sesquiterpenos foram baixos; isto porque é na região de eluição dos sesquiterpenos que as principais manchas que caracterizam as adulterações são observadas. Por outro lado, a detecção das adulterações nos OCM's com alto teor sesquiterpênico foi um tanto dificultada, devido à forte presença de alguns sesquiterpenos; que por sua vez se sobrepõem fortemente sobre a mancha do adulterante. No entanto, a utilização dos dois reveladores químicos (vanilina e etanol sulfúrico) deram suporte a essas detecções, auxiliando na confirmação das adulterações duvidosas.

A influência da composição química na detecção das adulterações com óleos vegetais pode ser observada no quadro 2, onde é apresentado o resumo dos limites de

detecção visual (LDv) de cada adulterante nos óleos de copaíba. Os LD foram obtidos a partir de observações visuais que descaracterizaram o perfil autêntico dos OCM's; pois dessa forma é possível inferir as adulterações sem a presença de um óleo de referência. O LDv das adulterações realizadas com óleo de soja variou bastante, desde o menor valor possível (2,3%) ao máximo avaliado (33,0%). Mesmo com todas as variações observadas na detecção das adulterações com o óleo de soja, 6 dos 10 óleos analisados tiveram suas adulterações detectadas abaixo de 9,0% e 4 deles com detecção de 23,0%, em pelo menos um dos reveladores utilizados.

Oleoresinas	Detecção	Percentual de adulteração nos óleos de <i>C. multijuga</i> (%)		
		Soja	Milho	Diesel
C27	Rev. 1	23,0	23,0	33,0
	Rev. 2	23,0	23,0	-
C20	Rev. 1	33,0	23,0	33,0
	Rev. 2	4,5	4,5	-
C8	Rev. 1	9,0	23,0	23,0
	Rev. 2	2,3	2,3	-
C29	Rev. 1	2,3	-	23,0
	Rev. 2	2,3	23,0	-
C33	Rev. 1	4,5	-	23,0
	Rev. 2	4,5	9,0	33,0
C41	Rev. 1	23,0	23,0	-
	Rev. 2	23,0	33,0	-
C14	Rev. 1	23,0	33,0	23,0
	Rev. 2	9,0	9,0	-
C11	Rev. 1	9,0	33,0	-
	Rev. 2	33,0	-	-
C44	Rev. 1	23,0	23,0	-
	Rev. 2	23,0	33,0	33,0

Quadro. 2. Limite de detecção visual (LD) dos adulterantes nos óleos de *C. multijuga*.

Legenda: Rev. 1 = vanilina sulfúrica; Rev. 2 = Etanol sulfúrico.

As adulterações com óleo diesel foram caracterizadas pela presença de duas manchas; a principal delas, mais fácil de se observar e também mais intensa, elui numa região extremamente favorável à sua detecção, pois não se sobrepõe a nenhuma mancha dos OCM's. No entanto, apesar dessas características dos três adulterantes estudados, o óleo diesel mostrou menor sensibilidade ao CCDAE e por isso apresentou maior LDv; as adulterações dos OCM's realizadas com óleo diesel foram detectadas apenas com 23,0 e 33,0% do óleo adulterante; e em alguns casos (2 OCM's), a complexa composição química dos OCM's inviabilizaram a detecção das adulterações com óleo diesel.

No entanto, considerando que as adulterações mais comuns são aquelas realizadas com óleos comestíveis de soja, e que mesmo com as variações na composição química dos OCM's, a maior parte das adulterações com soja foi detectada abaixo de 9,0%, a CCDAE mostrou-se uma técnica apropriada para rápida detecção de adulterantes nos óleos dessa espécie. Contudo, as diluições dos óleos de copaíba com óleos de vegetais comestíveis não ocorrem apenas com 10, 20 ou 30% do adulterante, e sim com quantidades bem superiores às estudadas nesta tese. Portanto, nossos resultados proporcionaram a rápida detecção visual das principais adulterações que ocorrem nos OCM's, de forma simples e barata, quando comparadas à técnicas mais onerosas, como a CG.

Além disso, as análises foram realizadas com pequenas quantidades da amostra (1,0 mg), ao contrário de outras técnicas, como o índice de acidez e de éster (Vasconcelos e Godinho, 2002), índice de refração (Barbosa et al. 2009) e até mesmo a espectroscopia de infravermelho (Moreira e Braga, 2017; Moreira e Braga, 2021) que são empregadas para avaliar a pureza dos óleos de copaíba. Outra vantagem consiste no fato dessas análises serem realizadas sem nenhum tipo de pré-tratamento da amostra, como as esterificações dos OCM's, que são necessárias para análises em CG. Embora, a complexa

composição química de alguns OCM's tenha dificultado a detecção de algumas adulterações com óleo diesel, as adulterações com óleo de soja foram todas detectadas satisfatoriamente. A CCDAE mostrou ser uma técnica útil na rápida detecção das adulterações, principalmente com óleo de soja; mesmo nos OCM's de composição mais complexa, a detecção dessas adulterações foram 3 vezes mais sensíveis que na CCD; e nos óleos de composição mais simples as detecções foram 10 vezes mais sensíveis (Barbosa et al. 2009).

5.3.3. Caracterização das adulterações por cromatografia em camada fina de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CCDAE-EM).

As análises em CCDAE-EM foram realizadas em dois OCM's com perfis cromatográficos distintos e escolha dos óleos foi baseada nos perfis obtidos por CCDAE. O primeiro deles apresentou um perfil com poucas manchas (copaíba 8 - C8), tanto na região sesquiterpênica (região superior da placa) quanto na região diterpênica (região inferior da placa). O segundo óleo (copaíba 20 - C20) apresentou um grande número de manchas distribuídas por toda a região da placa cromatográfica, com tons fortes e intensos na região de eluição dos sesquiterpenos (Fig. 25).

Os óleos selecionados foram analisados por CCDAE-EM em apenas três dos cinco percentuais de adulteração avaliados; esses percentuais corresponderam ao nível mais baixo de adulteração (A) e aos níveis médio (B) e alto (C) (Fig. 25). Nas adulterações com óleos de soja, os níveis selecionados para as análises em CCDAE-EM foram de 2,3% (A), 9,0% (B) e 33,0% (C); e nas adulterações com óleo diesel foram de 4,5% (A), 23,0% (B) e 33,0% (C). Os percentuais selecionados para cada adulterante foram diferentes porque foram baseados na sensibilidade de cada adulterante na CCDAE.

Os cromatogramas dos OCM's que foram analisados por CCDAE-EM são apresentados na figura 25. Em cada cromatograma é apresentado o óleo de copaíba

autêntico, na 1a. aplicação, seguido de suas adulterações com os óleos de soja, milho, diesel, e uma mistura dos óleos adulterantes. Embora as adulterações com os três adulterantes sejam apresentadas nesses cromatogramas, apenas as adulterações com óleos de soja e diesel foram analisadas por CCDAE-EM.

Após a aplicação dos OCM's na placa de CCDAE e após a eluição dos constituintes, as manchas que caracterizaram as adulterações foram extraídas diretamente da placa cromatográfica e transferidas para o espectrômetro de massa para aquisição dos espectros, conforme ilustrado na figura 7. Os espectros de massas foram obtidos em várias energias de ionização (30, 50, 70 e 100 eV), na fonte ESI e também no modo de ionização positivo e negativo, afim de obter a melhor caracterização dos adulterantes nos OCM's. As melhores condições de ionização foram alcançadas, no modo positivo com energia de 100 eV, na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹. As manchas que caracterizaram as adulterações foram analisadas individualmente por CCDAE-EM e seus espectros de massas foram comparados com os espectros das manchas correspondentes nos OCM's autênticos (Anexos 14-17).

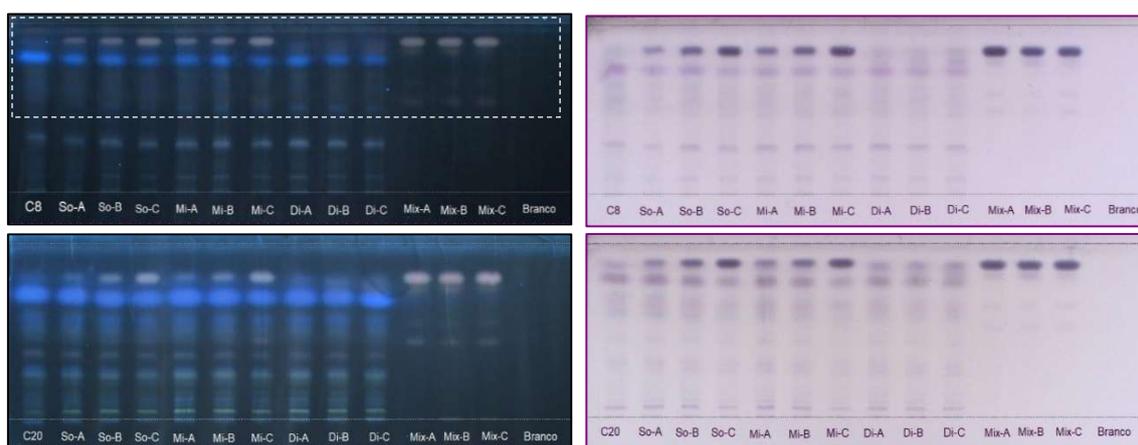


Figura 25. Cromatogramas dos OCM's selecionados para análise em CCDAE-EM. Revelação a 366 nm (esquerda) e a luz visível (direita).

Para cada óleo de copaíba foram obtidos 27 espectros de massas. As adulterações realizadas com óleo de soja foram caracterizadas pela presença de 4 manchas, que geraram 4 espectros de massas, que foram avaliados em 3 níveis de adulteração (A, B e

C); portanto, as adulterações com óleo de soja geraram 12 espectros. As adulterações com óleo diesel foram caracterizadas pela presença de 3 manchas, que também foram avaliadas em 3 níveis de adulteração (A, B e C) e geraram um total de 9 espectros de massas. Todas as manchas que caracterizaram as adulterações foram comparadas respectivamente com o óleo autêntico de *C. multijuga*, portanto, cada óleo autêntico gerou 6 espectros de massas. Então, para os 2 OCM's avaliados foram obtidos 24 espectros de massas das adulterações com óleo de soja, 18 espectros das adulterações com óleo diesel e 12 espectros dos 2 OCM's autênticos, gerando um total de 54 espectros de massas, todos obtidos na faixa de massa de m/z 40 - 1000.

Os espectros de massas obtidos geraram uma matriz X com 54 linhas e 960 colunas, a qual foi inicialmente analisada por Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Hierárquica de Cluster (HCA) (Hair-Junior et al., 2005). Cada linha da matriz representa um espectro de massas de um dos Rf's avaliados (OCM's autênticos e adulterados) e as colunas representam a abundância dos íons observados nos espectros de cada Rf. Essa matriz foi decomposta em três partes, $X = CP' + E$. Onde C é chamada matriz dos escores da componente, P é a matriz de pesos (ou coeficientes) e E é a matriz de erros (ruídos). As matrizes “ C ” e “ P ” são estimadas (por Regressão) de forma a minimizar os erros “ E ” (minimizar a influência do ruído) e, por isso, o método é chamado algumas vezes de PCR (Regressão por Componentes Principais). Nessa representação matricial, os escores fornecem a composição das PC's em relação às amostras (espectro de massas dos Rf's), enquanto os pesos (coeficientes) fornecem essa mesma composição em relação aos íons observados nos espectros; e o estudo conjunto de escores e pesos permite avaliar a influência de cada íon em cada espectro de massas dos Rf's.

Na figura 26, é apresentado o mapa de scores dos espectros de massas de cada Rf, obtido pela análise das duas primeiras componentes principais (Dim 1 e Dim 2); essas

componentes explicam 25,11% de toda variação gerada pela abundância de íons nos espectros. Para formação dos clusters foi utilizado como variável de similaridade o peso do íon na PC e sua presença no espectro. O mapa de escores fornece evidências da formação de 4 clusters, que foram confirmados pela análise hierárquica de cluster (HCA) (Fig. 27). O cluster 1 foi constituído por todas as copaíbas C8 adulteradas com óleos de soja e com óleo diesel; o cluster 2 foi formado por todos os scores das duas copaíbas autênticas (C8 e C20) e os clusters 3 e 4 foram constituídos pelos óleos da copaíba C20 adulterados com óleo diesel e com soja, respectivamente.

Pelo mapa de scores é possível observar que há diferenças entre os OCM's autênticos e adulterados; também percebemos que existe uma certa influência da composição química dos OCM's na detecção das adulterações. As adulterações da copaíba C20 foram agrupadas em 2 clusters: o primeiro deles foi caracterizado predominantemente pelas adulterações com óleo diesel (Cluster 3) e o segundo, pelas adulterações com óleo de soja (Cluster 4). Um dos escores das adulterações com soja (C20SoAR1, no cluster 4) mostrou alguma similaridade com as copaíbas autênticas (cluster 2); essas observações estão em consonância com os perfis cromatográficos apresentados na figura 25, em que a detecção da adulteração com óleo de soja (So), no nível mais baixo (A) do Rf1 foi imperceptível visivelmente, mostrando similaridade com o óleo autêntico. Similarmente, um score das adulterações com o óleo soja (C20SoCR4) foi classificado no cluster das adulterações com óleo diesel (cluster 3), mostrando fortes similaridades entre os dois clusters, provavelmente devido aos íons de ácidos graxos presentes nesses dois adulterantes. Por outro lado, as adulterações da copaíba C8 foram classificadas todas no mesmo cluster, mostrando predominância dos íons dos OCM's, ao contrário do observado na copaíba C20. Os diferentes comportamentos dos 2 OCM's analisados evidenciam a influência da composição química dos óleos dessa espécie na

detecção das adulterações e essas observações corroboram com o mapa de scores em que a PC1 foi representada pela copaíba C20 adulterada com óleo de soja e a PC2 pela copaíba C20 adulterada com óleo diesel.

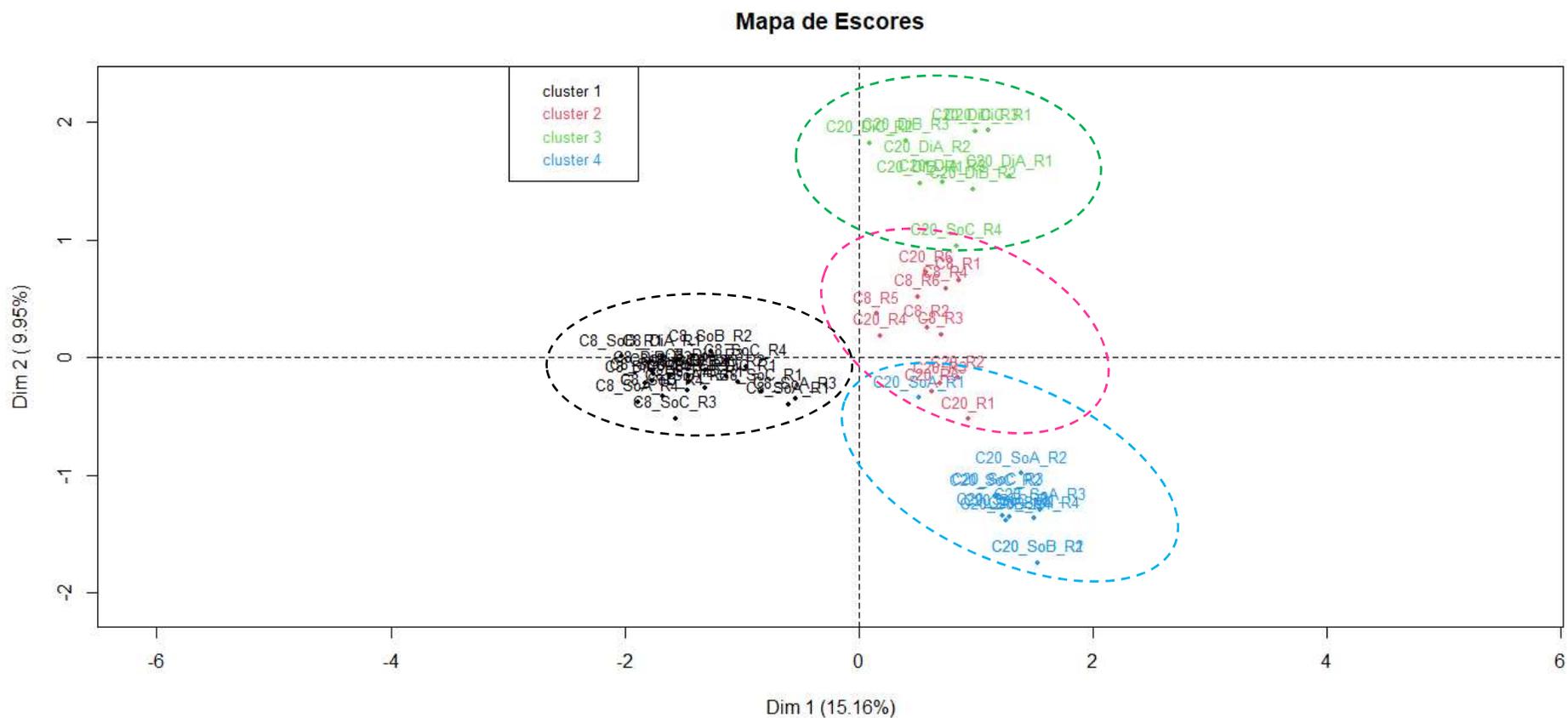


Figura 26. Mapa dos scores das duas primeiras componentes principais dos espectros de massas obtidos por CCDAE-EM dos OCM's autênticos e adulterados.

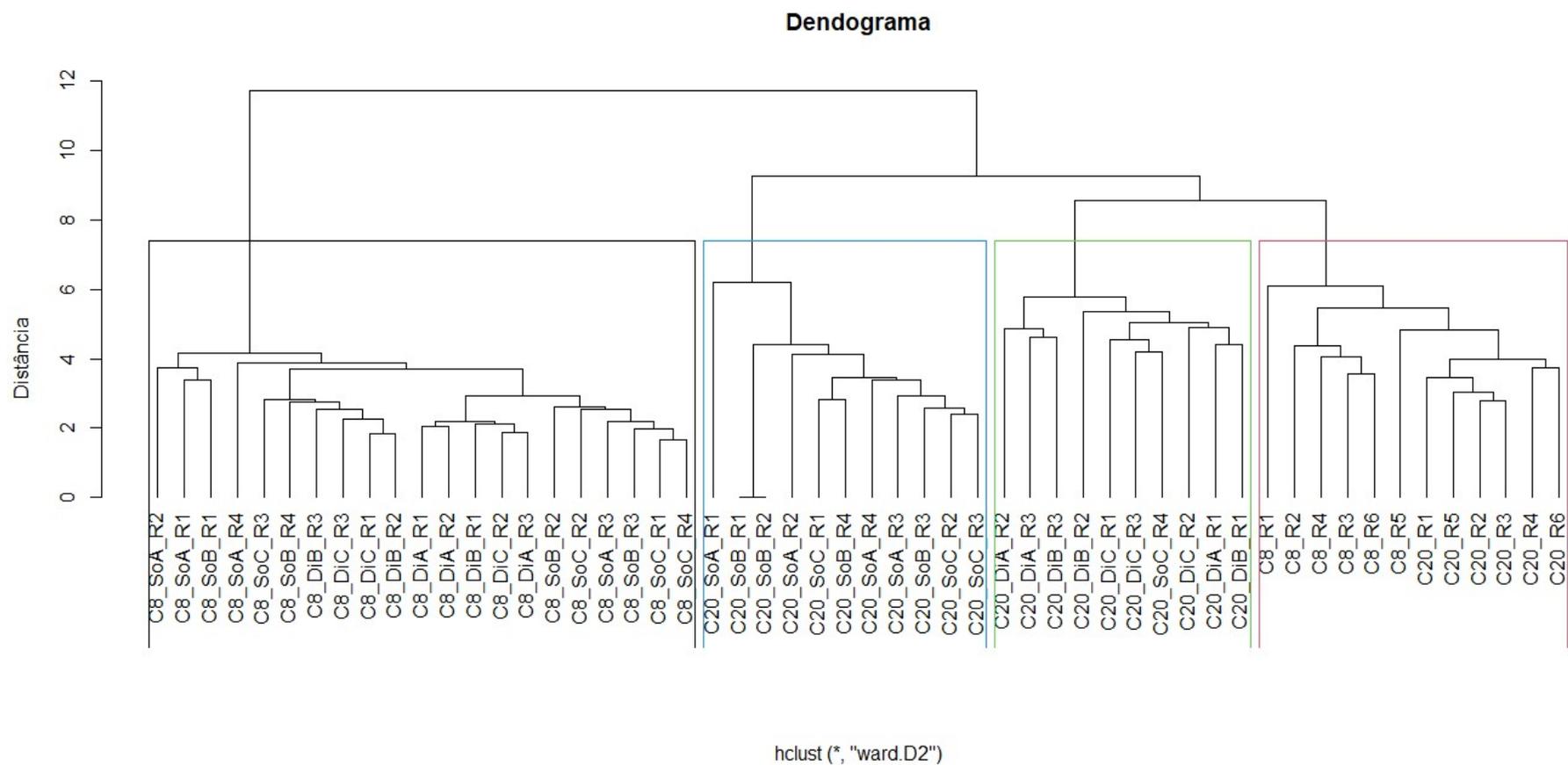


Figura 27. Dendograma obtido pela Análise Hierárquica de Cluster (HCA) dos espectros de massas obtidos por CCDAE-EM dos OCM's autênticos e adulterados.

Na figura 28 é apresentada a densidade de probabilidade dos pesos positivos em relação aos íons observados nos espectros de massas, de acordo com os clusters formados na HCA. Em A é apresentada a densidade de probabilidade dos pesos dos íons das copaíbas autênticas (C20 e C8); em B, da copaíba C20 adulterada com óleo diesel (C20d), em C, da copaíba C20 adulterada com óleo de soja (C20s) e em D, é apresentada a densidade dos pesos da copaíba C8 adulterada com óleo de soja e também com óleo diesel (C8sd). Cada um desses grupos apresentou uma característica específica quanto à densidade do peso de seus íons, que permitiram diferenciá-los uns dos outros. Resumidamente, as copaíbas autênticas (C8 e C20) apresentaram maior densidade na região de massa de m/z 200-300; o grupo da C20s apresentou maior densidade a partir de m/z 700; as C20d mostraram maior densidade do peso de seus íons na região de m/z 500-700; por fim, as C8sd apresentaram maior densidade na região de m/z 100-500, com destaque no intervalo de m/z 300-400.

A densidade dos pesos dos íons das copaíbas puras (C8 e C20), apresentou um perfil esperado para um OCM autêntico. A maior densidade dos íons é esperada na região inicial do espectro (m/z 200-300), devido à presença dos sesquiterpenos e dos diterpenos; os sesquiterpenos mais comuns nos OCM's apresentam uma faixa de massa de m/z 204, m/z 220 e m/z 222, a exemplo o β -cariofileno, óxido de cariofileno e α -cadinol. Por outro lado, os diterpenos mais comuns nos óleos dessa espécie apresentam uma faixa de massa entre m/z 300 e m/z 400. Como a maior parte da composição química dos OCM's é constituída por sesquiterpenos, é esperado que a maior densidade dos pesos dos íons seja observada na região inicial do espectro, entre m/z 200 e m/z 250, conforme observado na figura 28. Devido à composição minoritária dos diterpenos nos óleos

dessa espécie, é esperado um decréscimo na densidade de íons na região de ionização desses constituintes (m/z 300 - 400).

O grupo da C20s (C) foi caracterizado pela brusca redução na densidade de íons na região inicial do espectro e pelo aumento acentuado na região acima de m/z 700. Essas observações estão em consonância com os poucos relatos disponíveis na literatura, que descrevem um comportamento similar para outros óleos de copaíba adulterados com óleos vegetais (Veiga-Junior e Pinto, 2005). A baixa densidade de íons na região inicial do espectro pode estar relacionada com a redução dos sesquiterpenos devido à sua solubilidade nos triacilgliceróis (TAG's), que são os constituintes maioritário dos óleos de soja. Os TAG's são constituintes apolares que apresentam longas cadeias carbônicas e alto peso molecular; normalmente apresentam massas moleculares a partir de m/z 800, e espera-se que seus principais fragmentos sejam observados na região final do espectro de massas.

O grupo da C20d (B) também apresentou redução na densidade de íons na região inicial do espectro, porém, menos pronunciada que nas adulterações com óleo de soja; a maior densidade dos pesos dos íons foi observada na região central do espectro com destaque na região de m/z 500-700. O perfil obtido para essas adulterações está em consonância com a composição do óleo adulterante, que é constituído maioritariamente por hidrocarbonetos lineares e pequenas quantidades de TAG's; essas observações também corroboram com Veiga-Junior e Pinto (2005) que relataram a redução da região sesquiterpênica de óleos de copaíba quando adulterados com óleo diesel.

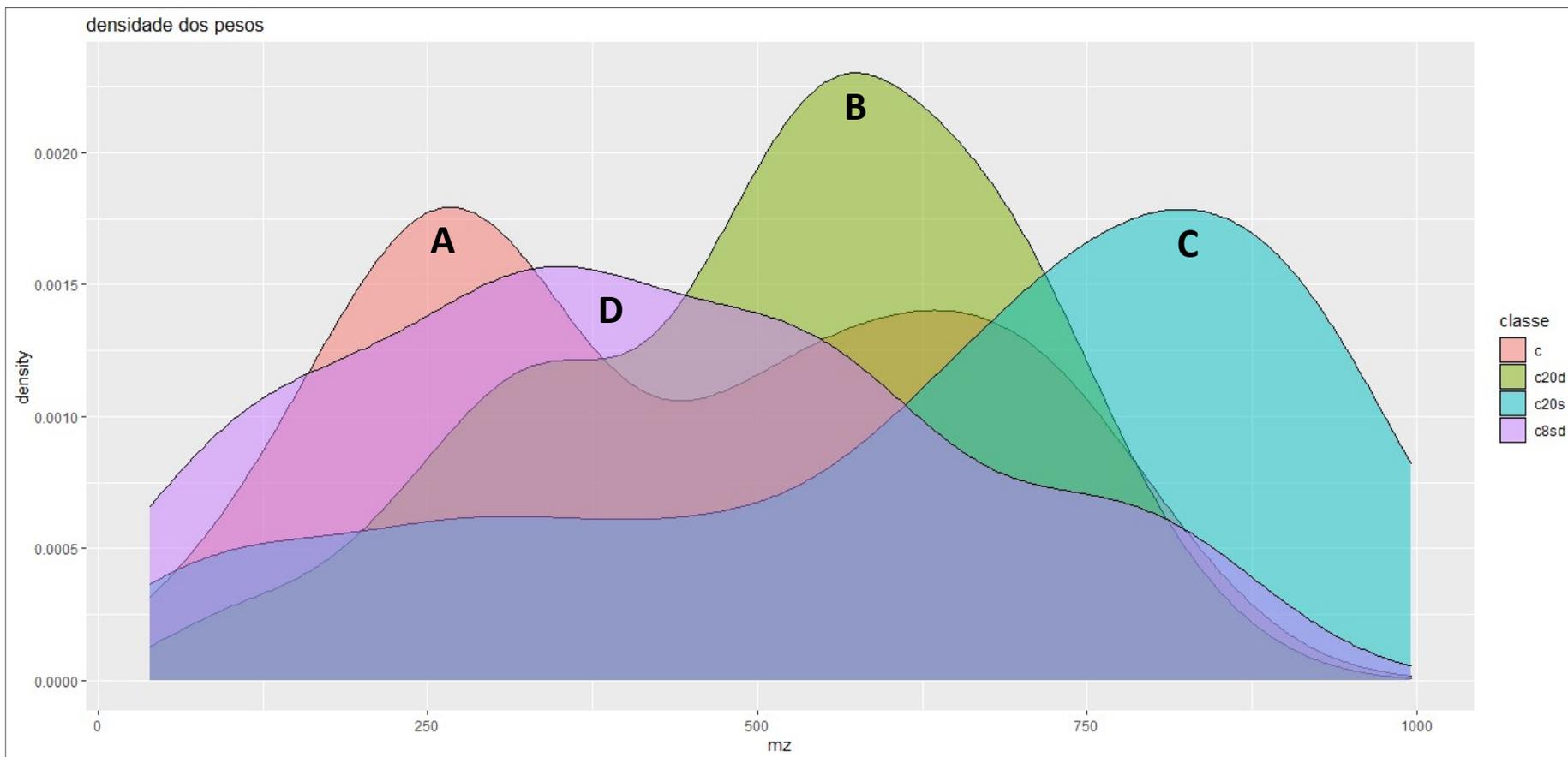


Figura 28. Densidade dos pesos positivos dos íons dos EM de acordo com os clusters formados na HCA.

Legenda: **A** = copaibas autênticas; **B** = copaíba C20 adulterada com óleo diesel (C20d); **C** = copaíba C20 adulterada com óleo de soja (C20s); **D** = copaíba C8 adulterada com óleos de soja e diesel (C8sd).

O grupo da C8sd apresentou um perfil diferente das outras adulterações (C20s e C20d). Todos os óleos adulterados da copaíba C8 foram classificados nesse grupo, mostrando predominância dos íons dos OCM's em relação aos íons dos óleos adulterantes. Foi observada uma leve redução na densidade de íons na região inicial do espectro (m/z 100-300) e um aumento na região de m/z 300-500, em relação aos óleos autênticos. O perfil dessas adulterações mostrou grande densidade de íons na região central do espectro (m/z 100-600), caracterizando a presença dos hidrocarbonetos lineares presentes maioritariamente no óleo diesel e alguns poucos íons dos TAG's, provenientes da soja, na região final do espectro.

O gráfico da densidade dos pesos dos íons (Fig. 28) mostra as regiões mais importantes na formação de cada grupo. Dessa forma, os íons mais importantes na formação do grupo das copaíbas autênticas foram principalmente aqueles relacionados aos sesquiterpenos (m/z 200-300), que neste caso, correspondem aos íons mais abundantes; para a formação do grupo das C20s os íons mais importantes, ou seja, aqueles com maior peso, foram os íons dos Tag's, presentes na região final do espectro (a partir de m/z 800); para a formação do grupo C20d os íons com maiores pesos foram aqueles presentes na região de m/z 500-700, relacionados aos hidrocarbonetos lineares do óleo diesel; por fim, apesar do peso relevante de vários íons dos OCM's, os íons mais importantes na formação do grupo C8sd foram relacionados aos óleos adulterantes.

É importante destacar que os íons de maior abundância em um espectro de massas não são necessariamente os mais importantes para classificação ou discriminação dos grupos; a formação dos grupos pode ser baseada tanto na abundância quanto na especificidade dos íons, aos quais foi atribuído um peso (P), conforme sua importância na classificação. Nesse sentido, o íon mais importante também pode ser um íon de baixa

intensidade e, se não fosse através dos pesos (coeficientes da regressão), poderia passar despercebido durante a análise visual dos espectros de massas.

No quadro 3 são apresentados alguns dos íons com maior peso na formação e discriminação dos grupos. Para os OCM's autênticos os íons com maior peso foram aqueles, possivelmente relacionados ao β -cariofileno; mas, também, outros íons relacionados aos principais diterpenos, como os ácidos copálico, agático e acetoxi-copálico, também apresentaram pesos relevantes. Embora vários íons relacionados aos terpenoides de copaíba tenham apresentados pesos relevantes no grupo das C20s, os maiores pesos foram atribuídos aos íons de grande massa molecular, possivelmente relacionados aos TAG's e seus principais fragmentos de DAG's e MAG's. Mesmo que alguns íons dos óleos de copaíba também tenham apresentado pesos relevantes, os íons mais importantes na formação do grupo C20d foram relacionados a possíveis fragmentos de hidrocarbonetos lineares (m/z 550, 564, 632, 646), DAG's (m/z 551) de TAG's (m/z 881). Conforme observado no gráfico da densidade dos pesos (Fig. 28), o grupo C8sd apresentou maior similaridade com os óleos autênticos em relação aos grupos das C20s e das C20d, e os principais íons responsáveis pela formação desse grupo foram relacionados aos OCM's autênticos e aos óleos adulterantes, conforme observado no quadro 3. Os íons de maior peso apresentados no quadro 3 estão em consonância com o gráfico de densidade dos pesos (Fig. 28) que destaca as principais regiões de massa que caracterizaram cada grupo e justificam a formação classificação dos grupos apresentados na PCA e na HCA.

Constituintes	Copaíba autêntica	C8sd	C20d	C20s
β -cariofileno	84 [M + H + 2Na] 187 [M + H - H ₂ O] 431 [2M + Na] 136; 170; 176	91 [M + 3Na] 132; 168;	125 [M + 2Na] 109	227 [M + Na] 158
O. cariofileno	81 [M + 2H + Na]	442 [2M + H]	442 [2M + H] 464 [2M + Na]	122 [M + H + Na] 254 [M + CH ₃ OH + H]
Copálico	305 [M + H]	-	-	288 [M + H - H ₂ O] 327 [M + Na] 610 [2M + H]
Agático	692 [2M + Na]	335 [M + H] 357 [M + Na]	-	190 [M + 2Na]
Aco-copálico	121 [M+3H]	385 [M + Na]	193 [M + H + Na] 363 [M + H]	193 [M + H + Na]
MAG's	-	-	-	312; 340
DAG's	-	519; 531; 557	551	595 (LnLn)
TAG's	-	745; 764; 831 (PLP)	881 [M + H] / OLL	833 [M + H] / PPO 835 [M + H] / PPS 859 [M + H] / POO 889 [M + H] / SSO 901 [M + Na] / LLL 901 [M + Na] / LnLO 924 [M + Na] / ALL 787;
Hidrocarbonetos lineares	-	-	550; 564; 632; 646	-

Quadro. 3. Íons mais importantes para o agrupamento dos espectros de massas dos Rf's e uma possível identificação para eles com base na literatura.

Após a análise exploratória da HCA e PCA, utilizou-se a análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA, veja seção 4.4.5) para verificar se a CCDAE-EM pode ser aplicada adequadamente para detecção de adulteração em OCM's. A PLS-DA é uma variante da PLS-R (Pérez-Enciso e Tenenhaus, 2003) que é usada quando a variável de interesse é categórica, neste caso, para discriminação entre óleos autênticos e adulterados; também, é especialmente adequada para lidar com modelos que têm muitos mais preditores (íons) do que observações (amostras de espectros). Baseado nos resultados indicados pela HCA e PCA, elaborou-se inicialmente um modelo PLS-DA com 4 classes (C, C8sd, C20d, C20s) e variou-se o número de componentes principais, começando com 2 componentes até minimizar a taxa de erro de classificação, prevista pelo processo de validação cruzada por leave-one-out (LOO).

O quadro 4, chamado de matriz de confusão, apresenta as taxas de erros da PLS-DA com 2 e 4 componentes principais. Observa-se que com 2 componentes a taxa de erro é de 9,26%, com 5 classificações indevidas, entre elas, uma copaíba adulterada (*C8_SoA_R1) classificada como autêntica. Embora não mostrada no quadro 4, ainda na fase de calibração do modelo, a taxa de erro obtida com 3 componentes foi 7,4% e para 4 componentes a taxa de erro foi zerada independente do nível da adulteração e do óleo adulterante.

Amostras	C	C8sd	C20d	C20s	C	C8sd	C20d	C20s
C	10	*2	0	0	12	0	0	0
C8sd	1*	20	0	0	0	21	0	0
C20d	0	0	7	*2	0	0	9	0
C20s	0	0	0	12	0	0	0	12
Ncomp = 2, taxa de erro = 9,26 %					Ncomp = 4, taxa de erro = 0,0 %.			

Quadro. 4. Taxa de classificação para o PLS-DA com 2 e 4 componentes principais (Ncomp).

A partir disso, foi proposto um modelo de PLS-DA com apenas 3 classes (copaíbas autênticas – C; copaíbas adulteradas com óleo de soja – Cs e copaíbas adulteradas com óleo diesel – Cd) e 4 componentes principais; para este modelo foi obtido 100% de classificação correta para os OCM's autênticos e apenas 1 copaíba adulterada com óleo diesel foi classificada no grupo das copaíbas adulteradas com óleo de soja; mas, do ponto de vista prático não altera a discriminação correta dos óleos autênticos. Para estas 3 classes a taxa de erro foi zerada com 5 componentes.

A análise em PLS-DA não mostrou diferenças entre os OCM's autênticos; também não diferenciou se um ou outro óleo de copaíba está adulterado com óleo de soja ou com diesel; entretanto, separou adequadamente os óleos adulterados com soja e também aqueles adulterados com óleo diesel dos óleos autênticos. Esses resultados estão de acordo com os perfis obtidos por CCDAE-UV, que embora tenham sido observado diferenças visuais entre os 2 OCM's na detecção em etanol sulfúrico (Fig. 25), elas foram similares na detecção em vanilina, apresentando pouca influência na detecção das adulterações. Essas diferenças visuais podem estar relacionadas ao teor dos sesquiterpenos oxigenados, já que as diferenças mais expressivas são relacionadas a esses sesquiterpenos (Tabela 1).

O gráfico de classificação por PLS-DA (Fig. 29) mostrou a classificação de todas as classes avaliadas, distinguindo os OCM's autênticos dos óleos adulterados com soja e também com óleo diesel; é importante observar que mesmo nos baixos percentuais de adulterações (2,3 % para as adulterações com soja), a discriminação entre os grupos foi realizada satisfatoriamente, demonstrando a viabilidade da CCDAE-EM na detecção de adulterações dos OCM's com óleos de soja e diesel. Deste modo, as análises em CCDAE-EM confirmaram a potencial utilização da CCDAE-UV na detecção desses adulterantes em óleos de *C. multijuga*.

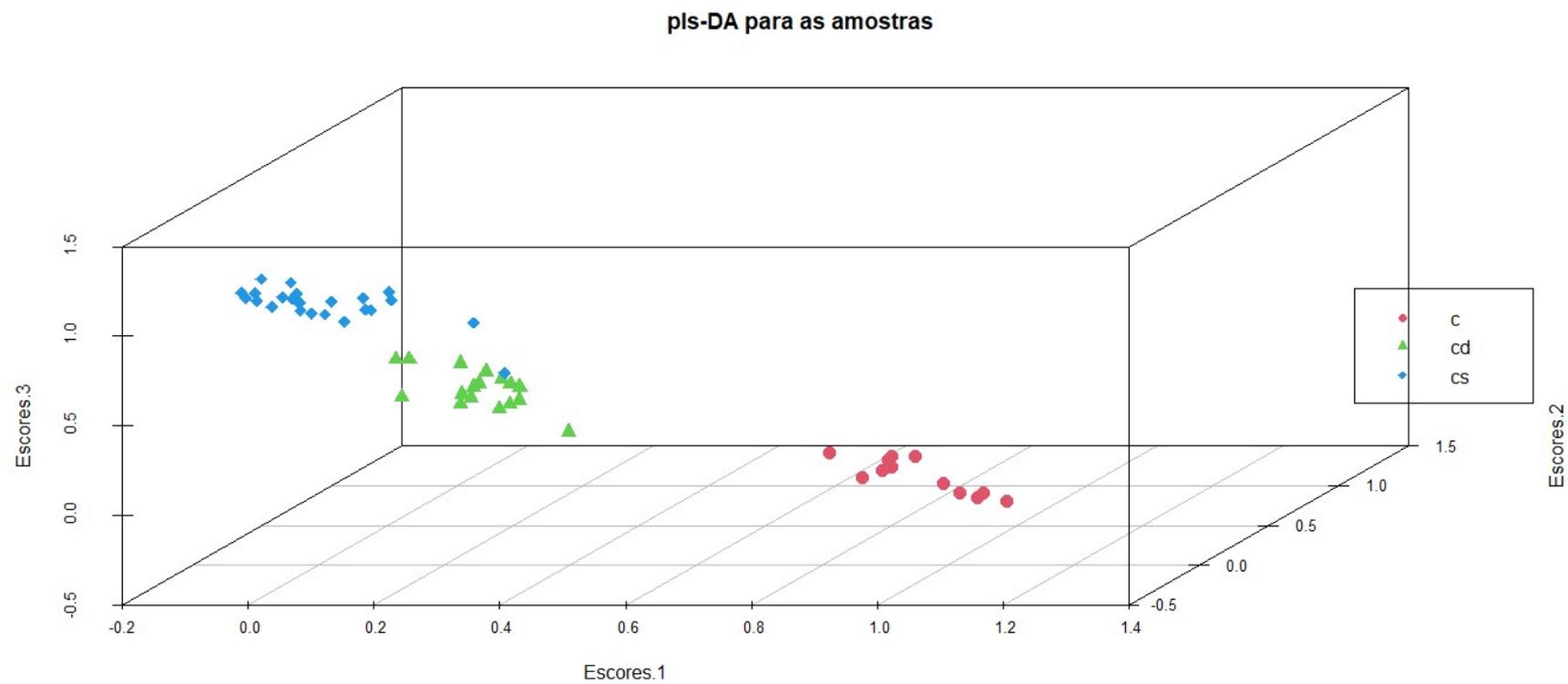


Figura 29. Classificação dos OCM's autênticos e adulterados por PLS-DA.

Legenda: C = copaíbas autênticas; Cd = copaíbas adulteradas com óleo diesel; Cs = copaíbas adulteradas com óleo de soja.

5.4. Esterificação dos óleos de copaíba (*Copaifera* sp.)

A esterificação dos óleos de copaíba é uma etapa necessária para análises em CG, pois ela possibilita a detecção e caracterização dos constituintes mais polares, como os ácidos diterpênicos. Diversas metodologias de esterificação estão disponíveis na literatura, no entanto, nem todas são adequadas aos óleos de copaíba. As mais comuns são realizadas em meio ácido, na presença dos ácidos sulfúrico, clorídrico e trifluoreto de boro (Millinsk et al., 2008). Também há vários relatos que descrevem a esterificação dos óleos de copaíba com diazometano, no entanto, é um reagente tóxico, potencialmente explosivo e necessita de um longo período de preparação. Apesar dos riscos envolvidos, o número de publicações envolvendo a esterificação de óleos de copaíba com diazometano mostra sua eficiência (Braga et al., 1998; Pinto et al., 2000; Tappin et al., 2004; Veiga-Junior e Pinto, 2005; Biavatti et al., 2006; Veiga-Junior et al., 2007; Barbosa et al., 2012). Por conta de sua explosividade, o Sal de Diazald, reagente para a preparação do reagente diazometano, parou de ser comercializado mundialmente, o que impediu que esse reagente continuasse a ser empregado em esterificações, mesmo em micro-escala,

Por décadas, a esterificação dessas oleoresinas representou um dos maiores obstáculos nas análises por cromatografia a gás, que é a técnica clássica usada no controle de qualidade e autenticidade dos óleos de copaíba. Isto porque, normalmente, as esterificações correspondem a reações que envolvem reagentes nocivos à saúde, associados a várias etapas e baixa reprodutibilidade. Por esta razão, a destilação tornou-se uma etapa “comum” na separação dos constituintes voláteis e não voláteis dos óleos de copaíba (Sousa et al., 2011; Carneiro et al., 2018). Por sua grande acessibilidade, a hidrodestilação está entre as técnicas de destilação mais usadas, porém, não proporciona uma separação eficiente (Xavier-Junior et al., 2017). Mesmo sendo bastante descrita nas

análises de óleos de copaíba, a hidrodestilação pode comprometer a integridade dos constituintes por degradação e/ou oxidação, devido ao longo tempo de extração (Veiga-Junior e Pinto, 2002). Outras formas de separação, como a destilação molecular (Galúcio et al., 2016; Ribeiro et al., 2018) e a extração dos terpenoides voláteis por headspace também são relatadas para os óleos de copaíba (Da Silva et al., 2020).

Diante do exposto, nesta seção será apresentada uma comparação das principais metodologias de esterificação empregadas nos óleos de copaíba. Os óleos esterificados foram analisados por CG-EM e seus cromatogramas foram comparados com uma metodologia de esterificação *in situ*, realizada com TMSD. Para avaliar a influência das metodologias de esterificação na integridade dos constituintes, utilizamos 2 óleos de copaíba de duas espécies diferentes: 01 (um) óleo de *C. multijuga* (OCM), que apresenta no máximo 10% de ácidos diterpênicos em sua composição e 01 (um) óleo de *C. reticulata* (OCR), que tem em média 50,0% de ácidos.

5.4.1. Rendimentos

Os dois óleos de copaíba (OCM e OCR) foram derivatizados em triplicata, utilizando quatro metodologias de esterificação por meio de catálise ácida (H_2SO_4 , HCl e duas com BF_3). Os maiores rendimentos foram obtidos para os óleos de *Copaifera reticulata* (OCR), exceto nas esterificações realizadas com HCl (Quadro 5). Como essas oleoresinas apresentam maior teor diterpênico, já era esperado que os maiores rendimentos fossem atribuídos a elas.

Os melhores rendimentos médios e os menores coeficientes de variação (C.V.) foram obtidos nas esterificações realizadas com ácido sulfúrico (H_2SO_4). Nos OCM's, os menores rendimentos foram observados nas esterificações realizadas com BF_3 (BF_3/JAC e BF_3/MET); neste caso, os baixos rendimentos podem estar relacionados tanto ao

reagente de esterificação utilizado ($\text{BF}_3/\text{Metanol}$) quanto as etapas envolvidas nos procedimentos experimentais. Essas observações estão em consonância com os C.V. obtidos nestas metodologias; no caso específico das esterificações realizadas com BF_3/MET o alto C.V. obtido tanto na esterificação dos OCM's (16,89%) quanto dos OCR's (25,32%) pode estar relacionado especificamente com a filtração simples, realizada nesta metodologia. Nesses casos, o que se está avaliando é a repetibilidade do método. O rendimento em si, na verdade, deveria ser maior que 100% (com a adição da metila às carboxilas), os valores menores indicam o quanto do material submetido à esterificação foi recuperado.

Os procedimentos experimentais das esterificações dos OCM's realizados com HCl também parecem ter exercido algum tipo de influência no rendimento das esterificações. O alto C.V. obtido (12,41%) mostra a baixa reprodutibilidade nesta metodologia, que pode ser facilmente compreendida pelas diversas etapas envolvidas; neste caso particular, a quantidade da oleoresina usada na esterificação ($50\mu\text{L}$) parece ser a principal causadora desta variação, já que envolve outros fatores como o manuseio adequado e calibração da pipeta.

Essas metodologias são simples, acessíveis e fáceis de serem realizadas, porém, envolvem várias etapas que dependem exclusivamente do analista. Outros fatores como a calibração de equipamentos de pequeno porte, como balanças e pipetas, também dificultam a reprodutibilidade do experimento. Embora se tenha utilizado a mesma balança, pipetas, vidrarias e reagentes, não foi possível obter uma boa reprodução entre as réplicas. Para avaliar a eficiência das metodologias de esterificação utilizadas e a influência dessas metodologias na composição química dos óleos de copaíba, todas as esterificações foram analisadas por CCDAE e posteriormente por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

	Metodologias	Massa da oleoresina (mg)	Massa obtida (mg)	Rendimento (%)	Rendimento médio (%)	DP	C.V. (%)
OCM	HCl	M ₁ = 18,10 M ₂ = 21,90 M ₃ = 21,10	M ₁ = 11,70 M ₂ = 17,80 M ₃ = 14,30	R ₁ = 64,64 R ₂ = 81,28 R ₃ = 67,77	71,23	8,84	12,41
	H₂SO₄	M ₁ = 125,10 M ₂ = 125,30 M ₃ = 125,50	M ₁ = 114,50 M ₂ = 115,00 M ₃ = 110,50	R ₁ = 91,53 R ₂ = 91,78 R ₃ = 88,05	90,45	2,09	2,31
	BF₃ (JAC)	M ₁ = 25,60 M ₂ = 25,30 M ₃ = 25,40	M ₁ = 13,60 M ₂ = 13,30 M ₃ = 14,80	R ₁ = 53,13 R ₂ = 52,57 R ₃ = 58,27	54,65	3,14	5,75
	BF₃ (MET)	M ₁ = 75,30 M ₂ = 75,10 M ₃ = 75,80	M ₁ = 34,60 M ₂ = 44,80 M ₃ = 48,80	R ₁ = 45,95 R ₂ = 59,65 R ₃ = 64,38	56,66	9,57	16,89
	HCl	M ₁ = 28,20 M ₂ = 28,60 M ₃ = 22,80	M ₁ = 20,40 M ₂ = 18,80 M ₃ = 15,60	R ₁ = 72,34 R ₂ = 65,73 R ₃ = 68,42	68,83	3,32	4,83
OCR	H₂SO₄	M ₁ = 125,10 M ₂ = 125,20 M ₃ = 125,20	M ₁ = 122,30 M ₂ = 117,00 M ₃ = 120,80	R ₁ = 97,76 R ₂ = 93,45 R ₃ = 96,49	95,90	2,21	2,31
	BF₃ (JAC)	M ₁ = 25,20 M ₂ = 25,00 M ₃ = 25,70	M ₁ = 20,70 M ₂ = 21,10 M ₃ = 18,80	R ₁ = 82,14 R ₂ = 84,40 R ₃ = 73,15	79,90	5,95	7,45
	BF₃ (MET)	M ₁ = 75,50 M ₂ = 75,00 M ₃ = 75,50	M ₁ = 43,20 M ₂ = 71,00 M ₃ = 68,00	R ₁ = 57,22 R ₂ = 94,67 R ₃ = 90,07	80,65	20,42	25,32

Quadro. 5. Rendimentos das reações de esterificação.

OCM = Óleo de *Copaifera multijuga*; **OCR** = Óleo de *Copaifera reticulata*; **R₁** = Réplica 1; **R₂** = Réplica 2; **R₃** = Réplica 3; **DP** = Desvio padrão; **C.V.** = Coeficiente de variação.

5.4.2. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE-UV)

Os óleos de copaíba esterificados (OCM e OCR) com as 4 metodologias foram analisados por CCDAE e seus perfis cromatográficos são apresentados na figura 30. Na figura 30A e 30B são apresentadas as triplicatas das esterificações realizadas com HCl e são comparadas com 1 OCM e com 1 OCR brutos; em A é apresentado a detecção dos constituintes em etanol sulfúrico e em B, em vanilina sulfúrica. Algumas mudanças foram observadas no perfil dos óleos esterificados, sugerindo que algum tipo de reação possa ter ocorrido em ambos os óleos; nos OCM's houve uma visível mudança de Rf de um possível diterpeno de 0,27 para 0,43 (Fig. 30A); ainda nos OCM's, o sesquiterpeno de Rf = 0,69, possivelmente o óxido de cariofileno (substância roxa) teve aumento no valor do seu Rf (Fig. 30B) após a esterificação, indicando que algum tipo de reação possa ter ocorrido em sua estrutura; com exceção dessas observações, toda a região sesquiterpênica e diterpênica dos óleos dessa espécie apresentaram rastros esbranquiçados, indicando possíveis oxidação ou degradação dos constituintes.

Quanto aos OCR's pequenas mudanças foram observadas na região mais polar do cromatograma, sugerindo que ao menos esterificações parciais possam ter ocorrido (Fig. 30A e 30B); quanto aos seus constituintes ácidos maioritários (Rf = 0,46), nenhuma modificação foi observada no seu Rf após a esterificação, indicando a ineficiência desta metodologia quanto a esses diterpenos; ainda nos óleos dessa espécie, observou-se uma alteração no Rf de um possível diterpeno, na região menos polar do cromatograma, de 0,46 para 0,56, sugerindo que alguma reação possa ter ocorrido; de forma similar aos OCM's, a composição sesquiterpênica dos OCR's parece ter sido afetada pela esterificação com HCl, já que algum tipo de modificação ocorreu com óxido de cariofileno (0,69) (Fig. 30A).

Nas figuras 30C e 30D são apresentadas as esterificações realizadas com H_2SO_4 . Surpreendentemente, essas esterificações parecem ter sido mais eficiente e ter causado menos danos aos óleos de copaíba que as esterificações realizadas com HCl. Pelos cromatogramas apresentados nas figuras 30C e 30D essas esterificações parecem ter apresentado melhor desempenho nos OCM's que nos OCR's. Um número maior de manchas foi observado na região ácida dos OCM's (0,06; 0,09; 0,31;0,40) e as manchas da região sesquiterpênica parecem não sofrer tanta influência, já que aquelas relacionadas ao β -cariofileno e ao seu óxido permaneceram com o mesmo Rf após a esterificação; embora haja indicativo de que algumas esterificações possam ter ocorrido parcialmente, como é o caso da mancha de Rf = 0,25. Por outro lado, poucas mudanças foram observadas no perfis dos OCR's; apenas 1 mancha na região mais polar do cromatograma foi observada (Rf = 0,19), sendo esta, o único indicativo de uma possível esterificação; quanto aos diterpenos majoritários (Rf = 0,42), nenhum indicativo de esterificação foi observado; de forma similar aos OCM's, pouca influência foi exercida sobre a composição sesquiterpênica. Apesar do melhor desempenho desta metodologia em relação a esterificação da esterificação anterior, ainda há indícios de que alguma degradação possa ter ocorrido, como é o caso do desaparecimento da mancha de Rf = 0,61 nos OCM's.

As duas metodologias de esterificação realizadas com BF_3 (BF_3/JAC e BF_3/MET) causaram efeitos diferentes nos óleos analisados (Fig. 30F a 30H). Tanto os OCM's quanto os OCR's parece ter apresentado melhor desempenho nas esterificações realizadas com BF_3/MET ; embora haja indicativos de que alguma esterificação possa ter ocorrido quando os óleos foram esterificados com BF_3/JAC . O aumento do número de manchas na região polar do cromatograma é o principal indicador da ocorrência de possíveis esterificações (Fig. 30G e 30H). Por outro lado, os sesquiterpenos apresentaram

características de oxidação, principalmente nos OCM's que são constituídos por muitos sesquiterpenos. Apesar dos benefícios desta metodologia, ela não foi suficiente para esterificar o alto teor diterpênico dos OCR's, porém, alguma esterificação parece ter ocorrido.

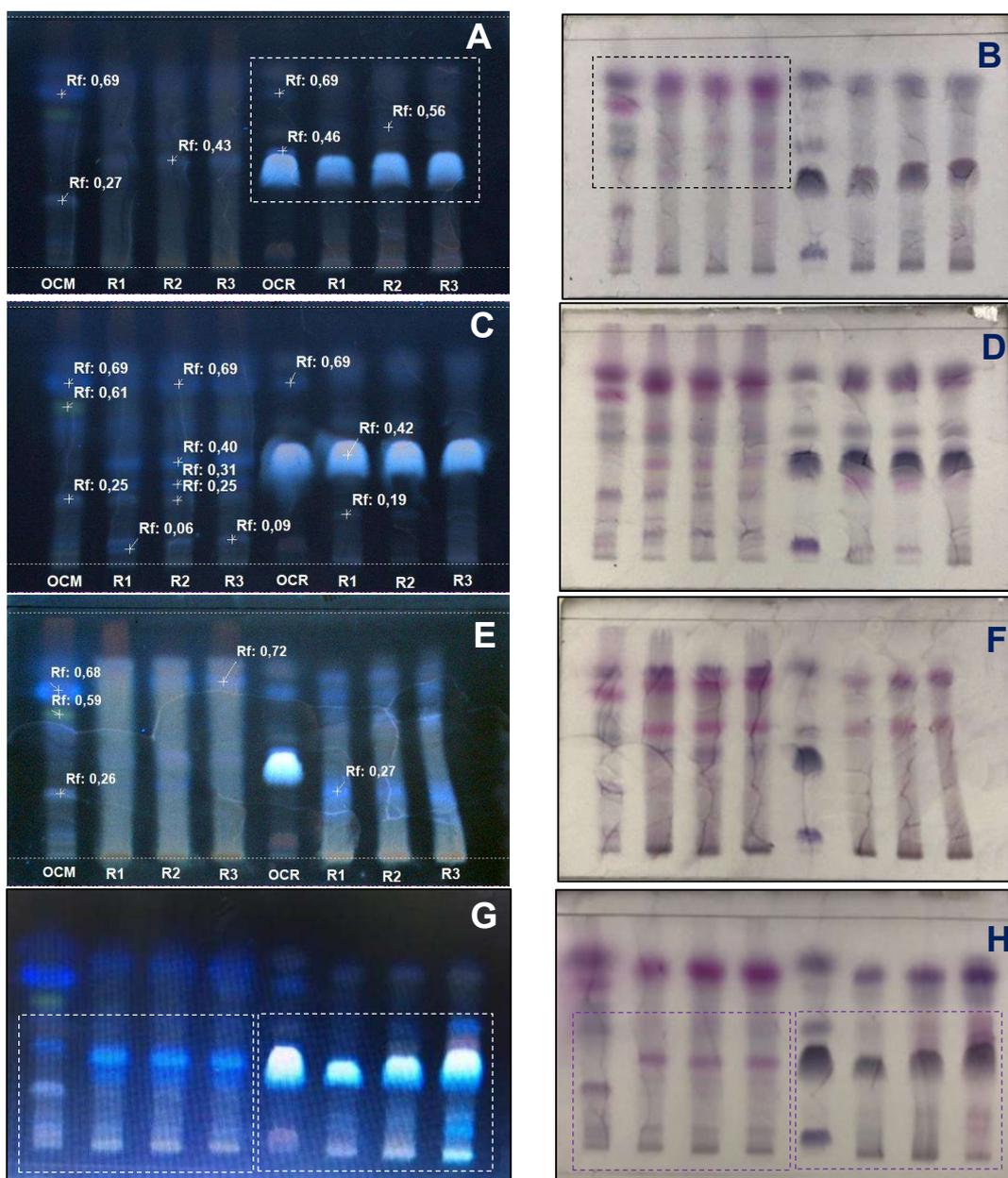


Figura 30. Cromatogramas dos óleos de copaíba esterificados (OCM e OCR) obtidos por CCDAE.

Legenda: esterificações com HCl (A e B); esterificações com H₂SO₄ (C e D); esterificações com BF₃/JAC (E e F); esterificações com BF₃/MET (G e H); detecção em etanol sulfúrico (A, C, E e G) e em vanilina sulfúrica (B, D, F e H).

Essas metodologias de esterificação, que utilizam catálise ácida com os ácidos clorídrico, sulfúrico e trifluoreto de boro são as mais relatadas na literatura. São metodologias que apresentam baixo custo e dispõem de reagentes acessíveis, viabilizando sua utilização na maioria dos laboratórios. No entanto, pelos perfis cromatográficos obtidos, todas as metodologias utilizadas (HCl, H₂SO₄ e BF₃) foram ineficazes na esterificação dos ácidos diterpênicos e comprometeram a composição autêntica dos óleos de copaíba, por meio de oxidação, degradação e talvez, até formação de artefatos.

5.4.3. Análises dos óleos esterificados por Cromatografia em fase gasosa hifenada a Espectrometria de Massas (GC-EM)

5.4.3.1. Esterificação dos óleos de copaíba (OCM e OCR) com Trimetilsilildiazometano (TMSD)

Os óleos de copaíba (OCM e OCR) derivatizados com TMSD foram analisados por CG-EM para confirmar a eficiência das esterificações e avaliar o efeito desta metodologia na composição química dos óleos. Os cromatogramas dos óleos de copaíba esterificados com TMSD são apresentados na figura 31. Diferentes perfis cromatográficos foram obtidos para os dois óleos analisados. O OCM mostrou uma composição predominante de sesquiterpenos (91,26%), tendo como principal constituinte o β -cariofileno, um hidrocarboneto sesquiterpênico responsável por 37,82% da sua composição química (Fig. 31A). O OCR apresentou uma composição sesquiterpênica minoritária (41,26%) em relação ao OCM. A maior parte da composição do OCR foi constituída por um número diversificado de diterpenos (48,19%), com predominância do ácido daniélico (26,94%), eluído em 37,03 minutos (Fig. 31B).

As esterificações realizadas com TMSD permitiram a identificação de 97,95% da composição química do OCM e 85,46% da composição do OCR. O β -cariofileno

(37,82%), α -copaeno (8,42%), α -humuleno (6,49%) e o copalato de metila (2,59%) foram os principais constituintes detectados no OCM. No OCR os principais constituintes detectados foram os sesquiterpenos trans- α -bergamoteno (13,69%), β -bisaboleno (11,39%) e os ésteres dos ácidos daniélico (26,94%), pinifólico (9,33%) e catívico (5,80%).

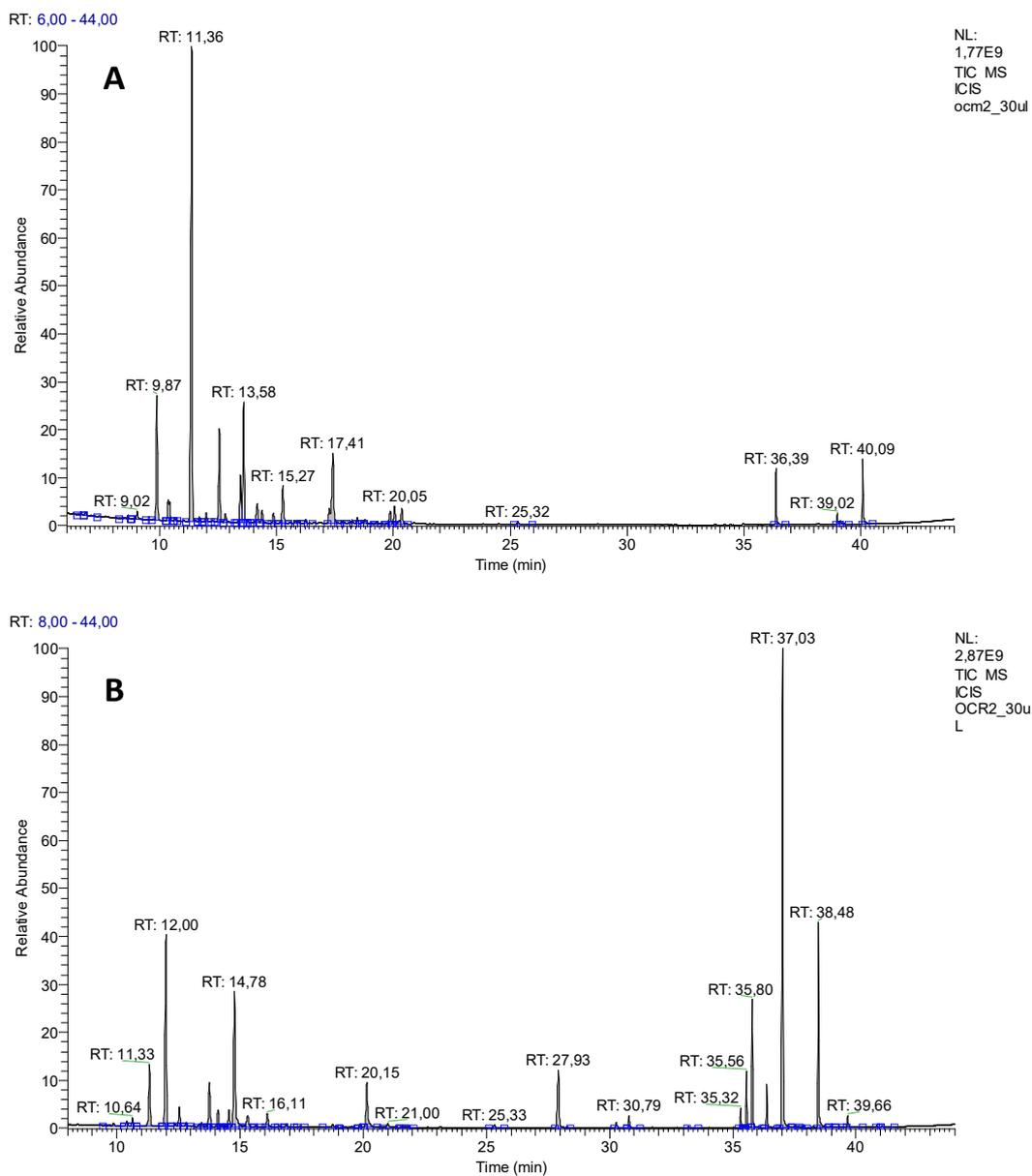


Figura 31. Cromatogramas obtidos por CG-EM dos OCM (A) e OCR (B) esterificados com TMSD.

Os perfis cromatográficos obtidos por CG-EM mostram uma composição química autêntica, isenta de oxidação e/ou degradação dos constituintes. As esterificações

realizadas com TMSD são reações *in situ* que envolvem apenas duas etapas: a pesagem da oleoresina e a adição do reagente de esterificação. São reações que permitem que a esterificação seja realizada na hora da análise cromatográfica, evitando processos oxidativos e/ou degradativos decorrentes da derivatização. A principal vantagem desta metodologia consiste no número reduzido de etapas, que diminui significativamente as perdas de massa, no tempo reacional (20 minutos) e na quantidade mínima de amostra (1,0 mg). O trimetilsilildiazometano (TMSD) é o substituto comercial do diazometano, porém, diferentemente do diazometano, não necessita de preparação, pois é um reagente disponível comercialmente pronto para uso.

5.4.3.2. Comparação das metodologias de esterificação dos óleos de *Copaifera multijuga* (OCM)

Os OCM's esterificados com HCl, H₂SO₄ e BF₃ (BF₃/JAC e BF₃/MET) foram analisados por CG-EM e comparados com as esterificações realizadas com TMSD. Os perfis cromatográficos da região sesquiterpênica dos OCM's analisados são apresentados nas figuras 32 e 33. Na figura 32 é apresentada uma comparação das esterificações realizadas com H₂SO₄ (Fig. 32B), HCl (Fig. 32C) e TMSD (Fig. 32A) e na figura 33, uma comparação das esterificações realizadas com BF₃ (Fig. 33B e Fig. 33C) e TMSD (Fig. 33A). As quatro metodologias utilizadas apresentaram perfis cromatográficos bem diferentes do esperado para um OCM autêntico. A esterificação realizada com H₂SO₄ foi a metodologia que mais se aproximou do perfil autêntico esperado. No entanto, ainda assim, um grande número de picos não identificados foi detectado na região de eluição dos sesquiterpenos oxigenados (16 a 22 minutos).

A maior parte da composição química desse óleo de *C. multijuga* é constituída por sesquiterpenos, e por essa razão, eles foram fortemente afetados durante as esterificações; cerca de 78,0% da sua composição química é relacionada aos hidrocarbonetos

sesquiterpênicos e apenas 14,0% são relacionados aos sesquiterpenos oxigenados. Após as esterificações com HCl, H₂SO₄ e BF₃ houve um decréscimo no número de picos na região de eluição dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos e um aumento acentuado de picos na região de eluição dos sesquiterpenos oxigenados, indicando possíveis oxidação e degradação dos sesquiterpenos. Essas observações estão em consonância com o baixo percentual dos constituintes identificados em cada metodologia, em virtude de sua complexidade.

A esterificação realizada na presença do H₂SO₄ permitiu a identificação de 43,23% da composição química do OCM, que correspondeu a 23 constituintes terpênicos, dos quais, 22 foram sesquiterpenos e 01 diterpeno ácido. A esterificação realizada com HCl permitiu a identificação de 08 sesquiterpenos e nenhum diterpeno. As duas metodologias realizadas com BF₃ apresentaram resultados distintos entre si. Enquanto a esterificação realizada com BF₃/MET permitiu a identificação de 06 sesquiterpenos e 02 diterpenos ácidos, a esterificação realizada com BF₃/JAC permitiu a identificação de apenas de 01 constituinte, um sesquiterpeno oxigenado.

Além do aumento do número de picos na região de eluição dos sesquiterpenos oxigenados, outras características também sustentam a ideia da oxidação e da degradação dos constituintes. O β-cariofileno (tr = 11,36 minutos) é o constituinte maioritário dos OCM's, e ele só foi detectado nas esterificações realizadas com H₂SO₄ e ainda, numa concentração bem inferior ao esperado, com uma redução de 23,0% em relação a esterificação com TMSD; nas esterificações realizadas com HCl e BF₃ nenhum resquício desse sesquiterpeno foi observado, evidenciando a total degradação desse sesquiterpeno.

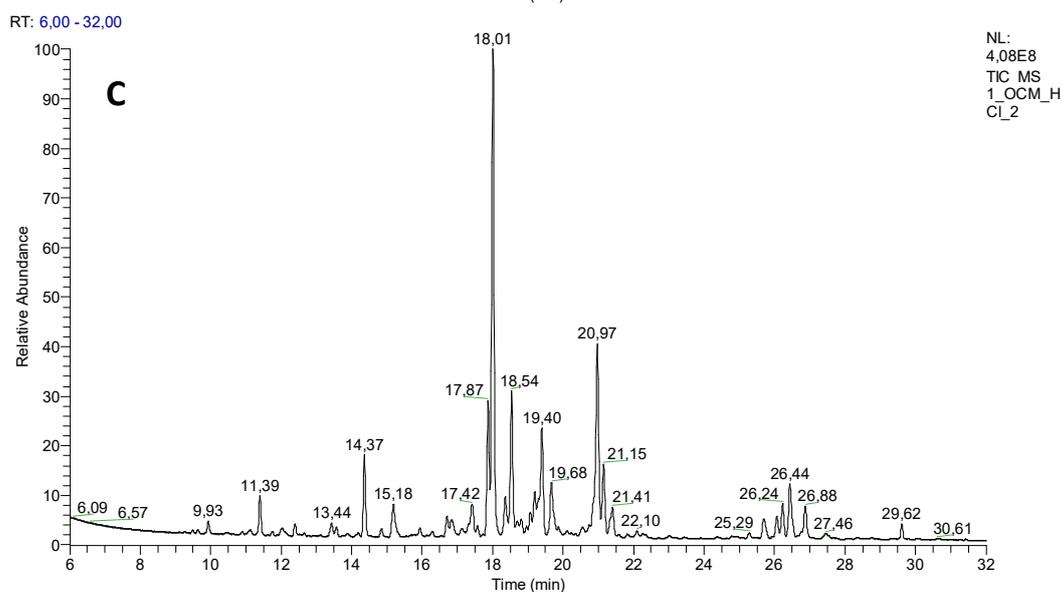
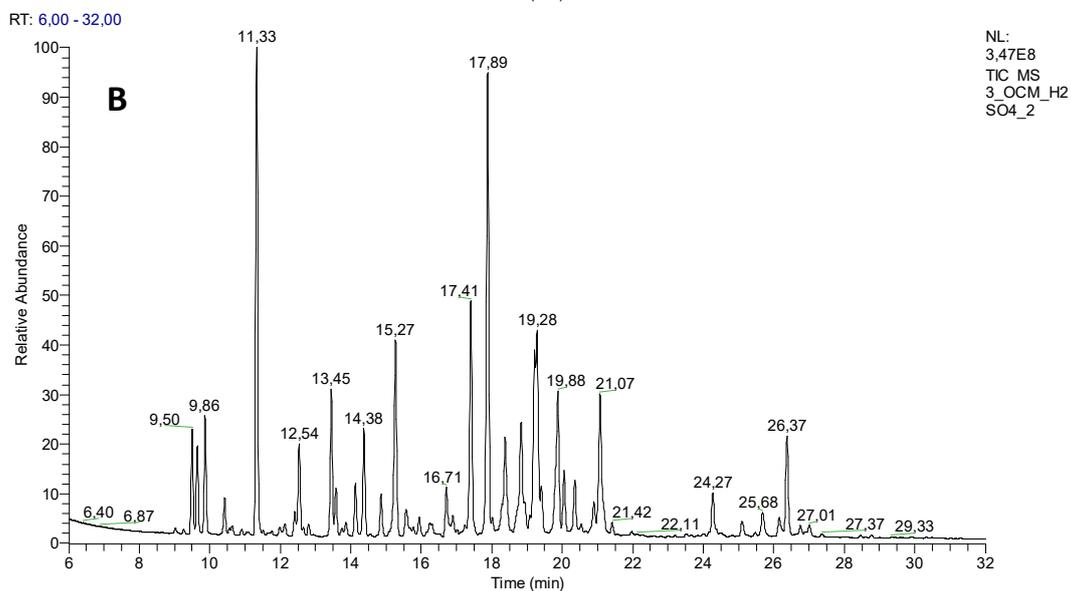
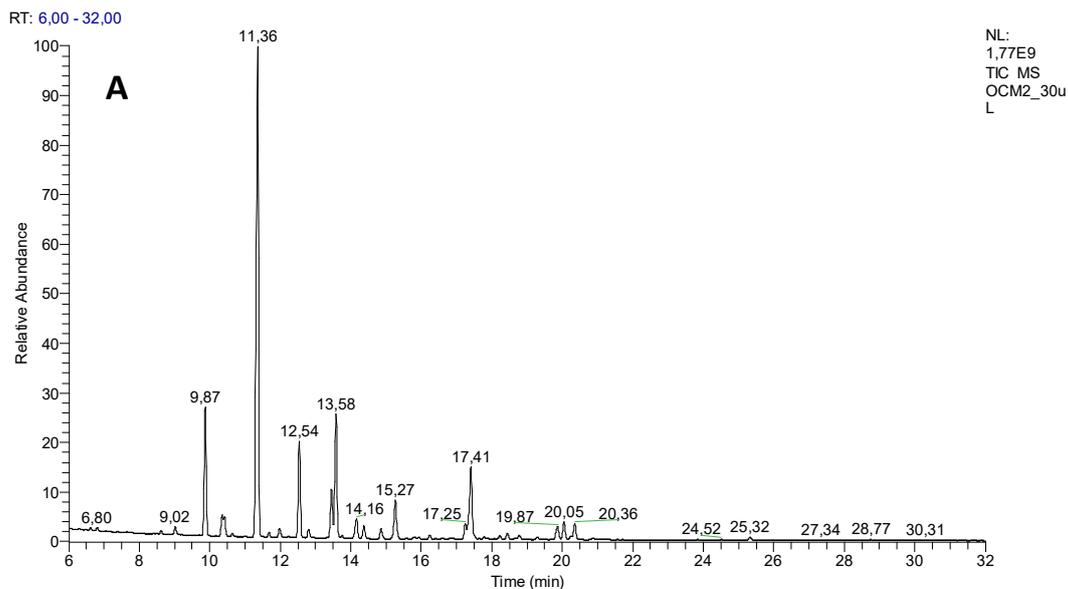


Figura 32. Cromatogramas obtidos por CG-EM (região sesquiterpênica) dos OCM's esterificados com TMSD (A), H₂SO₄ (B) e HCl (C).

Apesar de não ter sido observado nenhum aumento no teor do óxido de cariofileno, outros indicativos, como o aumento no teor do cariofilenol nas esterificações realizadas com BF_3 e a presença do 4,8- β -epóxido-cariofilano na esterificação com HCl reforçam a ideia da provável oxidação do β -cariofileno e possivelmente de outros sesquiterpenos também. Houve um aumento no teor do cariofilenol de 0,19% na esterificação com TMSD para 1,79% na esterificação com BF_3/MET e para 10,09% na esterificação com BF_3/JAC e cerca de 1,68% da composição do OCM foi constituída pelo 4,8- β -epóxido-cariofilano, um sesquiterpeno oxigenado que não faz parte da composição autêntica dos OCM's.

Além das características observadas na região sesquiterpênica dos OCM's, as metodologias utilizadas mostraram-se ineficientes quanto a esterificação dos ácidos diterpênicos (Fig. 34). A esterificação realizada com TMSD permitiu a identificação de 5 ácidos diterpênicos, enquanto que as metodologias realizadas com BF_3/MET e H_2SO_4 possibilitaram a identificação de 2 e 1 diterpenos, respectivamente. Embora, essas metodologias tenham possibilitado a identificação desses diterpenos, eles foram detectados em concentrações inferiores ao observado na esterificação com TMSD. O copalato de metila ($\text{tr} = 36,39$), identificado tanto na esterificação com H_2SO_4 (Fig. 34B) quanto na esterificação com BF_3/MET (Fig. 34D), apresentou uma redução de 2,59% para 0,15% e 1,86% respectivamente.

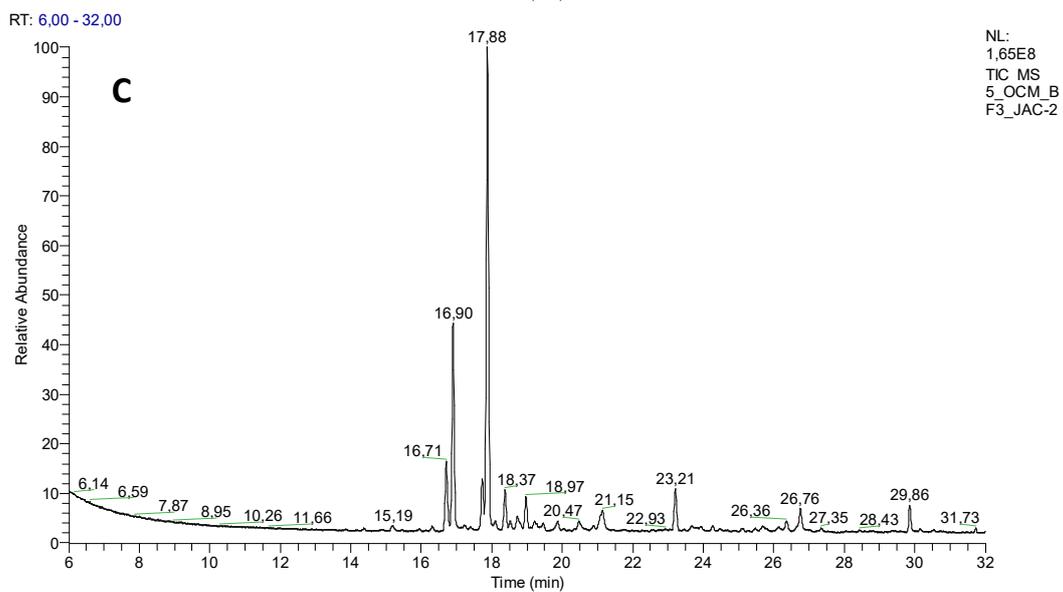
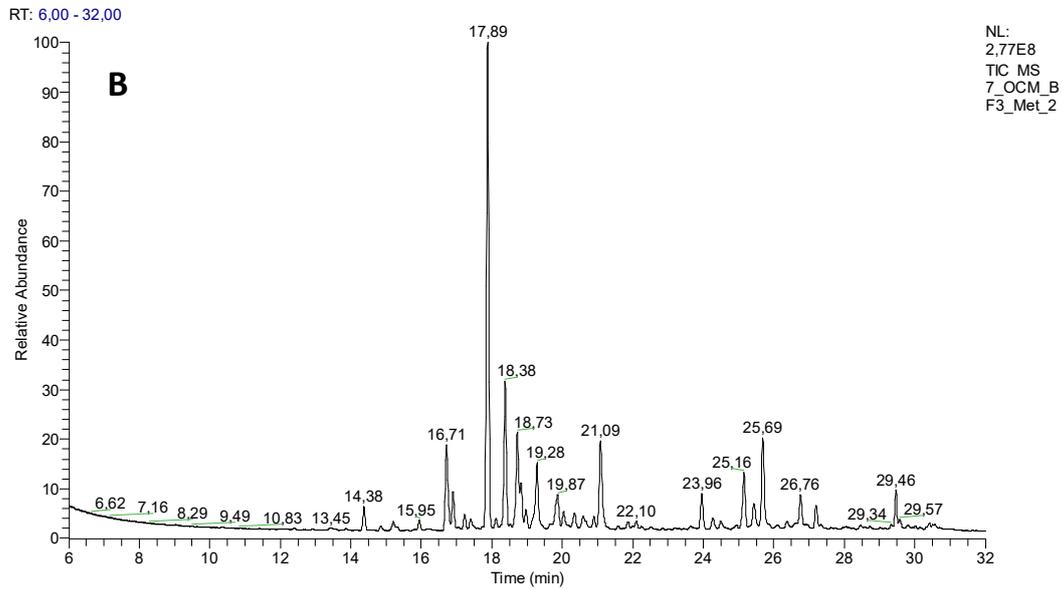
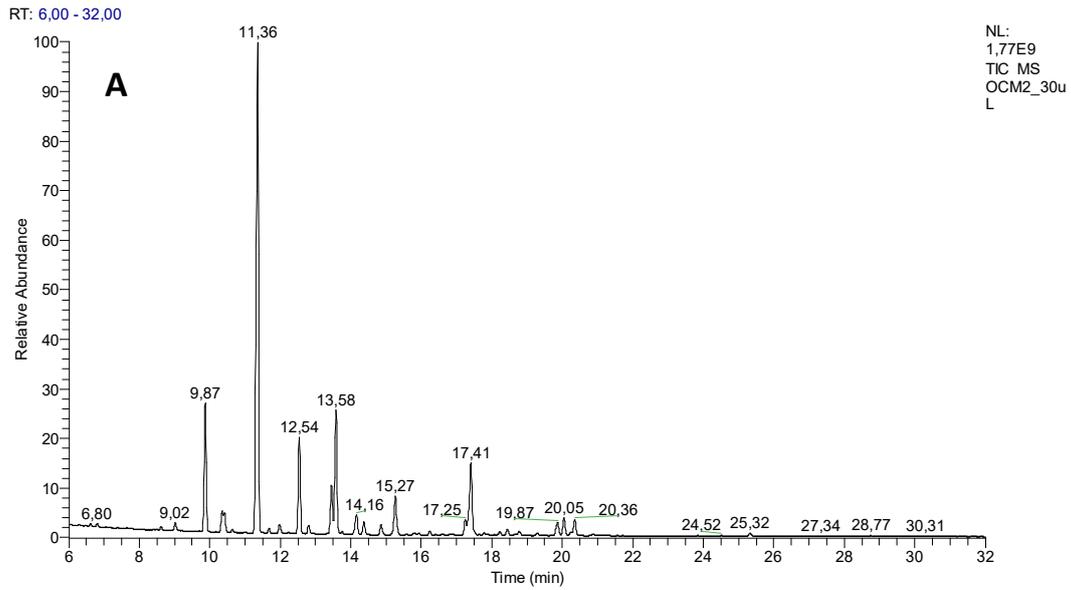


Figura 33. Cromatogramas obtidos por CG-EM (região sesquiterpênica) dos OCM's esterificados com TMSD (A), BF₃/MET (B) e BF₃/JAC (C).

Nas condições realizadas, as demais metodologias (HCl e BF₃/JAC) mostraram-se inadequadas para a esterificação dos diterpenos dos OCM's, visto que a formação de nenhum éster foi observada. No entanto, várias características de esterificações parciais foram observadas na metodologia realizada com BF₃/JAC. O espectro de massas (EM) do pico eluído em 36, 41 minutos apresentou alguns fragmentos (*m/z* 81, *m/z* 95, *m/z* 137 e *m/z* 303) do copalato de metila (tr = 36,39), principal diterpeno dos OCM's, sugerindo a possível esterificação parcial desse diterpeno. Comportamento similar foi observado para os EM dos picos eluídos em 38,54 minutos (*m/z* 135, *m/z* 207), 39,29 minutos (*m/z* 121) e 39,45 minutos (*m/z* 114, *m/z* 135 e *m/z* 147) que apresentaram alguns fragmentos dos ésteres dos ácidos pinifólico (tr = 38,21), agático e 11-OH-copálico respectivamente.

RT: 35,00 - 42,00

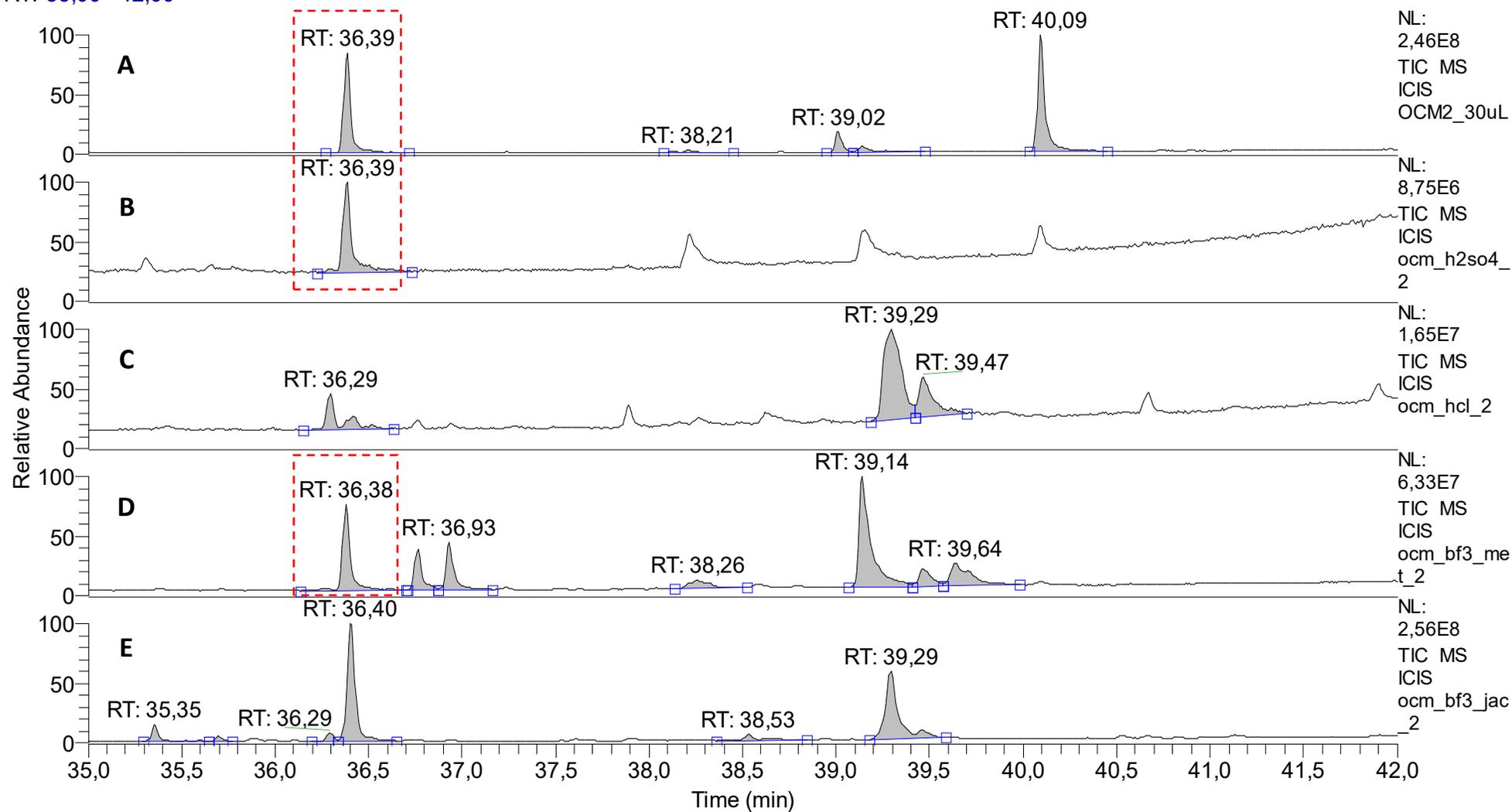


Figura 34. Cromatogramas obtidos por CG-EM (região diterpênica) dos OCM's esterificados com TMSD (A), H₂SO₄ (B), HCl (C), BF₃/MET (D) e BF₃/JAC (E).

5.4.3.3. Comparação das metodologias de esterificação dos óleos de *Copaifera reticulata* (OCR)

Os perfis cromatográficos obtidos para os OCR's também mostraram a influência das diferentes metodologias de esterificação na composição química dos óleos de copaíba. Nas figuras 35 e 36 são apresentados os cromatogramas das esterificações dos OCR's, realizadas com as 4 metodologias (HCl, H₂SO₄ e BF₃ [BF₃/JAC e BF₃/MET]) e também com TMSD, para fins comparativos. Os cromatogramas obtidos também mostraram perfis cromatográficos bem diferentes do esperado para óleos de copaíba autênticos; algumas metodologias, como a esterificação realizada com HCl (Fig. 35C) e com BF₃/MET (Fig. 36C) apresentaram um grande número de picos por toda a região do cromatograma; no outro extremo, a esterificação realizada com BF₃/JAC (Fig. 36B), quase não apresentou picos na região inicial, que corresponde a eluição dos sesquiterpenos (8 e 24 minutos), descaracterizando totalmente o perfil esperado. Contudo, a metodologia que mais se aproximou do perfil autêntico esperado para os óleos de copaíba, foi a esterificação realizada com H₂SO₄ (Fig. 35B).

Embora os 2 óleos de copaíba analisados (OCM e OCR) tenham composição química diferente, por se tratarem de espécies distintas, o efeito das metodologias de esterificação foi similar em ambos os óleos e possivelmente causaram oxidação e degradação de alguns constituintes também. Ainda que o teor sesquiterpênico dos OCR's seja inferior ao observado para os OCM's, é evidente a influência das metodologias de esterificação na composição sesquiterpênica. O aumento do número de picos na região de eluição dos sesquiterpenos oxigenados (16-24 minutos) e também na região intermediária dos cromatogramas (24 e 34 minutos) mostrou características de possíveis degradações dos sesquiterpenos, principalmente nas esterificações realizadas com HCl (Fig. 35C) e BF₃/MET (Fig. 36C).

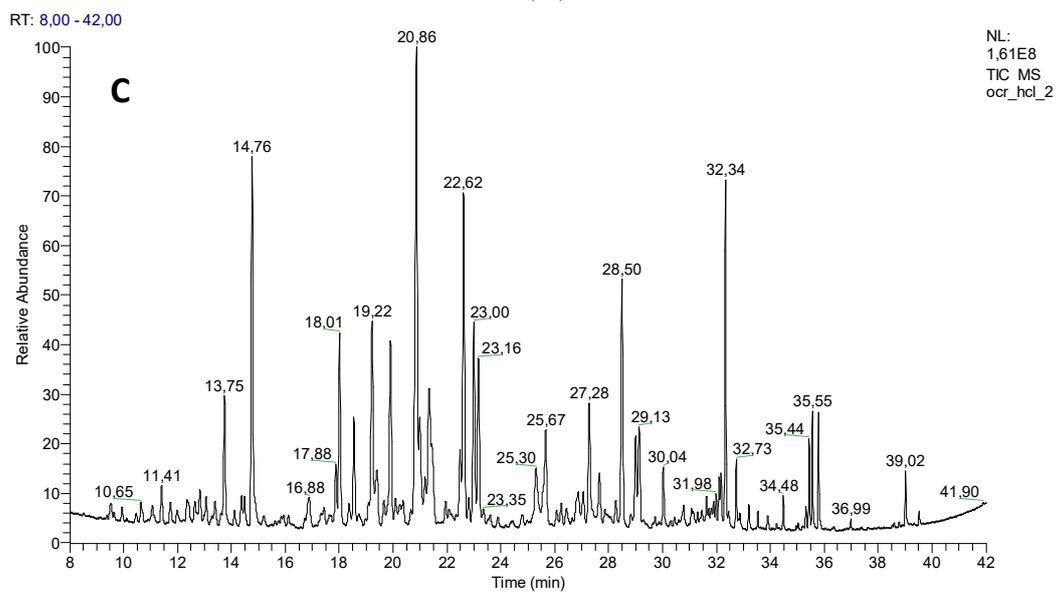
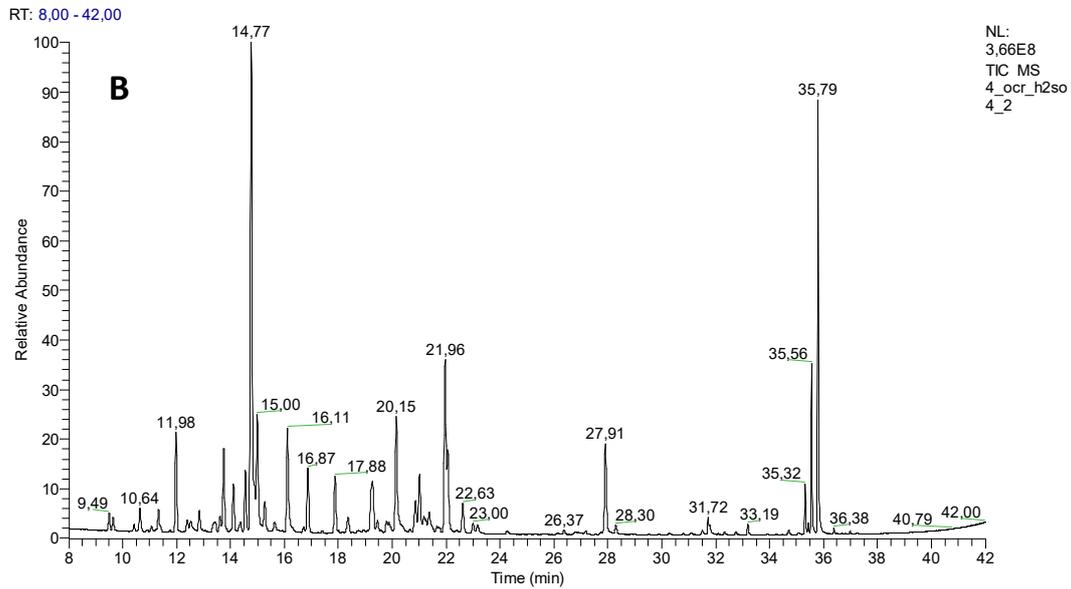
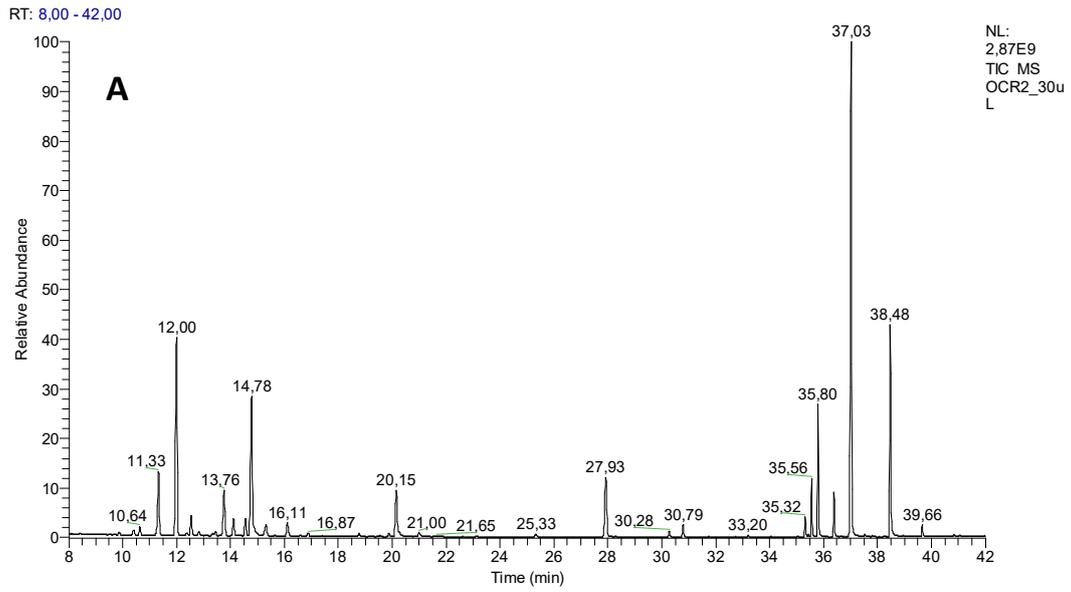


Figura 35. Cromatogramas obtidos por CG-EM dos OCR esterificados com TMSD (A), H₂SO₄ (B) e HCl (C).

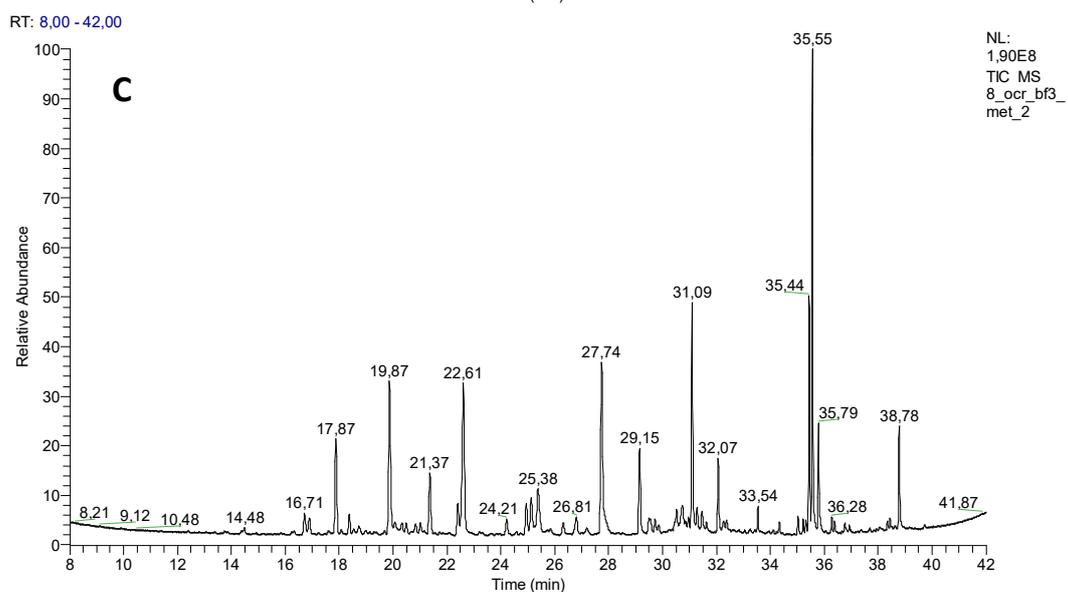
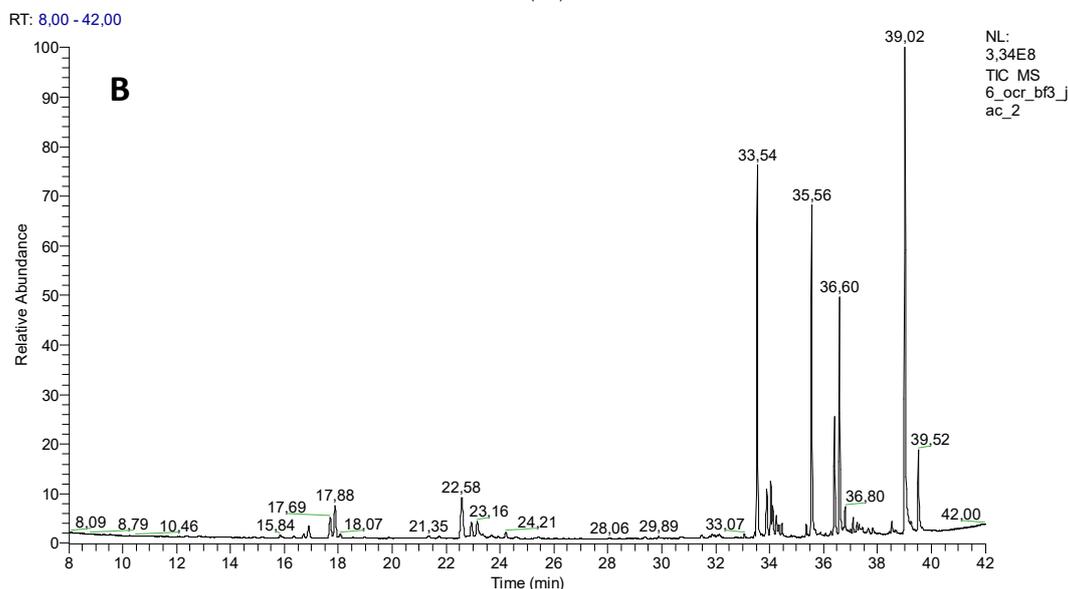
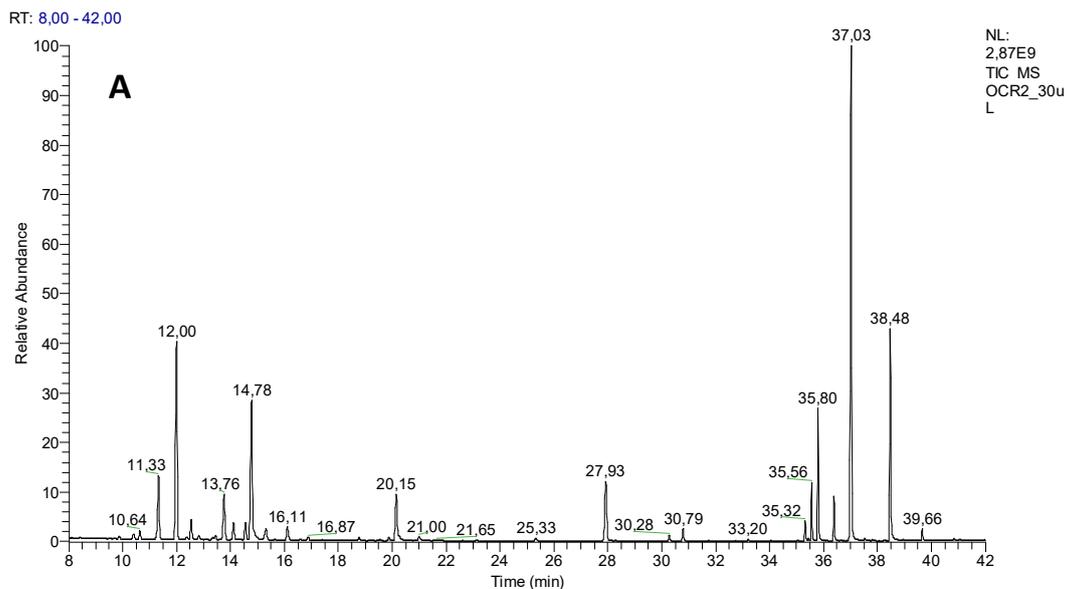


Figura 36. Cromatogramas obtidos por CG-EM dos OCR esterificados com TMSD (A), BF₃/MET (B) e BF₃/JAC (C).

Os sesquiterpenos dos OCR's também foram afetados com a utilização dessas metodologias. O trans- α -bergamoteno (tr = 12,0) e o β -bisaboleno (tr = 14,78), que são os sesquiterpenos maioritários do óleo, foram detectados somente na esterificação com H₂SO₄. Contudo, uma quantidade reduzida do β -bisaboleno foi detectada na esterificação com HCl. No entanto, nenhum resquício desses sesquiterpenos foi detectado nas esterificações com BF₃, reforçando a ideia da ocorrência de possíveis degradação ou oxidação dos sesquiterpenos. Apesar da esterificação com HCl apresentar um grande número de picos na região sesquiterpênica, as esterificações realizadas com BF₃/JAC foram mais agressivas aos sesquiterpenos, no sentido de que nenhum sesquiterpeno foi identificado nesta metodologia, alterando completamente o perfil cromatográfico esperado para os óleos de copaíba.

O número dos constituintes identificados foi inferior ao esperado. Enquanto a esterificação com TMSD permitiu a identificação de 29 constituintes (89,46%), as esterificações realizadas com H₂SO₄, HCl e BF₃ (BF₃/JAC e BF₃/MET) permitiram a identificação de apenas 20 (53,81%), 6 (11,84), 1 (14,63%) e 5 (24,69%) constituintes respectivamente. O maior número de identificações foi obtido na esterificação realizada com H₂SO₄, onde foram identificados 15 sesquiterpenos e 5 diterpenos; essa metodologia mostrou maior proximidade com o perfil e com a composição esperada para o OCR. O número de identificações mostra o comprometimento mínimo da integridade dos constituintes do óleo, ao contrário das demais metodologias utilizadas. Por outro lado, os 5 únicos constituintes identificados na esterificação com BF₃/MET foram diterpenos.

O número de ésteres formado também foi abaixo do esperado; enquanto a esterificação com TMSD permitiu a formação de 10 ésteres, as esterificações com H₂SO₄, HCl e BF₃ (BF₃/JAC e BF₃/MET) permitiram a identificação de apenas 5, 3, 1 e 5 ésteres diterpênicos, respectivamente. O grande número de picos observados no cromatograma

dessas metodologias e o baixo quantitativo dos ésteres formados, mostram a ineficiência dessas metodologias quanto a esterificação dos ácidos diterpênicos e principalmente quanto ao comprometimento da integridade da composição dos óleos de copaíba. O éster metílico do ácido daniélico ($t_r = 37,03$ minutos) foi o diterpeno maioritário na esterificação com TMSD, representando 26,94% de toda a composição do óleo; todavia, nenhuma das metodologias utilizadas (H_2SO_4 , HCl e BF_3 (BF_3/JAC e BF_3/MET)), foi suficiente para formar este éster. De forma análoga, o eperuato de metila ($t_r = 35,32$ minutos), outro éster diterpênico, foi identificado apenas nas esterificações realizadas com H_2SO_4 e com BF_3/MET ; embora nesta última metodologia tenham sido observadas características de esterificações parciais; o perfil espectrométrico obtido para esse diterpeno foi idêntico nas duas metodologias (Anexos 18 e 19), indicando a formação do eperuato de metila, no entanto, em quantidade inferior ao observado na esterificação com TMSD (Fig. 37).

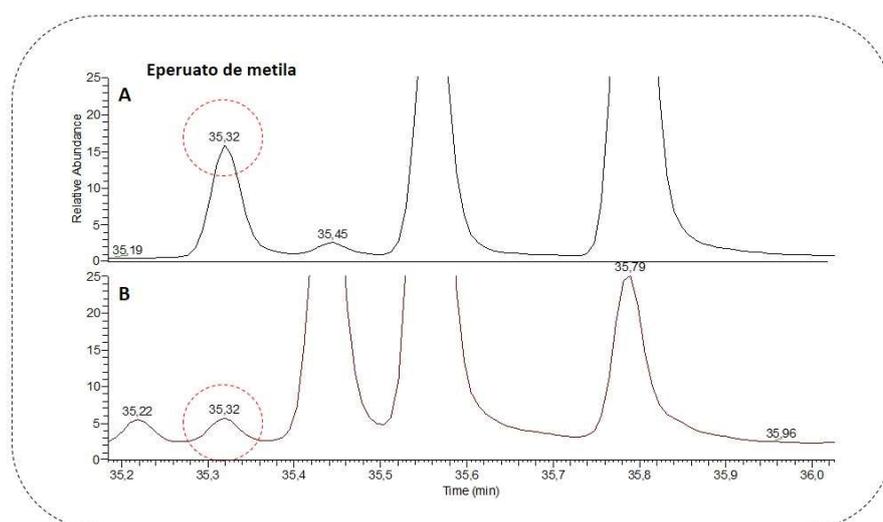


Figura 37. Cromatogramas expandidos da região de eluição dos diterpenos.
Legenda: **A** = Esterificação com TMSD; **B** = Esterificação com BF_3/MET .

Além da ocorrência de possíveis esterificações parciais, o grande número de picos não identificados e que não pertencem a composição autêntica do óleo, indicam a possível

formação de artefatos ou até mesmo subprodutos das reações de esterificação. A esterificação realizada com BF_3/JAC mostrou o pior desempenho no OCR; além de afetar drasticamente a composição sesquiterpênica, a maior parte dos picos detectados na região de eluição dos diterpenos, apresentou indicativos da formação de artefatos e subprodutos reacionais. Um número repetitivo de picos apresentou perfis espectrométricos semelhantes, sustentando principalmente a ideia da formação de artefatos; os picos eluídos em 33,54, 33,90 e 34,04 minutos apresentaram o mesmo perfil de fragmentação com a intensa presença do íon m/z 191; esses três picos juntos representam 24,64% de toda composição do OCR, sendo o pico de $t_r = 33,54$ responsável por 18,57%. De forma análoga, os picos eluídos em 34,25, 34,34 e 34,45 minutos também apresentaram os mesmos perfis de fragmentação, sendo os íons m/z 80,09, m/z 136,12 e m/z 191,16 os mais abundantes; e ainda aqueles eluídos em 36,60, 36,80 e 37,10 minutos apresentaram exatamente os mesmos perfis de fragmentação (m/z 175,15 e m/z 235,15), representando 11,84% da composição do OCR. Ainda que haja um grande número de picos na região de eluição dos diterpenos (33 a 42 minutos), apenas o éster metílico do ácido labdan-15-oico ($t_r = 35,56$ minutos) foi identificado, representando 14,63% da composição do óleo; todos os demais picos apresentaram indicativos de degradação ou formação de artefatos.

5.4.3.4. Reprodutibilidade das metodologias de esterificação

Todas as metodologias foram realizadas em triplicata para avaliar a (i) eficiência das esterificações, a (ii) influência dessas metodologias na composição química dos óleos de copaíba e para avaliar sua (iii) reprodutibilidade. Todos os óleos esterificados e suas respectivas réplicas foram analisados por GC-EM e seus cromatogramas com as principais diferenças são apresentadas nas figuras 38 a 41. Todas as metodologias apresentaram diferenças qualitativas e quantitativas entre suas réplicas, algumas, na região sesquiterpênica e outras na região diterpênica dos óleos de copaíba. Os perfis

cromatográficos obtidos para os OCM's esterificados com H₂SO₄ mostram diferenças qualitativas relevantes na região sesquiterpênica (Fig. 38). A presença do pico eluído em 17,40 minutos nas réplicas 2 (Fig. 38B) e 3 (Fig. 38C), consiste na principal diferença entre as réplicas e mostra a possível influência das diversas etapas envolvidas nas reações.

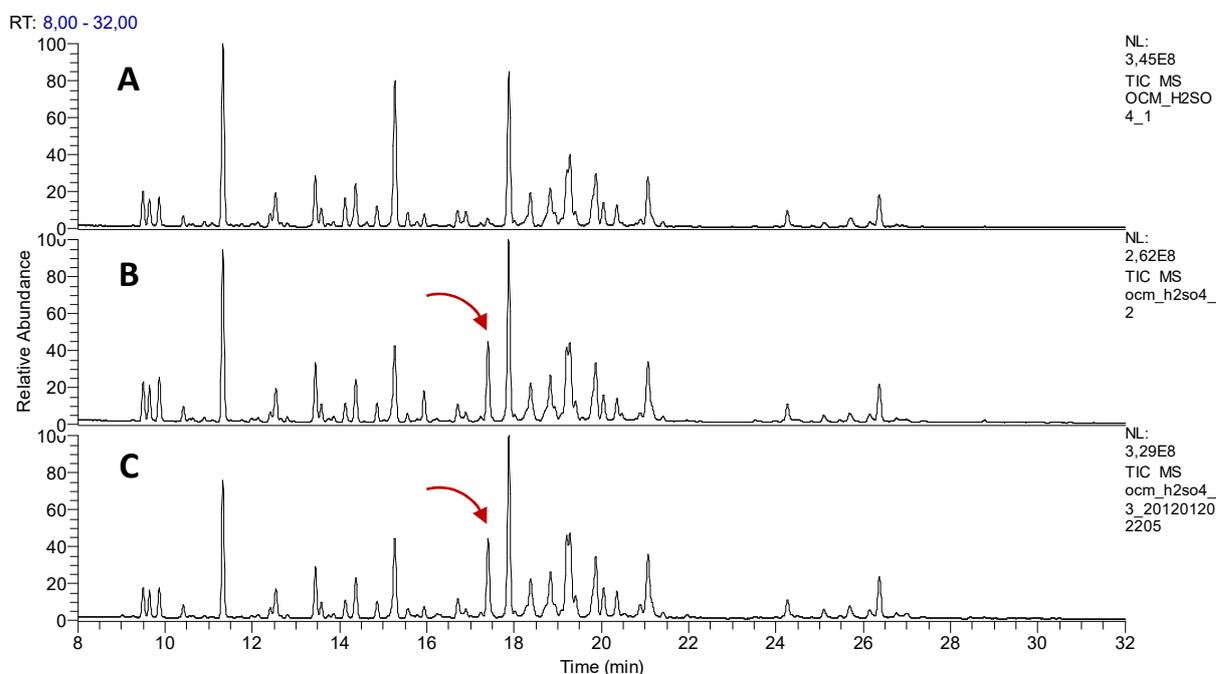


Figura 38. Cromatogramas obtidos por GC-EM dos OCM's esterificados com H₂SO₄ (Expansão da região sesquiterpênica).

Legenda: A = Réplica 1; B = Réplica 2; C = Réplica 3.

As esterificações realizadas com BF₃/MET também apresentaram diferenças entre suas réplicas. Ao contrário do observado na metodologia anterior (H₂SO₄), as variações qualitativas foram constatadas na região diterpênica dos óleos de copaíba (Fig. 39). As principais diferenças foram observadas na primeira réplica (Fig. 39A) e consiste na presença exclusiva dos picos eluídos em 38,27, 39,47 e 39,64 minutos e na ausência do pico eluído em 39,15 minutos (Fig. 39B e 39C). O aumento acentuado na concentração relativa dos constituintes eluídos em 36,76 e 36,93 minutos, assim como a redução na concentração relativa do pico eluído em 36,38 minutos (Fig. 39B), também estão entre as principais características observadas para esta réplica.

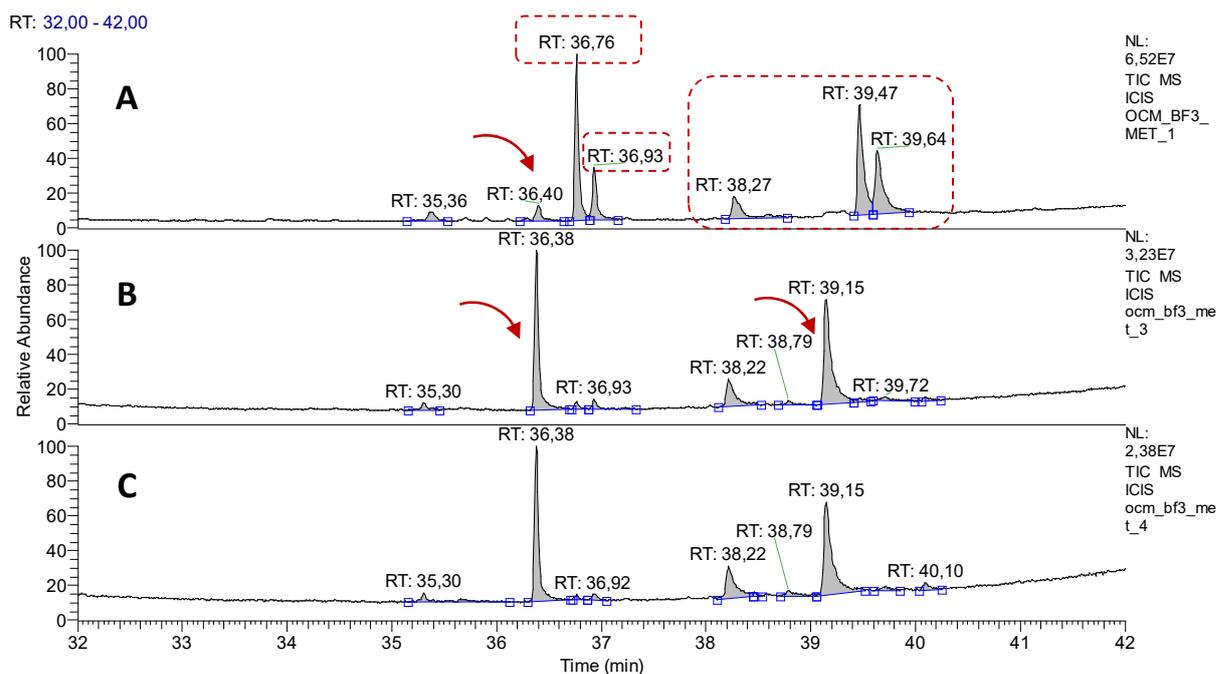


Figura 39. Cromatogramas obtidos por GC-EM dos OCM's esterificados com BF₃/MET (Expansão da região diterpênica).

Legenda: **A** = Réplica 1; **B** = Réplica 2; **C** = Réplica 3.

Pequenas diferenças qualitativas também foram observadas nas metodologias realizadas na presença de HCl e de BF₃/JAC. Nas esterificações realizadas com HCl a principal diferença foi observada na região diterpênica dos OCM's e consiste na presença dos picos eluídos em 34,43, 37,89, 40,67 e 41,90 minutos (Fig. 40). Por outro lado, as esterificações realizadas com BF₃/JAC mostraram pequenas diferenças na região sesquiterpênica dos OCM's.

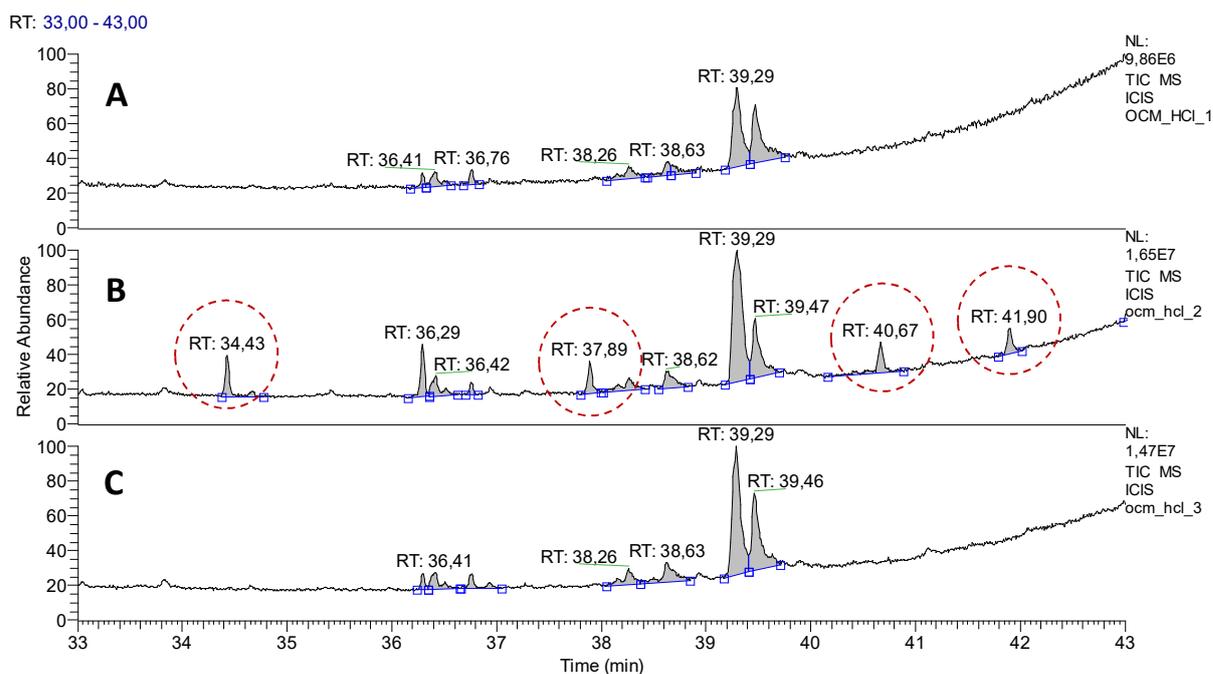


Figura 40. Cromatogramas obtidos por GC-EM dos OCM's esterificados com HCl (Expansão da região diterpênica).

Legenda: **A** = Réplica 1; **B** = Réplica 2; **C** = Réplica 3.

Para os OCR apenas a esterificação realizada com BF_3/MET apresentou diferenças qualitativas entre suas réplicas. As principais diferenças foram observadas na região de eluição entre 20 e 22 minutos e entre 25 e 29 minutos (Fig. 41). Todas as metodologias utilizadas para a esterificação dos óleos de copaíba (HCl , H_2SO_4 , BF_3) apresentaram variações qualitativas relevantes entre suas réplicas. As diferenças qualitativas relatadas, reforçam a ideia de que apesar dessas metodologias apresentarem materiais e reagentes acessíveis, elas dispõem de muitas etapas que podem comprometer a reprodutibilidade do experimento, devido ao aumento pronunciado de erros sistemáticos, assim como a autenticidade dos resultados.

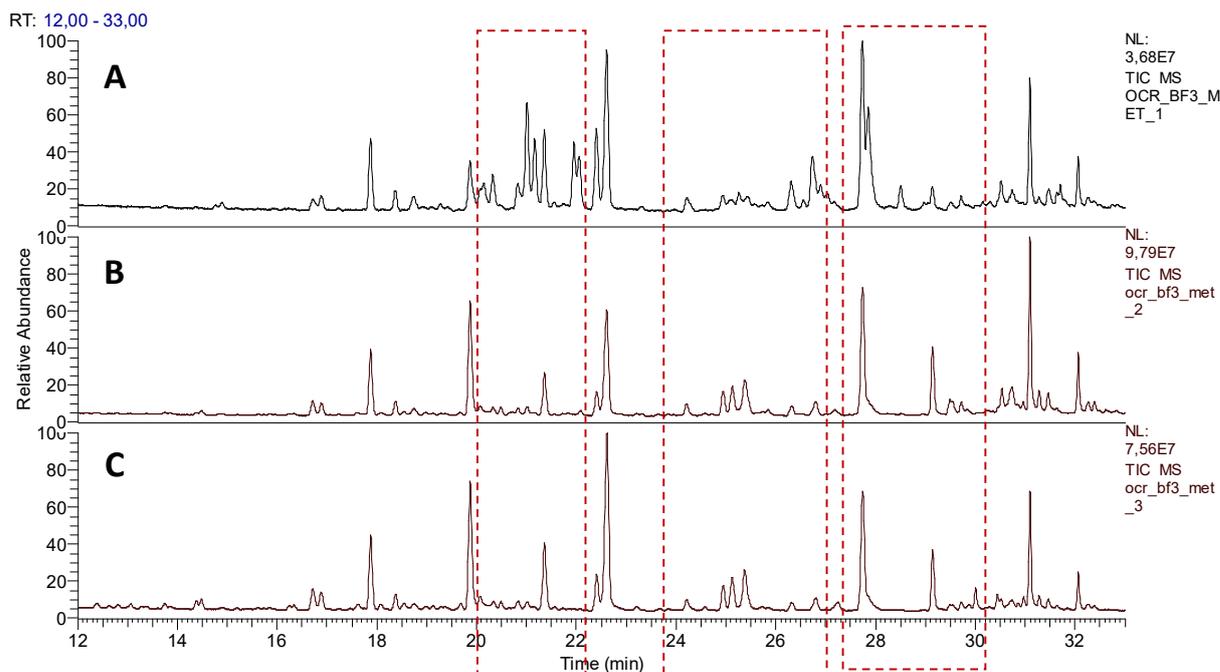


Figura 41. Cromatogramas obtidos por GC-EM dos OCR's esterificados com BF₃/MET (Expansão da região sesquiterpênica).

Legenda: **A** = Réplica 1; **B** = Réplica 2; **C** = Réplica 3.

As diferentes metodologias utilizadas mostraram as principais vantagens da esterificação dos óleos de copaíba com TMSD. Todas as metodologias (H₂SO₄, HCl e BF₃) utilizadas apresentaram algum tipo de influência nos óleos de copaíba, seja no rendimento das reações, na integridade dos constituintes ou na esterificação fidedigna dos ácidos diterpênicos. Apesar dos dois óleos analisados pertencerem a espécies distintas do gênero *Copaifera* (OCM e OCR), os efeitos observados foram similares em ambos os óleos.

Os rendimentos mais altos e as menores degradações dos constituintes terpênicos foram observados nas esterificações realizadas com H₂SO₄. O maior número de ésteres formado foi observado nas esterificações realizadas com BF₃/MET, que permitiu a identificação de 2 e 5 ésteres diterpênicos nos OCM e OCR, respectivamente; apesar da detecção desses ésteres diterpênicos, eles foram formados numa quantidade abaixo do esperado para óleos autênticos. Porém, é importante lembrar que apesar dessa metodologia proporcionar o maior número de ésteres diterpênicos, ela comprometeu

drasticamente a composição sesquiterpênica dos óleos analisados. A esterificação com H_2SO_4 também possibilitou a identificação de 5 ésteres diterpênicos no OCR, porém, sem comprometer tanto a composição sesquiterpênica, já que esta metodologia, foi a que mais se aproximou do perfil autêntico dos óleos de copaíba.

Os maiores entraves das metodologias de esterificação consistem no número de etapas envolvidas, na massa da amostra utilizada, na utilização de fortes agentes oxidantes e nas altas temperaturas. Todos esses fatores influenciam diretamente na integridade dos constituintes terpênicos dos óleos de copaíba e na reprodutibilidade das metodologias. As esterificações realizadas com trimetilsilildiazometano são reações simples e rápidas, que necessitam de pequenas quantidades da amostra (1,0 mg). Não geram artefatos e nem a degradação dos terpenoides de copaíba e a perda de massa envolvida no processo é mínima, decorrente apenas da pesagem da amostra.

6. Considerações Finais

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de metodologias simples e de baixo custo tem sido uma das principais necessidades dos óleos de copaíba, tendo em vista suas aplicações, que variam desde seu consumo *in natura* até formulações farmacêuticas e cosméticas. Os resultados obtidos nesta tese por CG-EM comprovaram a autenticidade dos óleos de *C. multijuga* (OCM's) e mostraram que os óleos dessa espécie apresentam grandes variações qualitativas e quantitativas na composição química de seus constituintes. O β -cariofileno foi o principal terpenoide dos OCM's e sua concentração variou de $0,317 \text{ mg.mL}^{-1}$ a $0,886 \text{ mg.mL}^{-1}$; o óxido de cariofileno, bastante relatado nas análises qualitativas e semi-quantitativas dos óleos de copaíba, também variou de $0,004 \text{ mg.mL}^{-1}$ a $0,272 \text{ mg.mL}^{-1}$. O método proposto por CG-EM mostrou-se adequado para análises dos OCM's e para a quantificação do β -cariofileno e do seu óxido.

O desenvolvimento do Fator de Retenção Relativo (Rfr) por meio da CCDAE foi uma excelente estratégia para caracterização química dos OCM's. A principal vantagem desta metodologia consistiu na rápida identificação dos principais marcadores químicos, de modo especial os diterpenos, que só podem ser obtidos através do seu isolamento e só podem ser detectados por CG por meio da sua esterificação. O método proposto foi desenvolvido em condições que favoreçam a identificação dos constituintes terpênicos, mesmo quando houver baixa disponibilidade do padrão de referência (óxido de linalol). O Rfr também surgiu como alternativa para amenizar influências ambientais, como a umidade relativa do ar, que afeta diretamente o Rf dos constituintes; nesse sentido, mesmo que haja variações no Rf da substância, o Rfr obtido será proporcional a essas variações. O método proposto por meio da CCDAE é confiável e reproduzível, e apresentou coeficientes de variação inferiores a 2,0% para cada marcador químico analisado e uma boa relação log linear. Não obstante, o método proposto aos OCM's pode ser estendido a

outras oleoresinas do gênero *Copaifera*, para caracterização de alguns de seus principais marcadores químicos.

A CCDAE também mostrou-se adequada na detecção de adulterantes nos OCM's, mesmo com as variações na sua composição química. As adulterações com óleos vegetais (soja e milho) foram detectadas com maior facilidade, devido às características de suas manchas e à sua maior sensibilidade na CCDAE. As adulterações com óleos vegetais foram detectadas a partir de 2,3% e as adulterações com óleo diesel, a partir de 23,0%. Embora, a complexa composição química de alguns OCM's tenha dificultado a detecção das adulterações com óleo diesel, as adulterações com óleo de soja foram todas detectadas satisfatoriamente. A CCDAE mostrou-se adequada para detecção desses adulterantes; mesmo nos OCM's de composição química mais complexa, a detecção dessas adulterações foi 3 vezes mais sensível que aquelas relatadas para a CCD; e nos OCM's de composição mais simples, a detecção foi 10 vezes mais sensível. As análises em CCDAE-EM e quimiométricas (HCA, PCA e PLS-DA) confirmaram a eficiência da CCDAE na detecção dessas adulterações nos OCM's.

A metodologia de derivatização proposta por meio do reagente de esterificação TMSD mostrou-se adequada aos óleos de copaíba (*Copaifera* sp.); tanto as oleoresinas com alto teor diterpênico (*C. reticulata*) quanto aquelas com baixo teor (*C. multijuga*) foram satisfatoriamente esterificadas, sem qualquer indicativo de degradação ou formação de artefatos. Por outro lado, as metodologias de esterificação realizadas com os ácidos sulfúrico, clorídrico e trifluoreto de boro mostraram vários indicativos de degradação, formação de artefatos e principalmente da ineficiência das esterificações dos ácidos diterpênicos. A esterificação com ácido sulfúrico foi a metodologia que mais se aproximou do perfil esperado para óleos de copaíba autênticos; causou menos comprometimento da composição sesquiterpênica e esterificou uma quantidade razoável

de diterpenos. Por outro lado, uma das esterificações realizadas com BF_3 (BF_3/MET) foi a metodologia que mais comprometeu a integridade dos sesquiterpenos, ao ponto de nenhum sesquiterpeno ser identificado. A esterificação por meio do TMSD foi proposta em função da necessidade de metodologias eficientes, que sejam rápidas e fáceis, e que possam atender as análises dos óleos de copaíba por cromatografia a gás.

Considerando a abundância dos óleos de *C. multijuga* e *C. reticulata* no norte do Brasil e principalmente as grandes aplicações atribuídas a estas oleoresinas, as metodologias proposta nesta tese, visam a contribuir para o aprimoramento do controle de qualidade dos óleos de copaíba (*Copaifera* sp.), de forma simples e acessível; essas contribuições são apresentadas na utilização da CCDAE, que é uma técnica mais acessível que a CG e também pode ser usada no controle de qualidade dessas oleoresinas; também pelo Rfr, que permitiu a rápida identificação dos principais marcadores químicos dos OCM; e por meio de uma metodologia adequada para esterificação dos óleos de copaíba.

7. Referências bibliográficas

7. REFERÊNCIAS

1. Abrão, F.; Costa, D. A.; Alves, J. M.; Senedese, J. M.; De Castro, P. T.; Ambrósio, S. R.; Veneziani, R. C. S.; Bastos, J. K.; Tavares, D. C.; Martins, C. H. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 443, 2015.
2. Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. **Allured publishing**, ed. 4.1. 2007.
3. 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. 01, p. 75-89, 1982.
4. Amirvarsi, A.; Rashidi, M.; Kamyar, M.; Amirahmadi, M.; Daraei, B.; Parastar, H. Combining multivariate image analysis with high-performance thin-layer chromatography for development of a reliable tool for saffron authentication and adulteration Detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1628, p. 461461, 2020.
5. Aguiar, G. P.; Crevelin, E. J.; Dias, H. J.; Ambrósio, S. R.; Bastos, J. K.; Heleno V. C. G.; Vessecchi, R.; Crotti A. E. M.; **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 53, p. 1086, 2018.
6. Alqarni, M. H.; Foudah, H. I.; Alam, A.; Salkini, M. A.; Alam, P.; Yusufoglu, H.S. Novel CCDAE-densitometric method for concurrent quantification of linalool and thymol in essential oils. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, p. 102916, 2021.
7. Alves, J. M.; Senedese, J. M.; Leandro, L. F.; Castro, P. T.; Pereira, D. E.; Carneiro, L. J.; Ambrósio, S. R.; Bastos, J. K.; Tavares, D. C. *Copaifera multijuga* oleoresin and its constituent diterpene (-)-copalic acid: Genotoxicity and chemoprevention study. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 819, p. 26-30, 2017.
8. Ames-Sibin, A. P.; Barizão, C. L.; Castro-Ghizoni, C. V.; Silva, F. M. S.; Sá-Nakanishi, A. B.; Bracht, L.; Bersani-Amado, C. A.; Marçal-Natali, M. R.; Bracht, A.; Comar, J. F. β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 03, p. 1-16, 2018.

9. Barbosa, K. S.; Yoshida, M.; Scudeller, V. V. Detection of adulterated copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil-resins by refractive index and thin layer chromatography. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1A, p. 57-60, 2009.
10. Barbosa, P. C. S.; Medeiros, R. S.; Sampaio, P. T.; Vieira, G.; Wiedemann, L. S. M.; Veiga-Junior, V. F. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): soil composition, seasonality and diameter at breast height. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1823-1833, 2012.
11. Barbosa, P. C. S.; Wiedemann, L. S. M.; Medeiros, R. S.; Sampaio, P. T.; Vieira, G.; Veiga-Junior, V. F. Phytochemical fingerprints of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne) determined by multivariate analysis. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 07, p. 1350-1360, 2013.
12. Barbosa, A. L. P.; Wenzel-Storjohann, A.; Barbosa, J. D.; Zidorn, C.; Peifer, C.; Tasdemir, D.; Çiçek, S. S. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 94-100, 2019.
13. Bardaji, D. K. R.; Da Silva, J. J. M.; Bianchi, T. C.; Eugênio, D. S.; De Oliveira, P. F.; Leandro, L. F.; Rogez, H. L. G.; Venezianni, R. C. S.; Ambrosio, S. R.; Tavares, D. C.; Bastos, J. K.; Martins, C. H. G. *Copaifera reticulata* oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. **Anaerobe**, v. 40, p. 18-27, 2016.
14. Biavatti, M. W.; Dossin, D.; Deschamps, F. C.; Lima, M. P. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 02, p. 230-235, 2006.
15. Boaroto, J.A.; Fernandes, A. B.; Moreira, L. M.; Silveira jr., L.; De Lima, C. J. Identification and quantification of β -caryophyllene in copaiba oil using raman spectroscopy. **Instrumentation Science & Technology**, v. 46, n. 03, p. 265-276, 2018.
16. Bonato, P. S. Cromatografia Gasosa. In: Bonato, P. S.; Collins, C. H.; Braga, G. L. **Fundamentos de Cromatografia**. 1a ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2006, cap. 08, p.203-272.
17. Borges, V. R. A.; Ribeiro, A. F.; Anselmo, C. S.; Cabral, L. M.; De Sousa, V. P. Development of a high performance liquid chromatography method for

- quantification of isomers β -caryophyllene and α -humulene in copaiba oleoresin using the Box-Behnken design. **Journal of Chromatography B**, v. 940, p. 35-41, 2013.
18. Borges, C. H. G.; Cruz, M. G.; Carneiro, L. J.; Da Silva, J. J. M.; Bastos, J. K.; Tavares, D. C.; De Oliveira, P. F.; Rodrigues, V.; Veneziani, R. C. S.; Parreira, R. L. T.; Caramori, G. F.; Nagurniak, G. R.; Magalhães, L. G.; Ambrosio, S. R. *Copaifera duckei* Oleoresin and Its Main Nonvolatile Terpenes: In Vitro Schistosomicidal Properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, p. 1348-1356, 2016.
 19. Braga, W. F.; Rezende, C. M.; Antunes, O. A. C.; Pinto, A. C. Terpenoids from copaiba *cearensis*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 01, p. 263-264, 1998.
 20. Smith, B. C. **Spectral Subtraction. Spectroscopy**, v. 36, n.05, p. 14-19, 2021.
 21. Carneiro, L. J.; Bianchi, T. C.; Da Silva, J. J. M.; Oliveira, L. C.; Borges, C. H. G.; Lemes, D. C.; Bastos, J. K.; Ambrósio, S. R. Development and Validation of a Rapid and Reliable RP-HPLC-PDA Method for the Quantification of Six Diterpenes in *Copaifera duckei*, *Copaifera reticulata* and *Copaifera multijuga* Oleoresins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 04, p. 729-737, 2018.
 22. 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. 07, p. 773-778, 2000.
 23. Çiçek, S. S.; Wenzel-Storjohann, A.; Girreser, U.; Tasdemir, D.; Biological Activities of Two Major Copaiba Diterpenoids and Their Semi-synthetic Derivatives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, p. 18-27, 2020.
 24. Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 02, p. 287-292, 2006.
 25. Costa, J.A.S. 2020. *Copaifera in Flora do Brasil, 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22895>>. Acesso em: 07 jul. 2021.
 26. Dalenogare, D. P.; Ferro, P. R.; De Prá, S. D. T.; Rigo, F. K.; De David Antoniazzi, C. T.; De Almeida, A. S.; Damiani, A. P.; Strapazzon, G.;

- De Oliveira Sardinha, T. T.; Galvani, N. C.; Boligon, A. A.; De Andrade, V. M.; da Silva Brum, E.; Oliveira, S. M.; Trevisan, G. Antinociceptive activity of *Copaifera officinalis* Jacq. L oil and kaurenoic acid in mice. **Inflammopharmacology**, v. 27, p. 829-844, 2019.
27. Da Silva, J. J. M.; Crevelin, E. J.; Carneiro, L. J.; Rogez, H.; Veneziani, R. C. S.; Ambrósio, S. R.; Moraes, L. A. B.; Bastos, J. K. Development of a validated ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of acid diterpenes in *Copaifera* oleoresins. **Journal of Chromatography A**, v. 1515, p. 81-90, 2017.
28. Da Silva, J. J. M.; Ribeiro, V. P.; Lemos, M.; Crotti, A. E. M.; Rogez, H.; Bastos, J. K. Reliable methods for analyses of volatile compounds of *Copaifera* oleoresins combining headspace and gas chromatography. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, n. 01, p. 1900440, 2020.
29. Da Trindade, R.; Da Silva, J. K.; Setzer, W. N. *Copaifera* of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 05, p. 1511, 2018.
30. De Acreditação, C. G. DOQ-CGCRE-008. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**, Revisão 07, 2018.
31. De Assis, I. M.; De Moraes, M. O. R.; Da Conceição, R. C.; Romaguera-Barcelay, Y.; De Souza, R. F. B.; Larrudé, D. R. G.; Rocco, M. L. M.; Brito, W. R. Novel electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer for selective recognition of sesquiterpene β -caryophyllene. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 217, p. 271-277, 2019.
32. De Lima, M. C. F.; Da Silva, L. S.; Veiga-Junior, V. F.; Wiedemann, L. S. M. Quantification of β -caryophyllene and caryophyllene oxide for quality control of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne). **Brazilian Journal of Development**, v.06, n. 01, p. 608-623, 2020.
33. De Souza, F. C.; Brito, L. F.; Silva, M. T.; Sugimoto, M. A.; Pinto, A. C.; De Almeida, P. D. O.; Souza, R. O. S.; Costa, R. A.; Guilhon-Simplicio, F.; Wanderley, A. G.; de Oliveira, K. M. T.; Sousa, L. P.; Veiga-Junior, V. F.; Lima, E. S. Synthesis, Characterization and in vitro, in vivo and in silico Anti-Inflammatory Studies of the Novel Hybrid Based on Ibuprofen and 3-Hydroxy-Copallic Acid Isolated from Copaiba Oil (*Copaifera multijuga*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 07, p. 1335-1344, 2020.

34. Dias, D. O.; Colombo, M.; Kelmann, R. G., De Souza, T. P.; Bassani, V. L.; Teixeira, H. F.; Veiga-Junior, V. F.; Limberger, R. P.; Koester, L. S. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 721, p. 79-84, 2012.
35. Dias, D. O.; Colombo, M.; Kelmann, R. G.; Kaiser, S.; Lucca, L. G.; Teixeira, H. F.; Limberger, R. P.; Veiga-Junior, V. F.; Koester, L. S. Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 154-162, 2014.
36. Do Nascimento, R. F.; De Lima, A. C. A.; Barbosa, P. G. A.; Da Silva, V. P. A. **Cromatografia Gasosa – Aspectos teóricos e práticos**. Imprensa Universitária - UFC. 2018.
37. Dwyer, j. D. The Central American, West Indian, and South American species of *copaifera* (Caesalpiniaceae). **Brittonia**, v. 07, n. 03, p. 143-172, 1951.
38. Ebrahimi-Najafabadi, H.; Kazemeini, S. S.; Pasdaran, A.; Hamedi, A. A novel similarity search approach for high-performance thin-layer chromatography (CCDAE) fingerprinting of medicinal plants. **Phytochemical Analysis**, v. 30, p. 405-414, 2019.
39. Faria, R. C. M.; Rezende, M. J. C.; Rezende, C. M.; Pinto, A. C. Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de misturas biodiesel: diesel utilizando cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 30, n. 08, p. 1900-1905, 2007.
40. Fernandes, E. S.; Passos, G. F.; Medeiros, R.; Da 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. 03, p. 228-236, 2007.
41. Ferreira, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. SciELO: Editora da Unicamp, 2015.
42. Frommenwiler, D. A.; Booker, A.; Vila, R.; Heinrich, M.; Reich, E.; Cañigüeral, S. Comprehensive CCDAE fingerprinting as a tool for a simplified analysis of purity of ginkgo product. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 243, p. 112084, 2019.

43. Galúcio, C. S.; Benites, C. L.; Rodrigues, R. A. F.; Maciel, M. R. W. Recuperação de sesquiterpenos do óleo-resina de copaíba a partir da destilação molecular. **Química Nova**, v. 39 (07), p. 795-800, 2016.
44. Gomes, N. M.; De 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. 01, p. 177-183, 2010.
45. Hair-Junior, J. F.; Black, W. C.; Babin, B. J.; Anderson, R. E.; Tatham, R. L. **Análise multivariada de dados**. 5. ed. Porto Alegre, Bookman, 2005. p. 401.
46. Harris, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos – LTC, 2012.
47. Herrero-Jáuregui, C.; Casado, M. A.; Zoghbi, M. G. B.; Martins-da-Silva, R. C. Chemical Variability of *Copaifera reticulata* Ducke Oleoresin. **Chemistry & Biodiversity**, v. 08, p. 674-685, 2011.
48. Holcapek, M.; Jirásko, R.; Lísa, M. Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3908-3921, 2010.
49. Hwang, E-S.; Kim, H-B.; Lee, S.; Kim, M-J.; Kim, K-J.; Han, G.; Han, Se-Y.; Lee, E-A.; Yoon, J-Hee.; Kim, Dae-OK.; Maeng, S.; Park, Ji-Ho.. Antidepressant-like effects of β -caryophyllene on restraint plus stress-induced depression. **Behavioural Brain Research**, v. 380, p. 112439, 2020.
50. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/am/pesquisa/16/0?tipo=ranking&indicador=12813>. Acessado em 29 de novembro de 2021.
51. Irrera, N.; D'Ascola, A.; Pallio, G.; Bitto, A. Mannino, F.; Arcoraci, V.; Rottura, M.; Ieni, A.; Minutoli, L.; Metro, D.; Vaccaro, M.; Altavilla, D.; Squadrito, F. β -Caryophyllene Inhibits Cell Proliferation through a Direct Modulation of CB2 Receptors in Glioblastoma Cells. **Cancers**, v. 12, p. 1038, 2020.
52. Johnson, M. A. A.; Gowtham, J.; Janakiraman, N.; Malar, T. R. J. J.; Rocha, J. E.; Coutinho, H. D. M. Phytochemical Profile of *Asplenium aethiopicum* (Burm. f.) Becherer Using CCDAE. **Separations**, v. 07, p. 02-09, 2020.
53. Kaltbach, P.; Ballert, S.; Kabrodt, K.; Schellenberg, I. New CCDAE methods for analysis of major bioactive compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 92, p. 103568, 2020.

54. Kim, S.; Karl, T.; Helmig, D.; Daly, R.; Rasmussen, R.; Guenther, A. Measurement of atmospheric sesquiterpenes by proton transfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS). **Atmospheric Measurement Techniques**, v. 02, p. 99-112, 2009.
55. Leandro, L. M.; Vargas, F. S.; Barbosa, P. C. S.; Neves, J. K. O.; Da Silva, J. A.; Veiga-Junior, V. F. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 04, p. 3866-3889, 2012.
56. Lima, S. R. M.; Veiga-Junior, V. F.; 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, p. 1048-1053, 2003.
57. Liu, Y.; Victoria, J.; Wood, M.; Staretz, M. E.; Brettell, T. A. High Performance Thin-Layer Chromatography (CCDAE) data of Cannabinoids in ten mobile phase systems. **Data in Brief**, v. 31, p. 105955, 2020.
58. Lucca, L. G.; De Matos, S. P.; Borille, B. T.; Dias, D. O.; Teixeira, H. F.; Veiga-Junior, V. F.; Limberger, R. P.; Koester, L. S. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 104, p. 144-148, 2015.
59. Makowicz, E.; Jasicka-Misiak, I.; Teper, D.; Kafarski, P. CCDAE Fingerprinting-Rapid Method for the Differentiation of Honeys of Different Botanical Origin Based on the Composition of the Lipophilic Fractions. **Molecules**, v. 23, p.1811, 2018.
60. 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, p. 282-288, 2008.
61. Melnyk, N.; Pawlowska, K. A.; Ziaja, M.; Wojnowski, W.; Koshovyi, O.; Granica, S.; Bazylo, A. Characterization of herbal teas containing lime flowers-Tiliae flos by CCDAE method with chemometric analysis. **Food Chemistry**, v. 346, 128929, 2021.
62. Migowska, N.; Stepnowski, P.; Paszkiewicz, M.; Gołębowski, M.; Kumirska, J. trimethylsilyldiazomethane (TMSD) as a new derivatization reagent for trace analysis of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by gas

- chromatography methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 3029-3034, 2010.
63. Milinsk, M. C.; Matsushita, M.; Visentainer, J. V.; De Oliveira, C. C.; De 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. 08, p. 1475-1483, 2008.
64. Moreira, A. C. O.; Braga, J. B. Rapid Purity Determination of Copaiba Oils by a Portable NIR Spectrometer and PLSR. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 1867-1877, 2017.
65. Morlock, G. E.; Background Mass signals in TLC/CCDAE–ESI-MS and practical advices for use of the TLC-MS interface. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 37, p. 2892-2914, 2014.
66. Moreira, A. C. O.; Braga, J. B. Authenticity Identification of Copaiba Oil Using a Handheld NIR Spectrometer and DD-SIMCA. **Food Analytical Methods**, v. 14, p. 865-872, 2021.
67. Mulaudzi, N.; Anokwuru, C. P.; Tankeu, S. Y.; Combrinck, S.; Chen, W.; Vermaak, I.; Viljoen, A.M. Phytochemical Profiling and Quality Control of *Terminalia sericea* Burch. ex DC. Using CCDAE Metabolomics. **Molecules**, v. 26, p. 432, 2021.
68. Nakamura, M. T.; Endo, E. H.; De Sousa, J. P.B.; Callejon, D. R.; a Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P. D.; De Freitas, O.; Nakamura, C. V.; Lopes, N. P. Copaiba Oil and Its Constituent Copalic Acid as Chemotherapeutic Agents against Dermatophytes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 08, p. 1377-1383, 2017.
69. Neves, J. K. O.; Apolinário, A. C.; Saraiva, K. L. A.; Da Silva, D. T. C.; Reis, M. Y. F. A.; Damasceno, B. P. G. L.; Pessoa Jr, A.; Galvão, M. A. M.; Soares, L. A. L.; Veiga-Junior, V. F.; Da Silva, J. A.; Convertih, A. Microemulsions containing *Copaifera multijuga* Hayne oil-resin: Challenges to achieve an efficient system for β -caryophyllene delivery. **Industrial Crops & Products**, v. 111, p. 185-192, 2018.
70. Osman, W.; Mohammed, M. S.; Khalid, H. S.; Muddathir, A.; Shantier, S. W.; Osman, B.; Abdoon3, I. CCDAE Fingerprint Profile and Identification of Antidiabetic and Antioxidant Leads from *Bauhinia rufescens* L. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, p. 1-18, 2020.

71. Patitucci, M. L.; Veiga-Junior, V. F.; Pinto, A. C.; Zoghbi, M. G. B.; Silva, J. R. A. Utilização de Cromatografia gasosa de Alta Resolução n detecção de Classe de terpenos em extratos brutos vegetais. **Química Nova**, v. 18, n. 03, p. 262-266, 1995.
72. Pedan, V.; Weber, C.; Do, T.; Fischer, N.; Reich, E.; Rohn, S. CCDAE fingerprint profile analysis of cocoa proanthocyanidins depending on origin and genotype. **Food Chemistry**, v. 267, p. 277-287, 2018.
73. Pérez-Enciso, M.; Tenenhaus, M. Prediction of clinical outcome with microarray data: a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach. **Human Genetics**, v. 112, p. 581-592, 2003.
74. Picciolo, G.; Pallio, G.; Altavilla, D.; Vaccaro, M.; Oteri, G.; Irrera, N.; Squadrito, F. β -Caryophyllene Reduces the Inflammatory Phenotype of Periodontal Cells by Targeting CB2 Receptors. **Biomedicines**, v. 08, p. 164, 2020.
75. Pinheiro, J. G. O.; Tavares, E. A.; Da Silva, S. S.; Silva, J. F.; De Carvalho, Y. M. B. G.; Ferreira, M. R. A.; Araújo, A. A. S.; Barbosa, E. G.; Pedrosa, M. F. F.; Soares, L. A. L.; De Azevedo, E. P.; Veiga-Junior, V. F.; De Lima, A. A. N. Inclusion Complexes of Copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) Oleoresin and Cyclodextrins: Physicochemical Characterization and Anti-Inflammatory Activity. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 11, p. 2388, 2017.
76. Pinto, A. C.; Braga, W. F.; Rezende, C. M.; Garrido, F. M. S.; Veiga-Junior, V. F.; Bergter M 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 the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 04, p. 355-360, 2000.
77. Ribeiro, V. P.; Arruda, C.; Da Silva, J. J. M.; Mejia, J. A. A.; Furtado, N. A. J. C.; Bastos, J. K. Use of spinning band distillation equipment for fractionation of volatile compounds of *Copaifera* oleoresins for developing a validated Gas Chromatographic method and evaluating antimicrobial activity. **Biomedical Chromatography**. v, 33, n. 02, p. 2018.
78. Rigamonte-Azevedo, O. C.; Wadt, P. G. S.; Wadt, L. H. O.; Veiga-Junior, V. F.; Pinto, A. C.; Regiani, A. M. Variabilidade Química e Física do óleo-resina de *Copaifera* spp. No Sudoeste Da Amazônia Brasileira. **Revista brasileira de oleaginosas e fibrosas**, v. 08, p. 851-861, 2004.

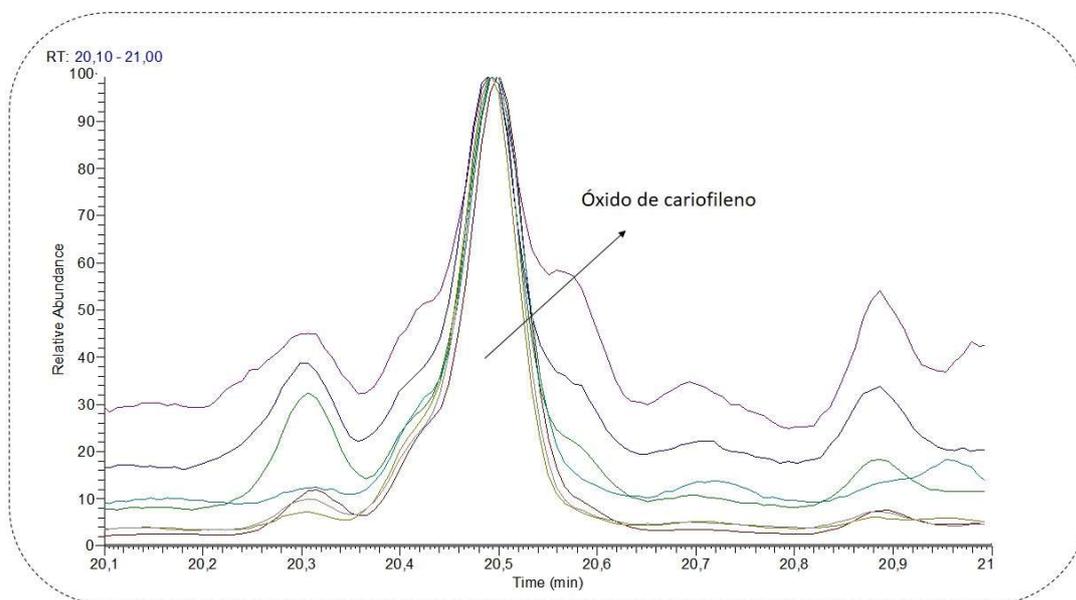
79. Rigamonte-Azevedo, O. C.; Wadt, P. G. S.; Wadt, L. H. O. Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp) de populações naturais do Sudoeste da Amazônia. **Árvore**, v. 30, n. 04, p. 583-591, 2006.
80. Rocamora, C. R.; Ramasamy, K.; Lim, S. M.; Majeed, A. B. A.; Agatonovic-Kustrin, S. CCDAE based approach for bioassay-guided evaluation of antidiabetic and neuroprotective effects of eight essential oils of the Lamiaceae family plants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 178, p. 112909, 2020.
81. Rocha, D. Q.; Barros, D. K.; Costa, E. J. C.; De Souza, K. S.; Passos, R. R.; Veiga-Junior, V. F.; Chaar, J. S. Determinação da matéria-prima utilizada na produção do biodiesel adicionado ao diesel mineral através de monitoramento seletivo de íons. **Química Nova**, v. 31, n. 05, 1062-1066, 2008.
82. Rouhani, M. Modeling and optimization of ultrasound-assisted green extraction and rapid CCDAE analysis of stevioside from *Stevia Rebaudiana*. **Industrial Crops & Products**, v. 132, p. 226-235, 2019.
83. Sallam, S. M.; Shawky, E.; Sohafy, S. M. El. Determination of the effect of germination on the folate content of the seeds of some legumes using CCDAE-mass spectrometry-multivariate image analysis. **Food Chemistry**, v. 362, p. 130206.
84. 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 Chemical Society**, v. 18, n. 05, p. 984-989, 2007.
85. Sköld, M.; Karlberg, A-T.; Matura, M.; Börge, A. The fragrance chemical b-caryophyllene-air oxidation and skin sensitization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 538-545, 2006.
86. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8a. ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.
87. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. **Identificação de compostos orgânicos**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos – LTC, 2010.
88. Sousa, J. P. B.; Brancalion, A. P. S.; Souza, A. B.; Turatti, I. C. C.; Ambrósio, S. R.; Furtado, N. A. J. C.; Lopes, N. P.; Bastos, J. K. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 04, p. 653-659, 2011.
89. Souza, A. B.; Moreira, M. R.; Borges, C. H. G.; Simão, M. R.; Bastos, J. K.; De Sousa, J. P. B.; Ambrosio, S. R.; Veneziani, R. C. S. Development and validation

- of a rapid RP-HPLC method for analysis of (-)-copalic acid in copaíba oleoresin. **Biomedical Chromatography**, v. 27, p. 280–283, 2012.
90. Tappin, M. R. R.; Pereira, J. F. G.; Lima, L. A.; Siani, A. C. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, n. 02, p. 236-240, 2004.
91. Tonin, A. P.; Carneiro, G. R.; Ribeiro, M. A. S.; Ribeiro, J. C.; Silva, V. M.; Meurer, E. C. Identificação de adulteração em óleos de oliva: problematizando a introdução à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 41, n. 09, p. 1089-1094, 2018.
92. Tong, H.; Bell, D.; Tabei, K.; Siegel, M. M. Automated Data Massaging, Interpretation, and E-Mailing Modules for High Throughput Open Access Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 10, p. 1174, 1999.
93. Trotzmuller, M.; Guo, X.; Fauland, A.; Kofeler, H.; Lankmayra, E. Characteristics and origins of common chemical noise ions in negative ESI LC–MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 2011, n. 46, p. 553-560, 2011.
94. Vargas, F. S.; De Almeida, P. D. O.; Aranha, E. S. P.; Boleti, A. P. A.; Newton, P.; De Vasconcellos, M. C.; Veiga-Junior, V. F.; Lima, E. S. Biological Activities and Cytotoxicity of Diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. **Molecules**, v. 20, 6194-6210, 2015.
95. Vasconcelos, A. F. F.; Godinho, O. E. S. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1057-1060, 2002.
96. 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.
97. Veiga-Junior, V. F.; Pinto, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 02, p. 273-286, 2002.
98. Veiga-Junior, V. F.; Pinto, A. C. Utilização do Monitoramento Seletivo de Íons como Ferramenta para a Detecção de Adulterações em Óleos de Copaíba. **Revista Fitos**, v. 01, n. 01, p. 52-56, 2005.
99. 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*

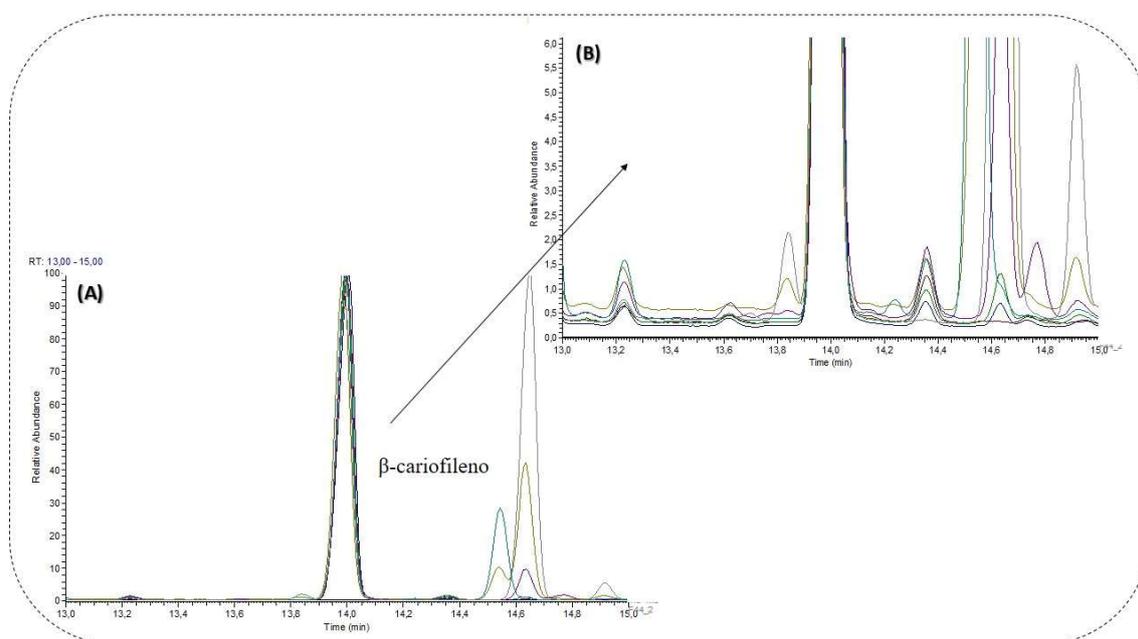
- Hayne and its fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 1405-1410, 2006.
100. Veiga-Junior, V. F.; Rosas, E. C.; Carvalho, M. V.; Henriques, M. G. M. O.; Pinto, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, n. 02, p. 248-254, 2007.
101. Xavier-Junior, F. H.; Maciuk, A.; Rochelle do Vale Morais, A. R. V.; Alencar, E. N.; Garcia, V. L.; Do Egito, E. S. T.; Vauthier, C. Development of a gas chromatography method for the analysis of copaiba oil. **Journal of chromatographic science**, v. 55, n. 10, p. 969-978, 2017.
102. Zhang, Na.; Wang, M.; Li, Y.; Zhou, M.; Wu, T.; Cheng, Z. TLC–MS identification of alkaloids in Leonuri Herba and Leonuri Fructus aided by a newly developed universal derivatisation reagent optimised by the response surface method. **Phytochemical Analysis**, v. 32, p. 242-251, 2021.

8. Anexos

8. ANEXOS

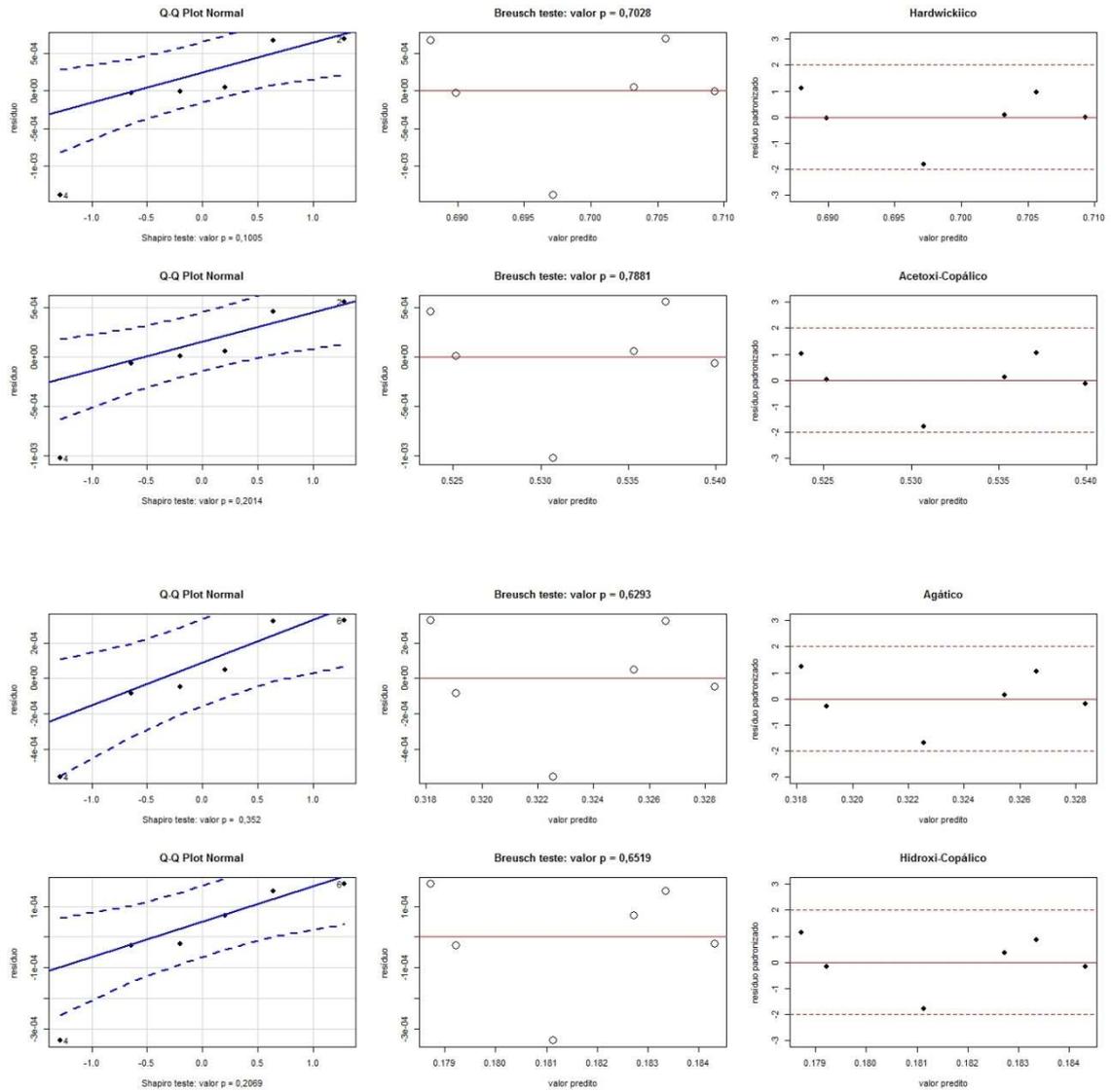


Anexo 1. Sobreposição dos cromatogramas dos OCM's na região de eluição do óxido de cariofileno.



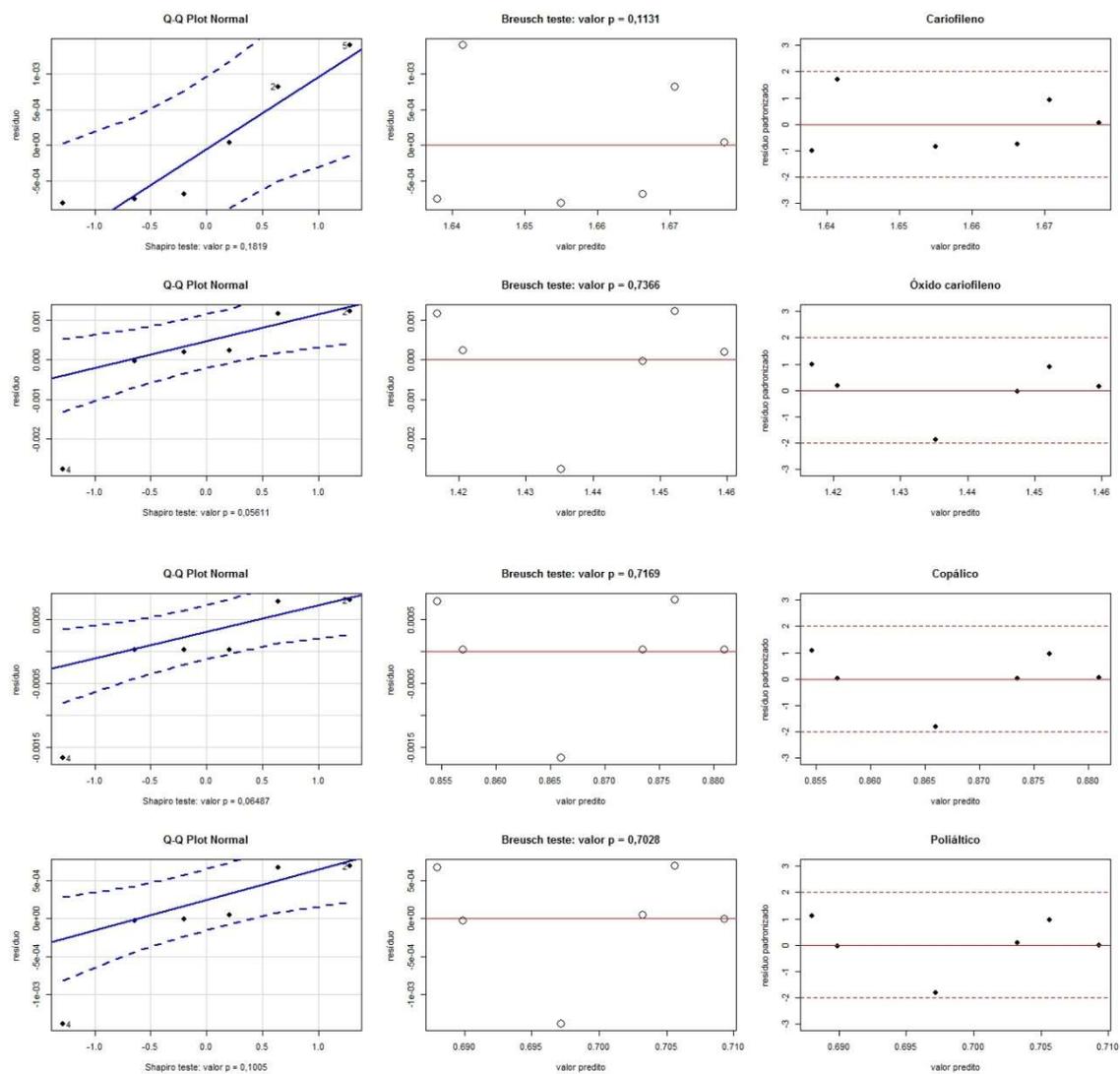
Anexo 2. Sobreposição dos cromatogramas dos OCM's na região de eluição do β -cariofileno (A); Expansão da região A (B).

ANEXOS



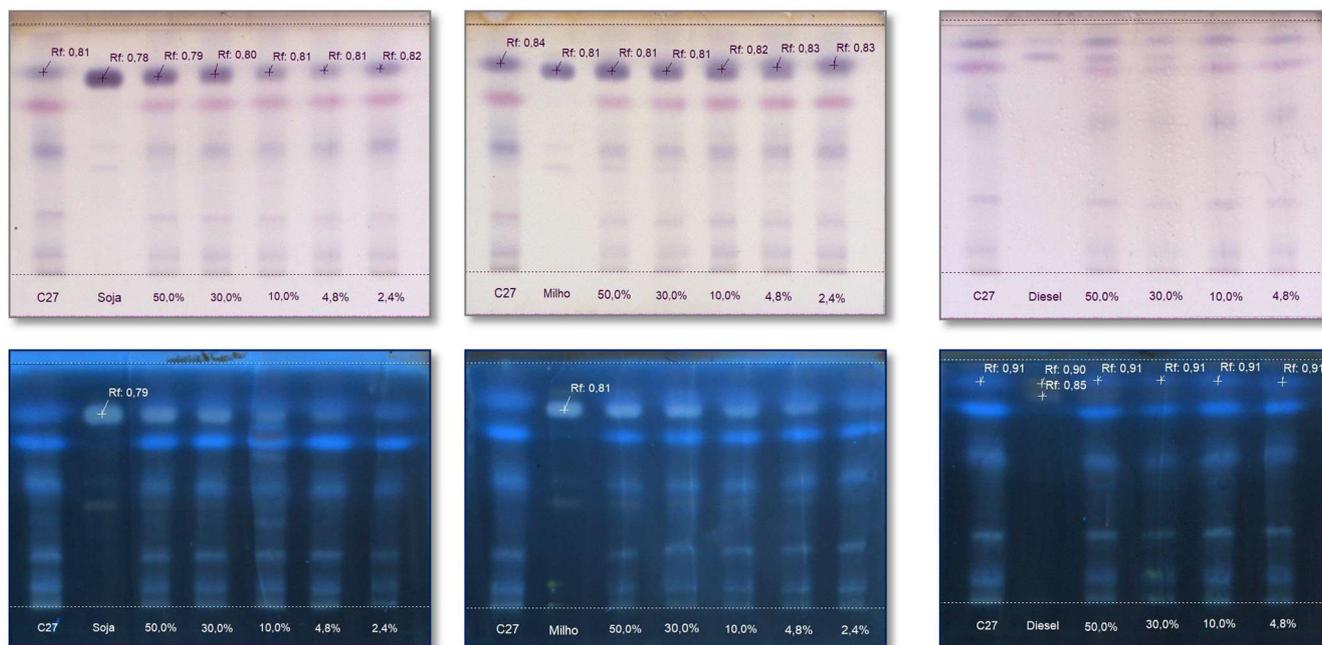
Anexo 3. Gráfico de resíduos para os ácidos hardwickiico, acetoxi-copálico, agático e hidroxi-copálico - Homocedasticidade dos resíduos (Teste de Breusch – Pagan).

ANEXOS

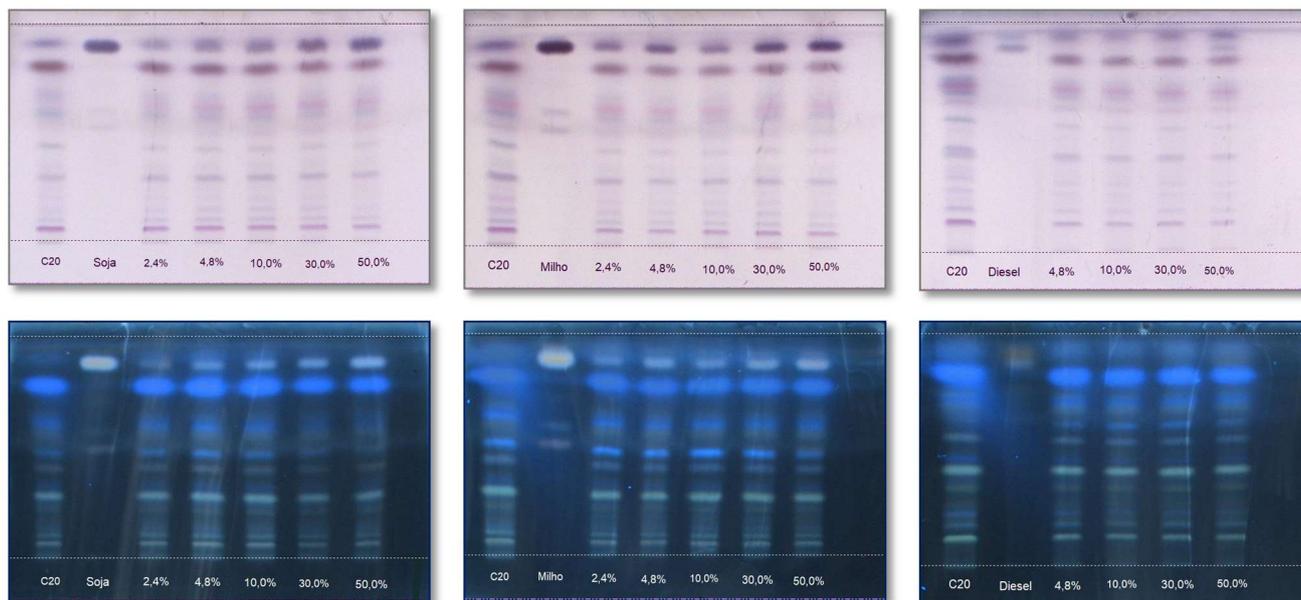


Anexo 4. Gráfico de resíduos para o β -cariofileno, óxido de cariofileno e os ácidos copálico e hardwickiico - Homocedasticidade dos resíduos (Teste de Breusch – Pagan).

ANEXOS

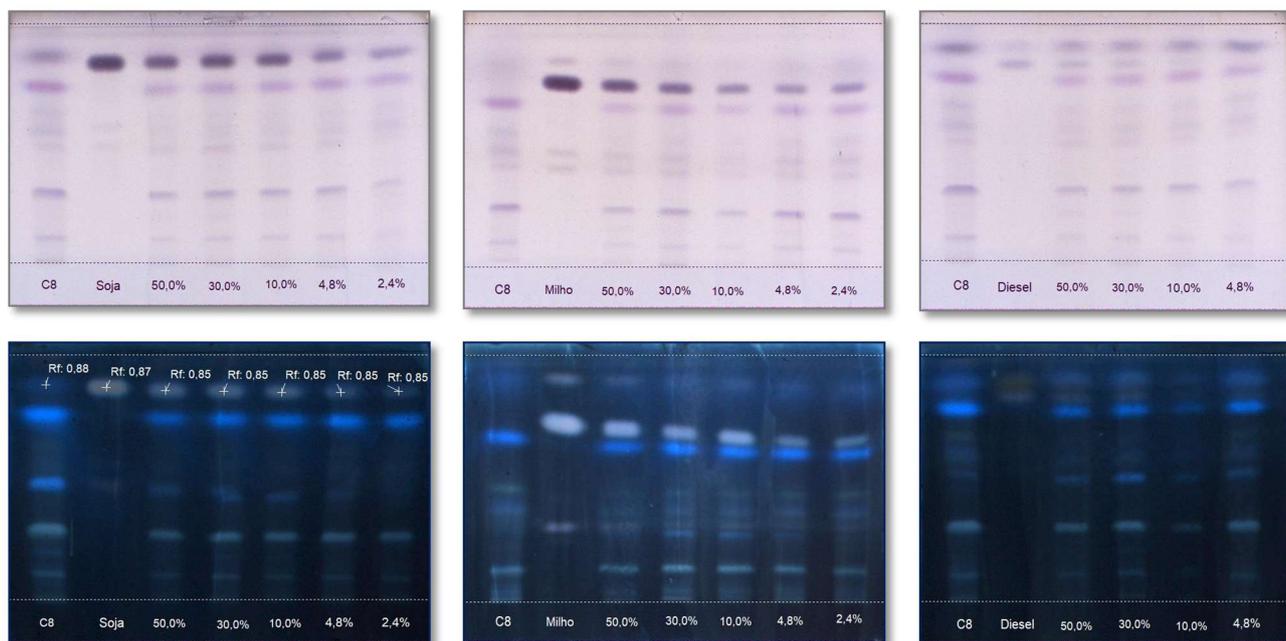


Anexo 5. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo C27, adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.

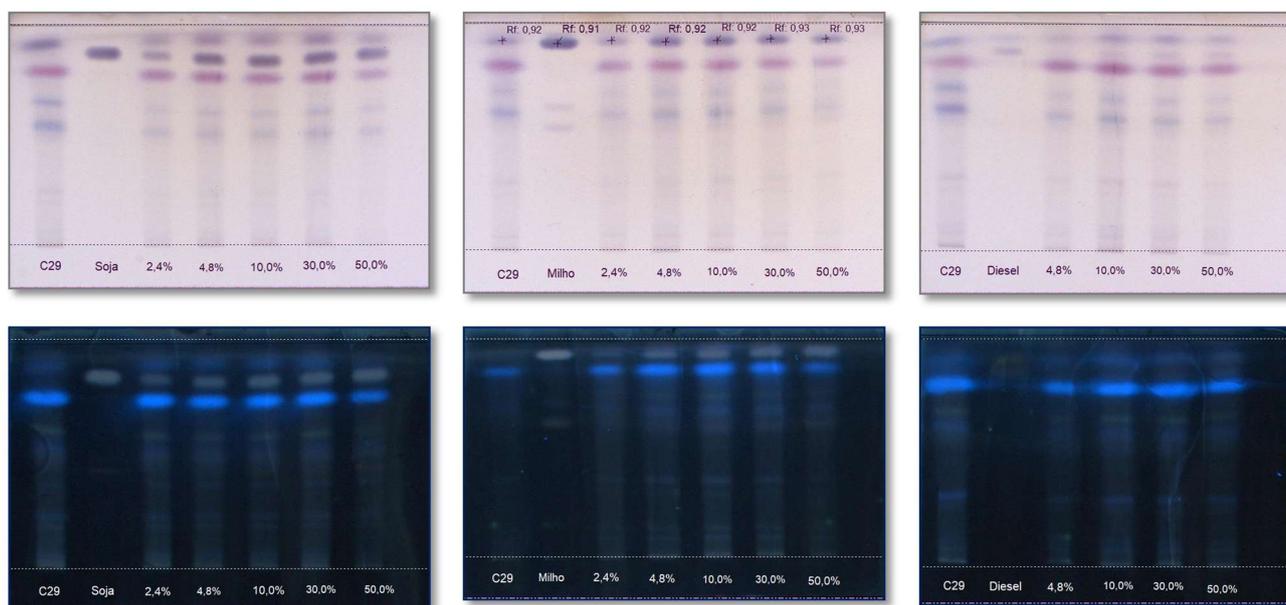


Anexo 6. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo C20, adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.

ANEXOS

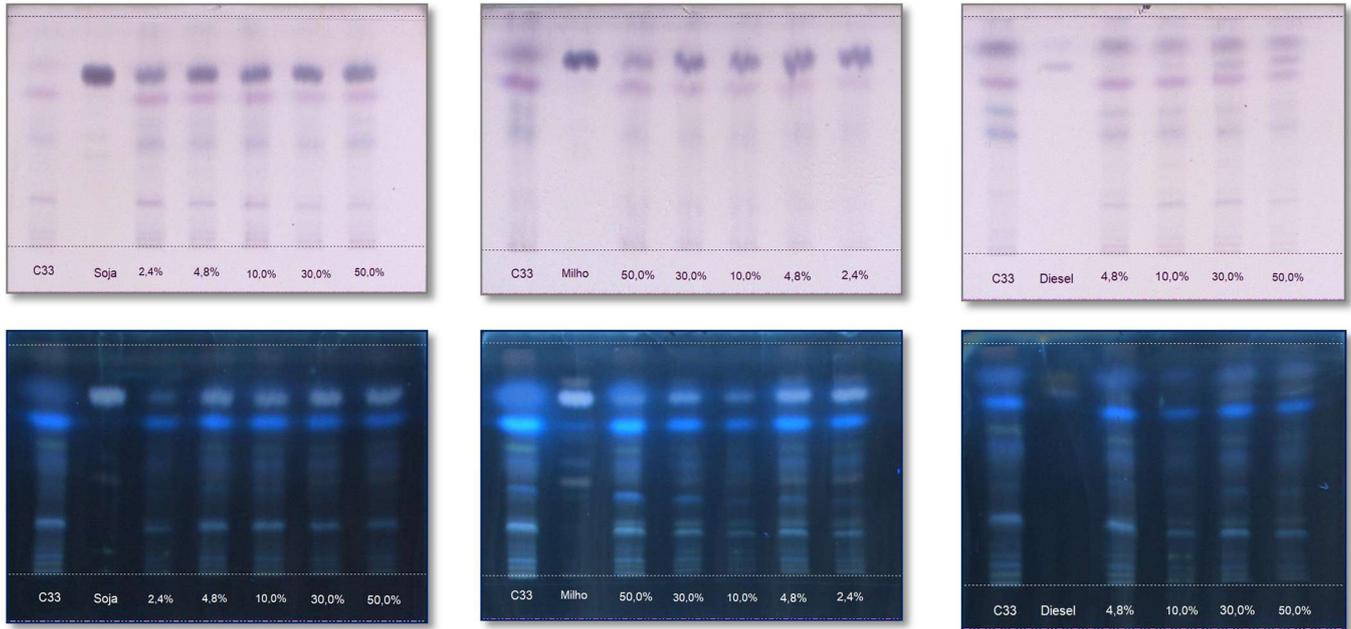


Anexo 7. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo **C8**, adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções

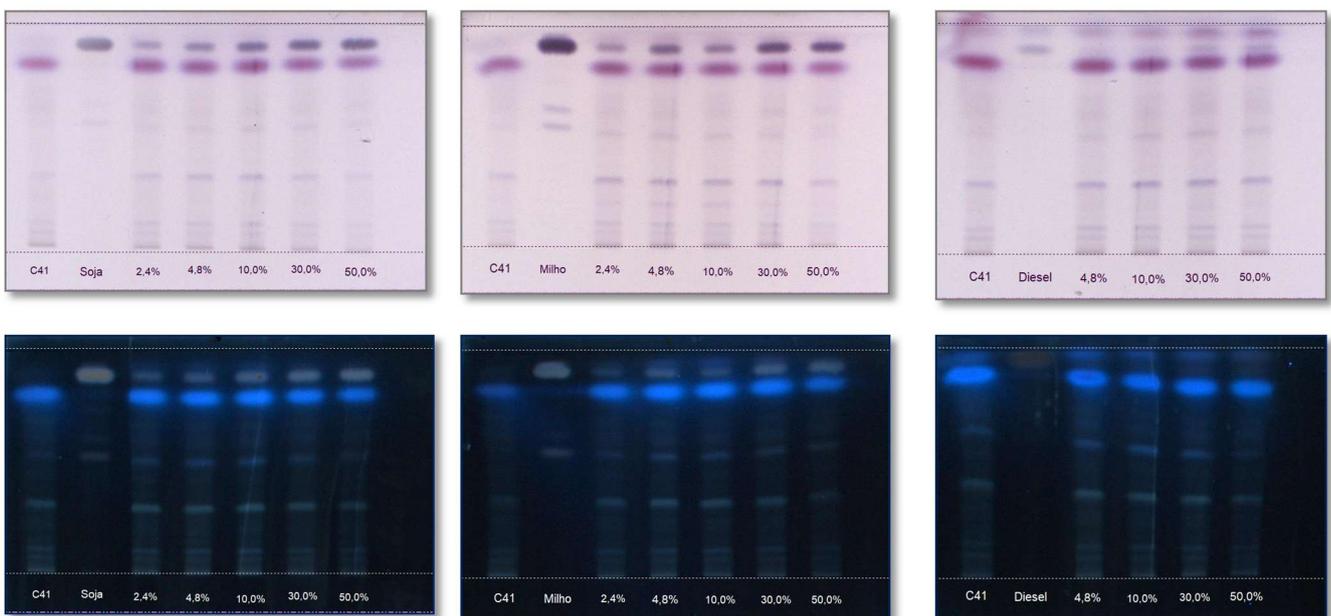


Anexo 8. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo **C29**, adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.

ANEXOS

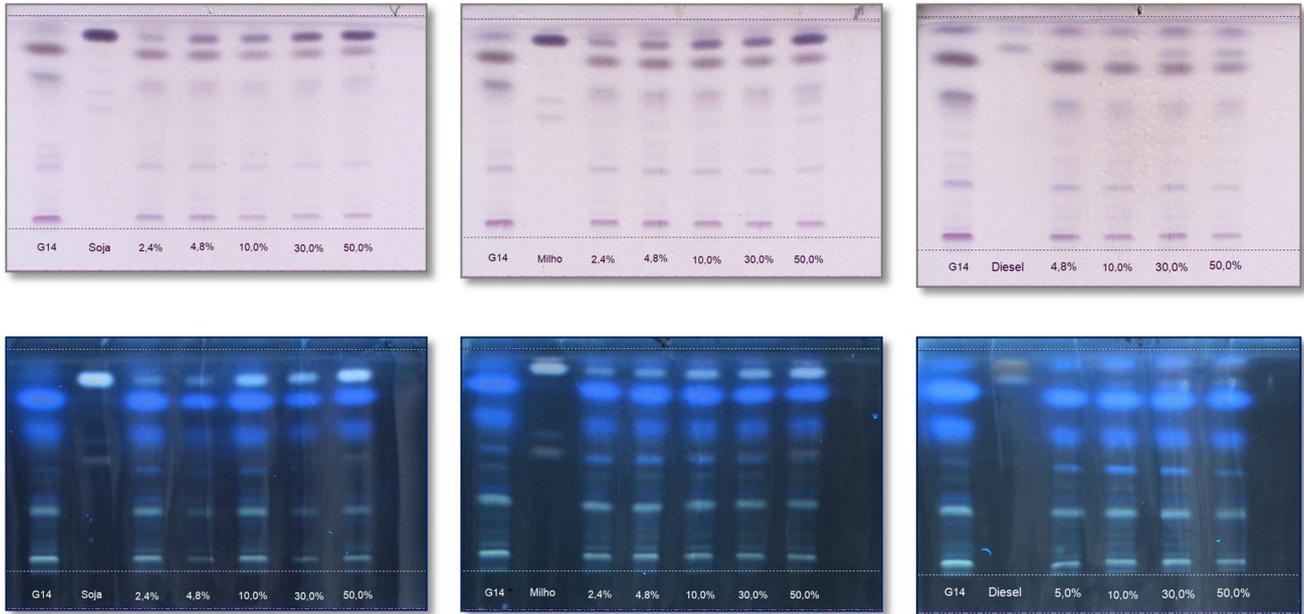


Anexo 9. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo **C33**, adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.

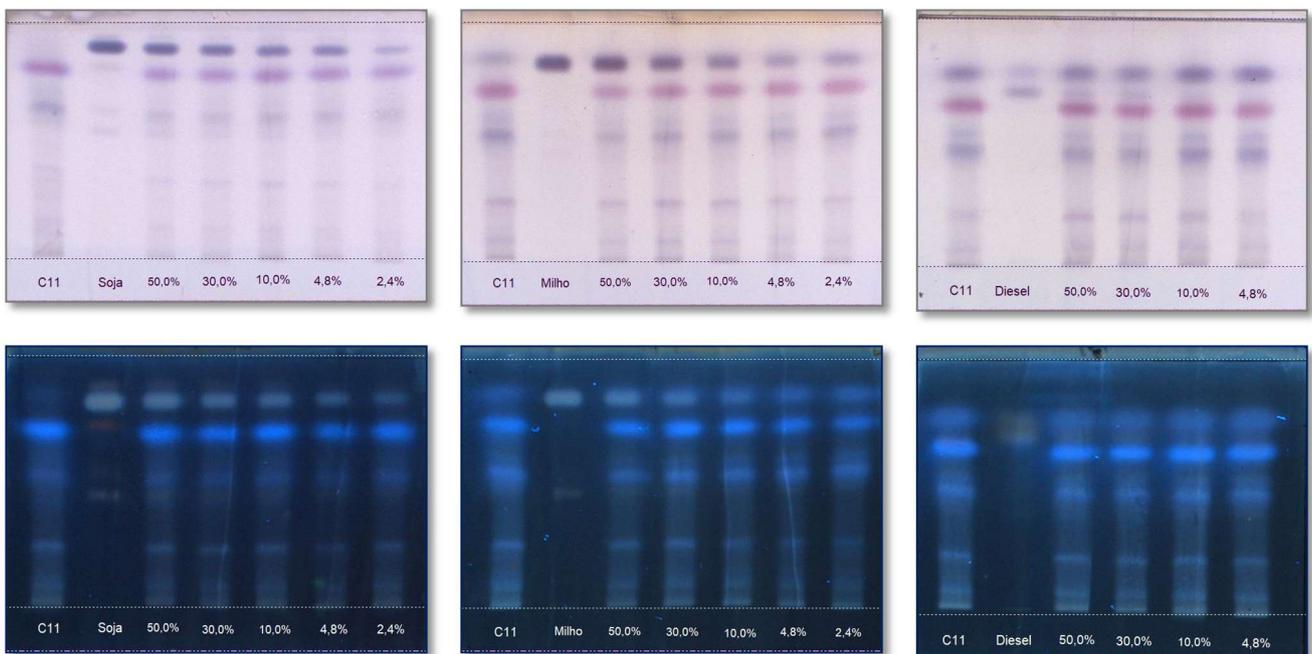


Anexo 10. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo **C41**, adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.

ANEXOS

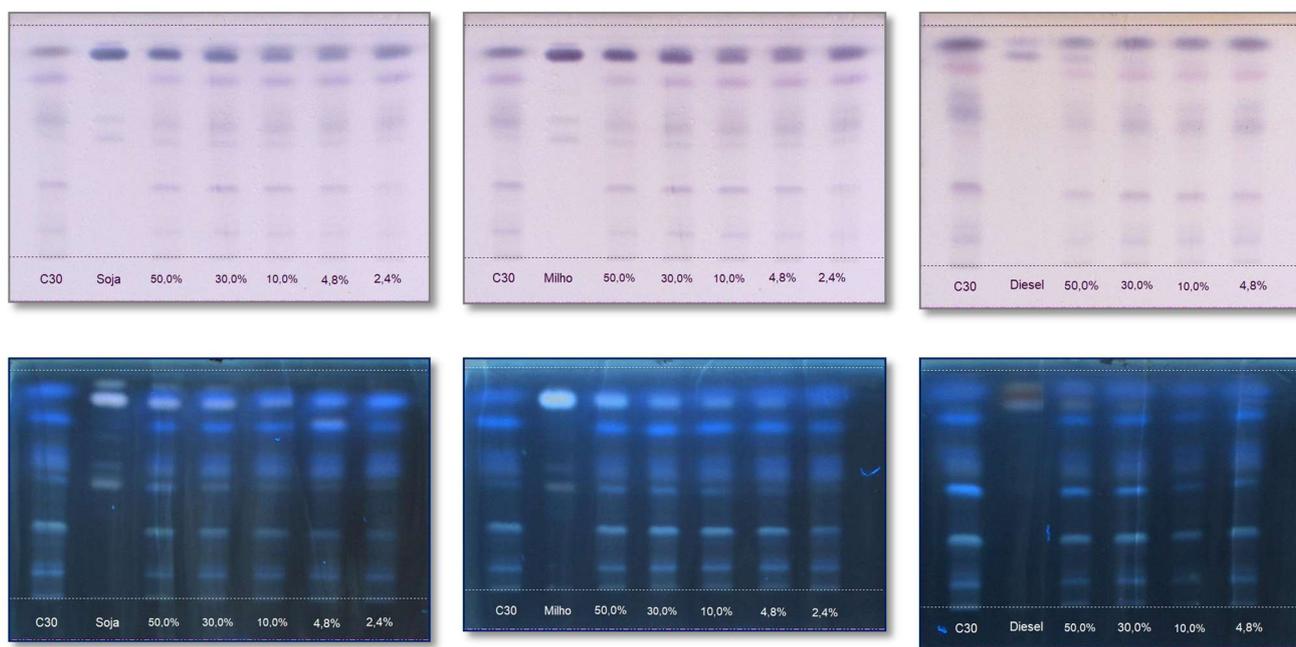


Anexo 11. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo C14, adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.



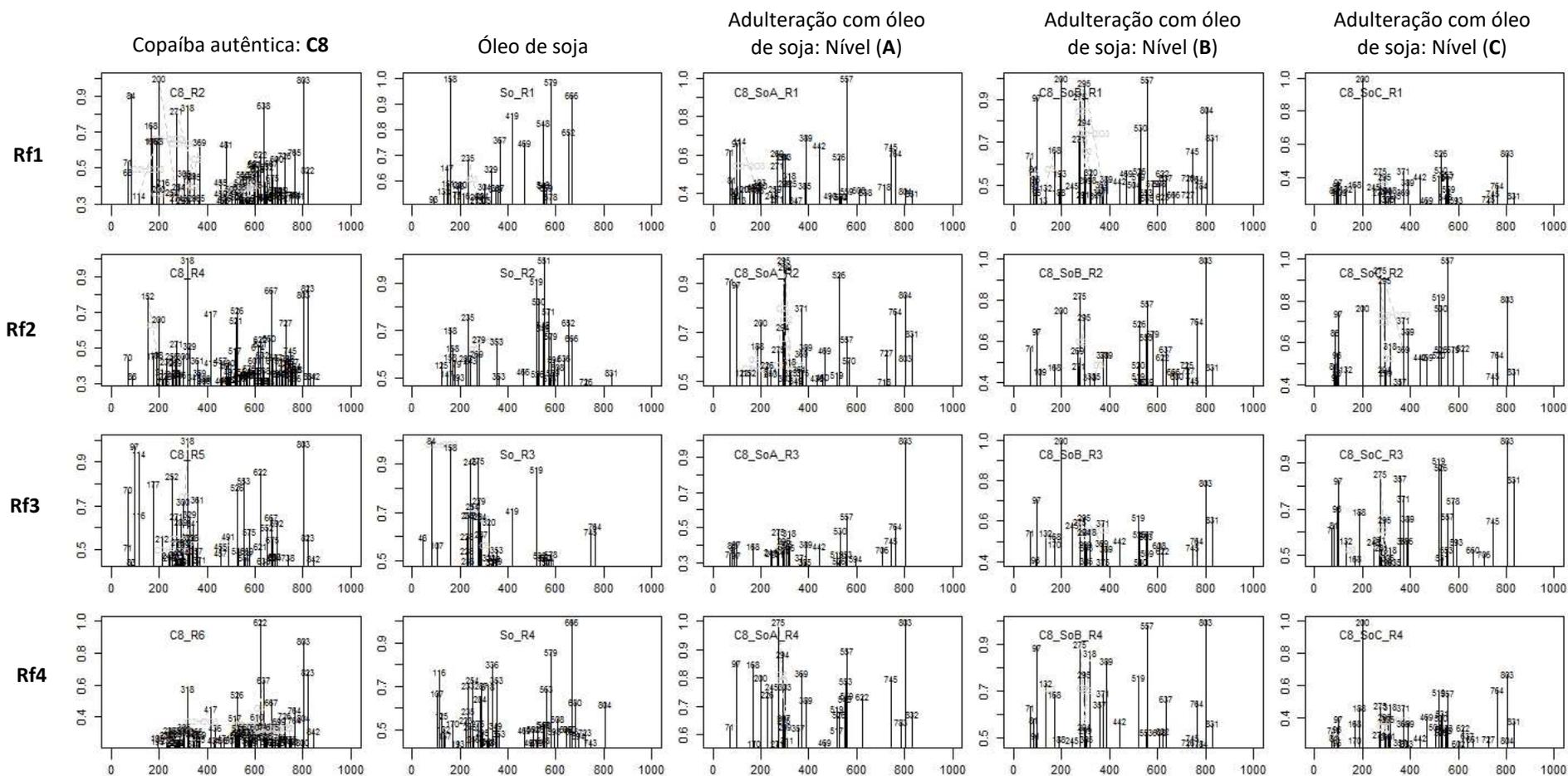
Anexo 12. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo C11, adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.

ANEXOS



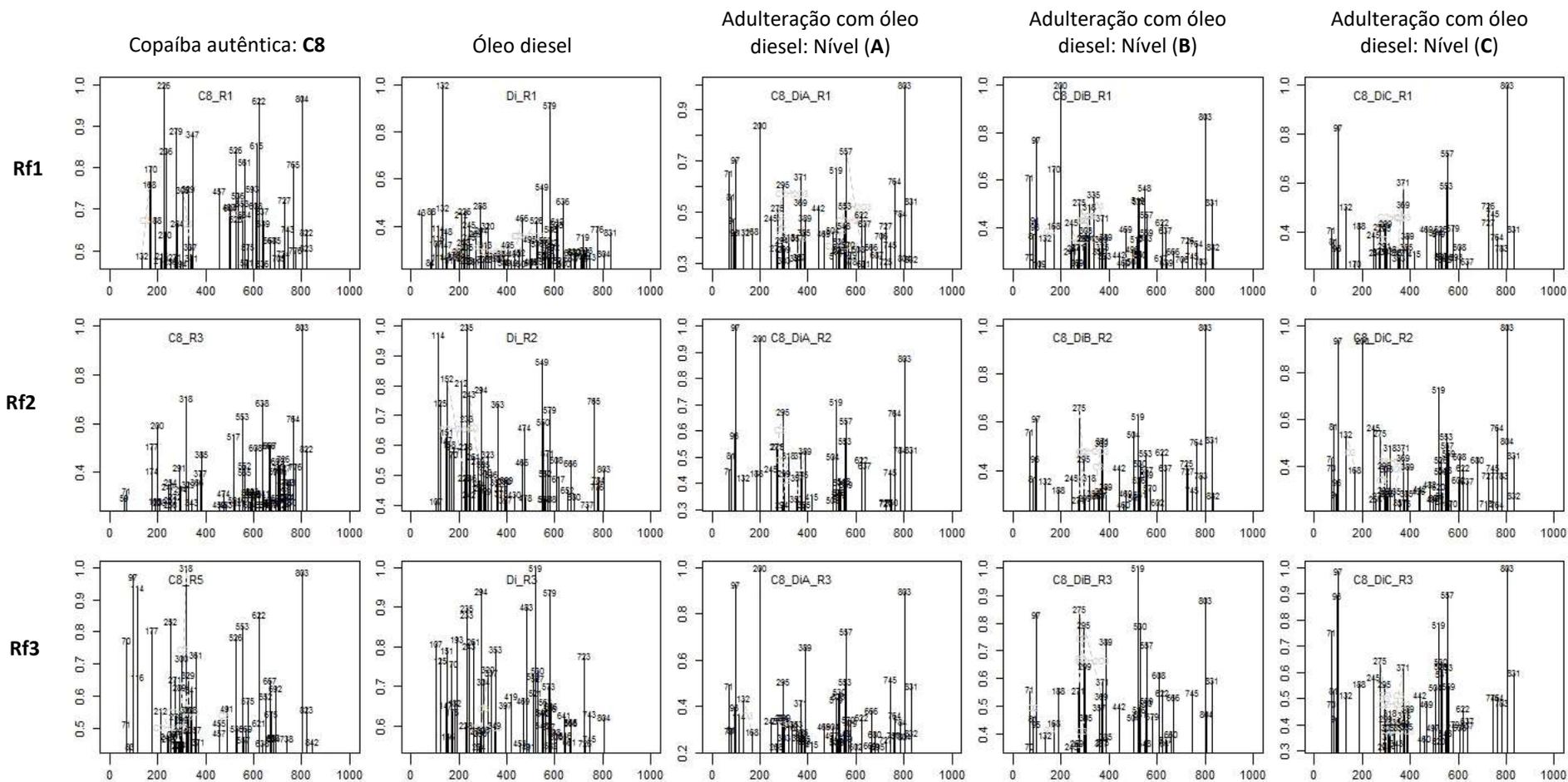
Anexo 13. Cromatogramas obtidos por CCDAE do óleo **C30**, adulterados com óleos de soja, milho e diesel em diferentes proporções.

ANEXOS



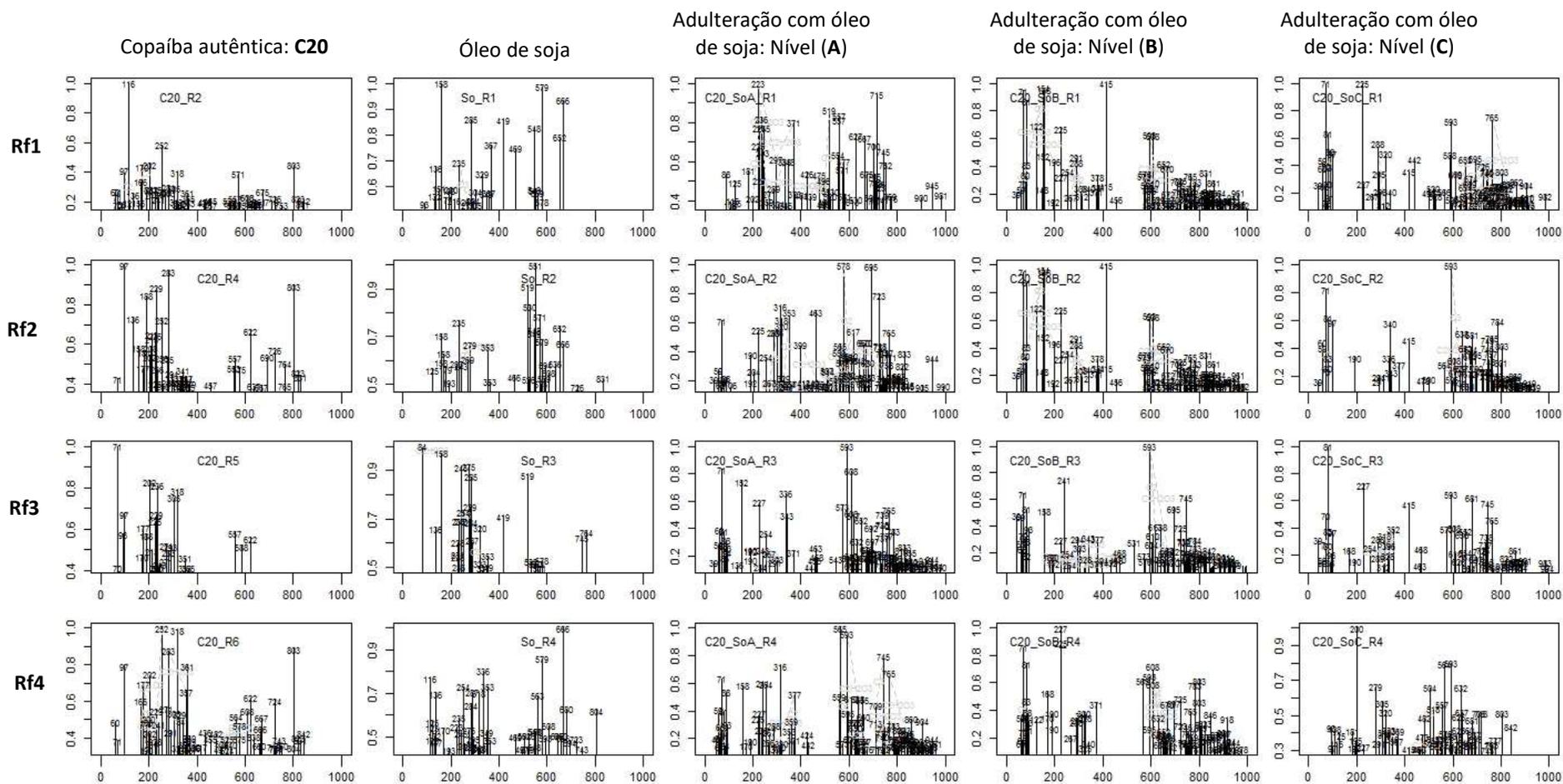
Anexo 14. Espectros de massas obtidos por CCDAE-EM do óleo de *C. multijuga* (C8) adulterados com óleo de soja.

ANEXOS



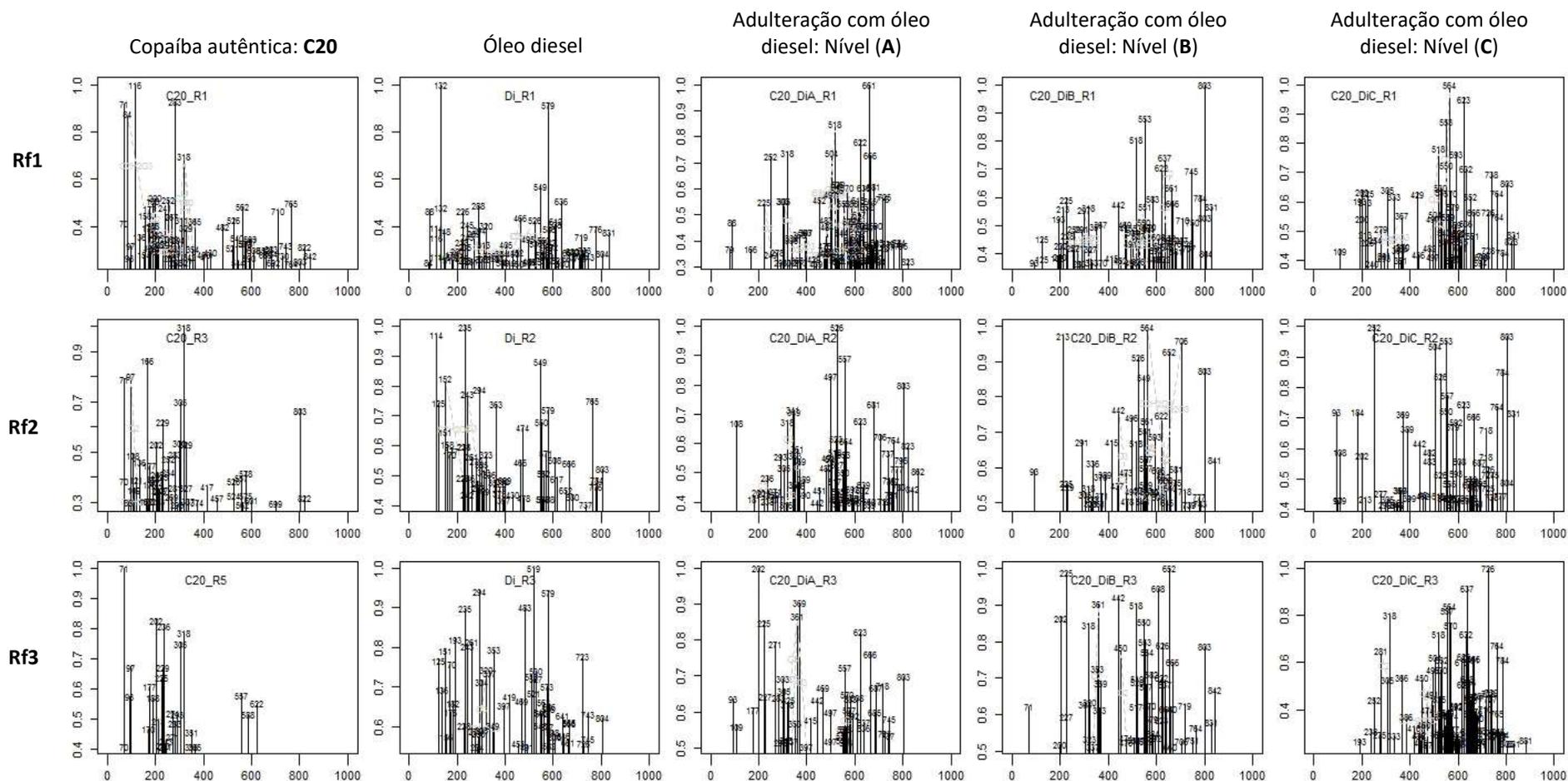
Anexo 15. Espectros de massas obtidos por CCDAE-EM do óleo de *C. multijuga* (C8) adulterados com óleo diesel.

ANEXOS



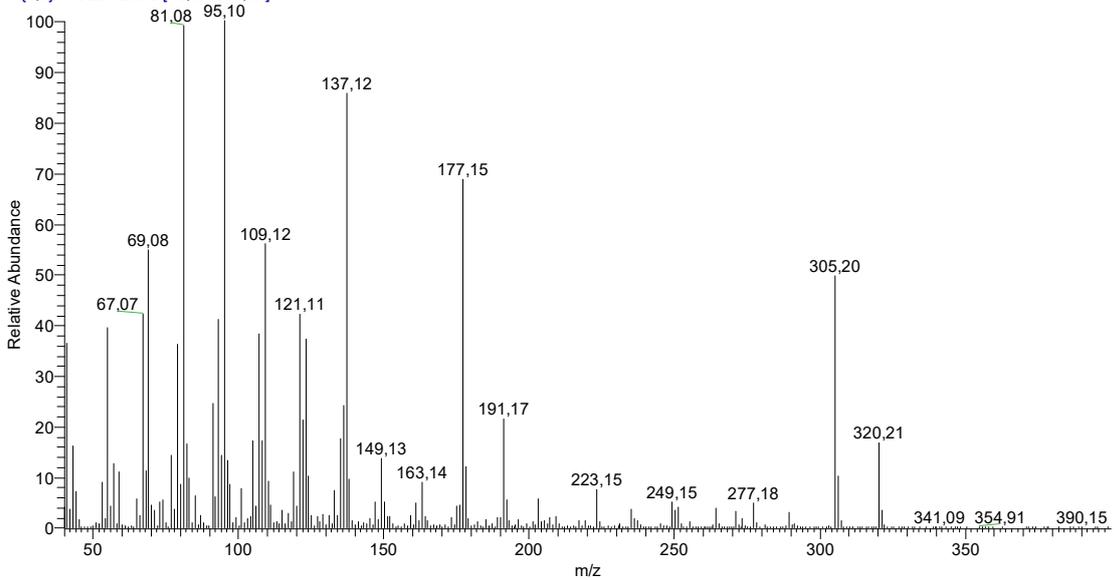
Anexo 16. Espectros de massas obtidos por CCDAE-EM dos óleos de *C. multijuga* (C20) adulterados com óleo de soja.

ANEXOS



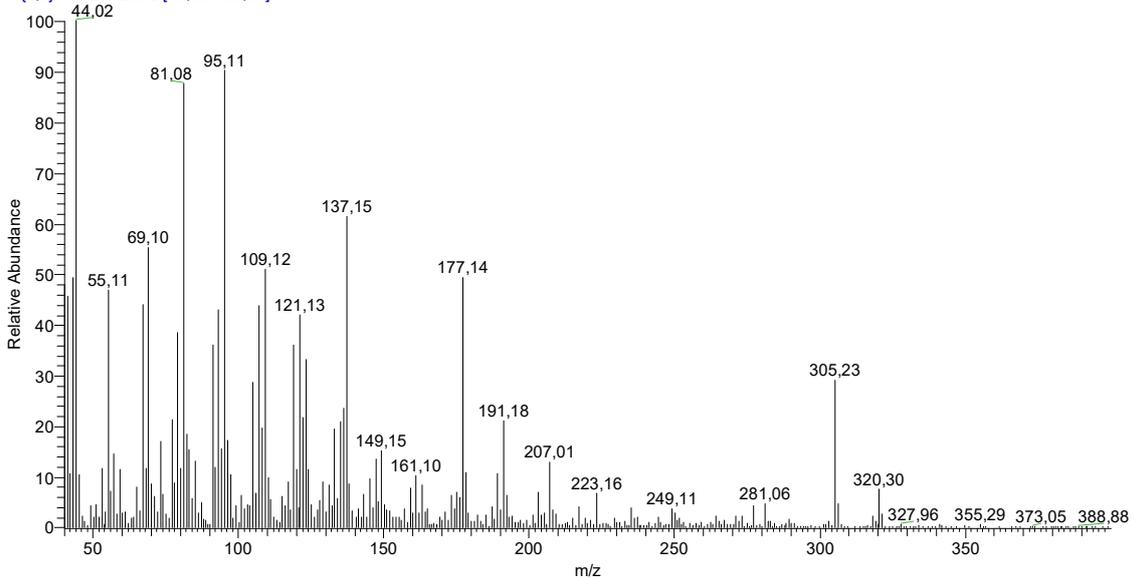
ANEXOS

OCR2_30uL #3729 RT: 35,32 AV: 1 NL: 8,18E6
T: {0;0} + c EI Full ms [40,00-400,00]



Anexo 18. Espectro de massas do eperuato de metila na esterificação com TMSD.

ocr_bf3_met_2 #3729 RT: 35,32 AV: 1 NL: 5,98E5
T: {0;0} + c EI Full ms [40,00-400,00]



Anexo 19. Espectro de massas do eperuato de metila na esterificação com BF₃/MET.

CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE ÓLEOS DE COPAÍBA (*Copaifera* sp.) UTILIZANDO DETECÇÃO DE MARCADORES POR FATOR DE RETENÇÃO RELATIVA EM HPTLC
Milena C. F. de Lima^a, Samir F. de Almeida Cavalcante^{b,c}, Larissa S. M. Wiedemann^{a,c} e Valdir F. da Veiga Junior^{a,c,*}
^aDepartamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, 69080-900 Manaus – AM, Brasil

^bInstituto de Defesa Química, Biológica e Nuclear, Centro Tecnológico do Exército, 23020-470 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

^cDepartamento de Engenharia Química, Instituto Militar de Engenharia, 22290-270 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 28/01/2020; aceito em 20/04/2020; publicado na web em 10/06/2020

CHARACTERIZATION AND QUALITY CONTROL OF COPAIBA OILS (*Copaifera* sp.) BY RELATIVE RETENTION FACTOR BY HPTLC TO DETECTION OF BIOMARKERS. Copaiba oils present medicinal uses that demand the development of methodologies that could ensure the authenticity and guarantee the species differentiation. The usual way to differentiate the copaiba oils is analyze the terpene composition, mainly the diterpenic acids profile. Unlike caryophyllene and its oxide, copaiba diterpenes are not commercially available and lab obtention is expensive and time consuming. At this paper, a new methodology is presented that allows the fast and reliable detection of copaiba biomarkers using HPTLC retention factor relative to an appropriate standard. Several commercially available substances were analyzed and the monoterpene linalool oxide was chosen. The comparison of relative retention factors allowed the confirmation of caryophyllene and its oxides and the diterpenic acids copalic, hydroxy-copalic, acetoxycopalic, agathic, and hardwickiic. Calibration curve showed strong correlation ($|r| \geq 0.9962$) with $R^2 \geq 0.9928$.

 Keywords: *Copaifera multijuga*; copaiba; quality control; HPTLC; Amazonia.

INTRODUÇÃO

Os óleos de copaíba possuem amplo uso nas indústrias de cosméticos e perfumes devido às suas diversas propriedades biológicas. A denominação adequada desses óleos como oleoresinas implica na abordagem apropriada para sua caracterização química, sendo de fundamental importância para o desenvolvimento de metodologias de controle de qualidade confiáveis, eficientes e de fácil execução.¹ As oleoresinas de copaíba são obtidas diretamente das árvores do gênero *Copaifera* (Fabaceae), sem extração nem solvente. O óleo está presente em diversas estruturas da planta, mesmo nas plântulas, até nas raízes. Flui por canais lizógenos e esquizógenos, escoam e se acumula em bolsões naturais no tronco, formados por alargamentos destes canais. Quando os bolsões ficam muito cheios de óleo, como nas árvores mais antigas, provocam expansões (barrigas) que podem rachar o tronco, por onde a copaíba exsuda naturalmente. Não é raro encontrar animais se esfregando no tronco dessas árvores para curar suas feridas. Para obter quantidades maiores que podem alcançar vários litros, faz-se um furo no tronco da árvore com um trado, uma furadeira manual, até alcançar os bolsões.¹

A composição dos óleos de copaíba, como de outras oleoresinas naturais, é de uma mistura de terpenos de variados pesos moleculares. Os mais leves, líquidos à temperatura ambiente, solubilizam os mais pesados, resinosos. No caso da oleoresina de copaíba, os terpenos leves são sesquiterpenos, principalmente o cariofileno e seus derivados e isômeros, e os pesados são ácidos diterpênicos de esqueletos labdano, clerodano e caurano.¹ São também exemplos de oleoresinas naturais o incenso, a mirra e o breu (Burseraceae), nas quais os terpenos leves são majoritariamente os monoterpênicos^{2,3} e os pesados são triterpenos.^{4,5} Já as oleoresinas de pinheiros e coníferas são constituídas por monoterpênicos (pínicos), cujo produto comercial é a terpentina,⁶ e os pesados são ácidos diterpênicos aromáticos, como os ácidos abietico e pimarico, formando uma mistura comercialmente conhecida como colofone.⁷

Essa composição das oleoresinas é muito pouco comum, comparada às dos demais óleos naturais. As oleoresinas de copaíba recebem diversas denominações (populares e também comerciais) de misturas naturais, como seiva (nutrientes hidrossolúveis), bálsamo (soluções naturais aquosas ricas em derivados de ácidos benzoico e cinâmico) e látex (emulsões de polímeros naturais com metabólitos especiais hidrossolúveis), mas o mais comum é que sejam descritas como óleos fixos, que são aqueles obtidos por prensagem das sementes e constituídos majoritariamente por triglicerídeos e ácidos graxos livres (com pequenas quantidades de carotenos, tocoferóis, fosfolípidios e fito-esteróis).^{8,9} Para os óleos fixos, as metodologias de controle de qualidade empregam índices relacionados aos ácidos graxos (lineares, não terpênicos), suas insaturações e oxidações. Quando os óleos de copaíba são analisados como se fossem óleos fixos, os sesquiterpenos são ignorados e os ácidos diterpênicos acabam sendo titulados como se fossem ácidos graxos.¹⁰ No outro extremo, quando a oleoresina de copaíba é confundida com um óleo essencial (a mistura de substâncias voláteis obtida unicamente por arraste por vapor d'água), analisa-se somente os constituintes leves e voláteis, os sesquiterpenos; sendo ignorada a porção resinosa da copaíba, podendo representar a perda de informação sobre 70-80% de sua composição.¹¹

Há diversas iniciativas para o controle de qualidade dos óleos de copaíba, mas poucas se baseiam em sua composição química completa.¹² Entre sesquiterpenos e diterpenos, β -cariofileno e o ácido copálico correspondem aos marcadores químicos dos óleos de copaíba, uma vez que participam da composição química de todos os óleos já descritos.¹³ A análise somente dos sesquiterpenos é a mais comum, com duas abordagens usuais: relatar o total de substâncias voláteis (oxidadas ou não);¹¹ ou a quantificação do cariofileno e o seu óxido.¹⁴ Já nas análises somente dos diterpenos, as estratégias enfrentam diversos desafios que vão da solubilidade à necessidade de derivatização (esterificação) na cromatografia a gás (GC), a dificuldade de eluição em tempos curtos em fase reversa em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e, principalmente, de obtenção de padrões.¹⁵ Enquanto os sesquiterpenos variam grandemente em quantidade, os ácidos diterpênicos variam também qualitativamente

*e-mail: valdir.veiga@gmail.com

Brazilian Journal of Development

Quantificação do β -cariofileno e óxido de cariofileno para o controle de qualidade dos óleos de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne)/

Quantification of β -caryophyllene and caryophyllene oxide for quality control of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne)

DOI:10.34117/bjdv6n1-043

Recebimento dos originais: 30/11/2019
Aceitação para publicação: 06/01/2020

Milena Campelo Freitas de Lima

Mestre em Química/UFAM
Universidade Federal do Amazonas
Endereço: Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 - Coroado I, Manaus –
Amazonas, CEP: 69067-005
E-mail: mcampelo@ufam.edu.br

Larissa Sousa da Silva

Graduanda em Engenharia Química
Universidade Federal do Amazonas
Endereço: Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 - Coroado I, Manaus –
Amazonas, CEP: 69067-005
E-mail: larisilva@ufam.edu.br

Valdir Florêncio da Veiga Junior

Doutor Ciências/IQ/UFRJ
Instituto Militar de Engenharia
Endereço: Praça General Tibúrcio, 80 - Praia Vermelha - Urca - Rio de Janeiro, CEP: 22290-
270
E-mail: valdir.veiga@gmail.com

Larissa Silveira Moreira Wiedemann

Doutora em Ciências/COPPE/UFRJ
Universidade Federal do Amazonas
Endereço: Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 - Coroado I, Manaus –
Amazonas, CEP: 69067-005
E-mail: larissasm@yahoo.com.br



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research
Vol. 10, Issue, 07, pp. 37776-37781, July, 2020
<https://doi.org/10.37118/ijdr.19216.07.2020>

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

EFFECTS OF CONVECTIVE DRYING IN FIXED BED ON CONTENT AND COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS FROM *Croton cajucara* Benth. AND *Ocimum micranthum* WilldNazareno de P. Braga^{1*}, Valdir F. Veiga Jr², Francisco C. M. Chaves³, Jaisson M. Oka³ and Milena C. F. Lima²¹Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Tecnologia, Av. General Rodrigo Otávio, 6200, CEP69077-000, Manaus-AM, Brazil; ²Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Av. General Rodrigo Otávio, 6200, CEP69077-000, Manaus-AM, Brazil; ³Embrapa Amazônia Ocidental, km 29, AM 010, CEP 69011-970- Manaus-AM, Brazil

ARTICLE INFO

Article History:

Received 17th April, 2020
Received in revised form
11th May, 2020
Accepted 26th June, 2020
Published online 25th July, 2020

Key Words:

Croton cajucara Benth.,
Ocimum micranthum Willd.,
Drying.

*Corresponding author: Nazareno de P. Braga1

ABSTRACT

This study investigated how operating conditions in convective drying in fixed bed influences affects yield and composition of the essential oils of sacaca (*Croton cajucara* Benth) and alfavaca (*Ocimum micranthum* Willd). The essential oil yields were highest (0.48% w/w for sacaca and 4.66% w/w for alfavaca) with 100 g of moist leaves, 0.47 m/s of drying air velocity and 60 °C of drying air temperature. Low temperatures and low loads of wet material (2.19 mol/L) produced the highest content of linalool, a major compound of sacaca essential oil. In contrast, high temperatures and high loads of wet material (8.94 mol/L) produced the highest value of methyl eugenol, a major compound of Amazonian basil essential oil. These results show that linalool (present in sacaca essential oils) is more susceptible to drying operating conditions (drying air temperature and wet material loading) than methyl eugenol (present in alfavaca essential oils).

Copyright © 2020, Nazareno de P. Braga et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Nazareno de P. Braga, Valdir F. Veiga Jr, Francisco C. M. Chaves, Jaisson M. Oka and Milena C. F. Lima. "Effects of convective drying in fixed bed on content and composition of essential oils from *Croton cajucara* Benth. and *Ocimum micranthum* Willd", *International Journal of Development Research*, 10, (07), 37776-37781.

INTRODUCTION

Essential oils are volatile and refractive liquids with a characteristic odor that may be present in several parts of the plant, including leaves, husks and fruits (Andrade and Gomes, 2000). Some plants contain essential oils that are of interest to the food and pharmaceutical industries, which may use them for food flavoring, or as ingredients for cosmetics, perfumes and drugs (Braga, 2002). Some volatile oils are used directly as medicine. Essential oil-rich plants may also be pulverized and used as seasoning (star anise, clove, nutmeg). *Croton cajucara* Benth. (family Euphorbiaceae), also known as sacaca, is a plant species from the Amazon whose essential oil contains linalool, which is used as a fixative for fragrances, and also has anti-inflammatory, analgesic, hypotensive, vasodilator, antinociceptive and antimicrobial activities (Araújo et al., 1971; Peana et al., 2002; Maciel et al., 2006). *Ocimum micranthum* Willd (Lamiaceae family), commonlyknown in the Amazon region and in Brazil as alfavaca, country alfavaca, wild alfavaca, chicken alfavaca, favaquinha and Amazonian basil, is an important source of essential oils that contains phenolic and aromatic antioxidant compounds of value to the food and pharmaceutical industries (Pandey et al., 2014). A predominant compound of alfavaca essential oil is methyl eugenol, used in the cosmetics industry for soap and shampoo production, and also as a flavoring agent for jelly, non-alcoholic drinks, chewing gum and ice creams (Santos, 2011). The drying process stops the enzymatic action that causes degradation of plant active compounds, and thus is a processing step in the production of essential oils from the majority of medicinal, aromatic and seasoning plant species (Corrêa Jr. et al., 2000; Hewrtwig, 1991). Examples are the extraction of essential oils from branches and leaves of long pepper (*Piper hispidinervum* C. DC.), where humidity superior to 30% of wet basis (w.b.) promotes emulsion, hindering the separation of oil and water and resulting in low oil yield (Maia and Silva, 1995); or from lemongrass leaves (*Cymbopogon*

1

A Brief History of Terpenoids

Milena Campelo Freitas de Lima, Larissa Sousa da Silva,
Larissa Silveira Moreira Wiedemann and Valdir F. da Veiga Jr.

CONTENTS

1.1	Terpenoids: General Overview	1
1.2	Sources	2
1.2.1	Natural Sources	2
1.2.1.1	Monoterpenes.....	3
1.2.1.2	Diterpenes	4
1.2.1.3	Triterpenes	6
1.2.2	Synthetic Sources	6
1.3	Milestone in Terpenoids Discovery	7
1.3.1	Gibberellins	7
1.3.2	Sesquiterpene Lactones	8
1.3.3	Forskolin.....	8
1.3.4	Ginkgolides	8
	References.....	13

1.1 Terpenoids: General Overview

Living beings have developed adaptation mechanisms essential for their survival throughout their evolutionary process. In the plant, animal and microorganism species, unique metabolic routes have been developed with the objective of acting in defence and, consequently, they attribute specific characteristics to their species. Substances produced by these routes have been designated as secondary metabolites or, as some authors prefer, special metabolites (Pinto et al. 2002; Simões et al., 1999).

Terpenes are a class of special metabolites, a set of substances capable of acting on behalf of their producing species. The meaning of the term terpene appeared in the nineteenth century, based on studies carried out with the plant *Pistacia terebinthus*, whose resin is termed terebinth or tupertin, a name derived from the German 'Terpentin'. The word terpene was first used by Kékulé in 1866 as a way of generalizing substances from this class (Kung and Yang, 1998; Simões et al., 1999). Subsequently designed as terpenoids (Figure 1.1), the substances from this class have widespread occurrence in the plant, animal and microbial kingdoms. Their distribution is greater in the plant kingdom, where they are generally found in resinous and aromatic plants. They vary in type and quantity between parts of plants such as leaves, bark, twigs, trunk, fruits and seeds. For each part of the plant, the percentage of the composition may vary (da Veiga Jr. and Pinto, 2002; Breitmaier, 2006).

These compounds can also be found in animals, although they are not so common. One of the earliest reports of animal terpenes was in musk oil, obtained from the secretion of the musk deer and beaver. With the abundant use of these oils by the European peoples, these animals began to be in danger of extinction. The advancement of studies in the field of the chemistry of natural products made it possible

Capítulo 6

Destilação & Evaporador Rotatório

Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi
Milena Campelo Freitas de Lima

6.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

As moléculas estão constantemente sofrendo colisões e gerando energias cinéticas que as permitem alterarem seus estados físicos. Existem vários fatores que influenciam tais fenômenos, como a pressão e a temperatura. O processo em que um líquido possui energia cinética suficiente para superar as forças atrativas e transformar-se num gás denomina-se “evaporação”, e é a base para as técnicas de destilação e evaporação rotatória.

Atualmente, esses processos são muito utilizados em laboratórios de química de Produtos Naturais para a purificação de solventes e na obtenção de extratos orgânicos e óleos essenciais. Na indústria, é uma das principais formas de fracionamento de petróleo e derivados, utilizada na purificação de álcool combustível de cana-de-açúcar e na indústria de bebidas, entre muitos outros usos.

Neste capítulo serão apresentados os conceitos e os fundamentos do processo de destilação, as diferentes metodologias, os mecanismos de funcionamento e os equipamentos utilizados. Serão apresentados os principais solventes que são utilizados em um laboratório e os cuidados que são necessários na destilação destes.

Por definição, a destilação é um método utilizado para separação ou purificação de líquidos, baseado em seus respectivos pontos de ebulição e pressão de vapor. Seu processo de separação ou de purificação é explicado pela ideia de que a matéria é formada por partículas que se movimentam e interagem entre si. Consiste em dois fenômenos físicos:

- Vaporização: que é a transformação de um líquido em vapor.
- Condensação: que é a transformação de um vapor em líquido.

Capítulo 12

Derivatização para Cromatografia em Fase Gasosa

Iuri Bezerra de Barros

Milena Campelo Freitas de Lima

12.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A derivatização consiste na modificação estrutural de determinadas classes de substâncias, permitindo a mudança da função orgânica. Ácidos carboxílicos, alcoóis, aldeídos e cetonas são exemplos de funções orgânicas que podem ser convertidas a outras classes de metabólitos, que sejam favoráveis a determinadas análises químicas. As características estruturais das moléculas são responsáveis por muitas das suas propriedades físico-químicas. A solubilidade, a polaridade, o ponto de fusão e ebulição são algumas das propriedades que definem o tipo de caracterização química mais adequada para cada analito.

A cromatografia em fase gasosa (CG) corresponde a uma das técnicas analíticas mais antigas e úteis à caracterização química de produtos naturais. Proporciona análises rápidas, eficientes e reprodutíveis, além de exigir quantidades mínimas da amostra, na escala de ppm, para a realização das análises. É uma técnica com excelente resolução e baixo limite de detecção, permitindo a identificação de dezenas de constituintes numa mesma amostra. É amplamente utilizada para caracterização química de moléculas de baixa polaridade como os óleos essenciais. Ademais, o processo de derivatização das amostras permite a utilização desta técnica para a caracterização química de diversos extratos apolares e óleos fixos, ampliando seu leque de aplicações.

As técnicas cromatográficas são classificadas de acordo com o estado físico das fases móvel e estacionária. A fase móvel é responsável pelo transporte do analito, e através de diversas etapas de equilíbrio entre amostra, fase móvel e fase estacionária, ocorre o processo da separação dos constituintes. Na CG a fase

Capítulo 13

Preparação de Amostras e Padrões para Estudos de Validação

Milena Campelo F. de Lima

Larissa Sousa da Silva

Nathália Lamenha Lopes

13.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A validação de um método analítico consiste em demonstrar a confiabilidade que o mesmo possui para um determinado objetivo. Durante o processo de validação, erros relacionados ao analista, à calibração de equipamentos, a contaminações e ao preparo da amostra (como erros de pesagem, pipetagem e paralaxe) podem ser determinados, corrigidos e amenizados. A validação permite avaliar a confiabilidade de um método desenvolvido para o controle de qualidade de um analito em questão. Um método validado possibilita a padronização e rastreabilidade de diversos analitos, presentes em extratos vegetais, óleos essenciais, fitoterápicos e muitos produtos de relevância comercial.

Para o desenvolvimento de uma metodologia analítica é necessário ter conhecimento das características mais relevantes da amostra, (p. ex.: as classes químicas predominantes), para que assim, o método seja ajustado para cada analito de interesse. As condições que serão utilizadas durante o método, como as condições cromatográficas, dependem das características da amostra e, principalmente, da natureza do analito que se deseja avaliar.

A seleção da amostragem corresponde a uma das etapas primordiais no desenvolvimento de um método analítico, pois todas as etapas subsequentes serão baseadas nesta. A amostragem pode ser realizada de várias maneiras, que dependerão das condições em que as amostras se encontrarem. Podem ser

ANEXOS



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019015537-0 A2



(22) Data do Depósito: 29/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 17/03/2020

(54) **Título:** NANOFORMULAÇÃO DESENVOLVIDA À BASE DE ÓLEO DE COPAÍBA PARA USO TÓPICO EM PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO ASSOCIADO COM LASER

(51) **Int. Cl.:** A61K 9/51.

(71) **Depositante(es):** MARIA APARECIDA MEDEIROS MACIEL.

(72) **Inventor(es):** MELYSSA LIMA DE MEDEIROS; JOHERBSON DEIVID DOS SANTOS PEREIRA; BERNARDO BRUNO DIAS BARACHO; MAGNALDO INÁCIO TAVARES MEDEIROS; IRAMI ARAÚJO FILHO; VALDIR FLORÊNCIO DA VEIGA JUNIOR; **MILENA CAMPELO FREITAS DE LIMA**; RICARDO LUIZ CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JÚNIOR; LIVIA DOS ANJOS TAVARES; WILSON DÉDA GONÇALVES JÚNIOR; JOSÉ HERIBERTO OLIVEIRA DO NASCIMENTO; MARIA APARECIDA MEDEIROS MACIEL.

(57) **Resumo:** NANOFORMULAÇÃO DESENVOLVIDA À BASE DE ÓLEO DE COPAÍBA PARA USO TÓPICO EM PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO ASSOCIADO COM LASER No presente invento, o óleo de copaíba (OCP) das espécies *Copaifera reticulata* Ducke (OCPR), *Copaifera multijuga* Hayne (OCPM), e de uma amostra comercial, foram veiculadas (faixa preferencial 0,5% - 3,0%) em nanoemulsão SNEDDS (self-nanoemulsifying drug delivery system), para uso tópico associado com laser, na terapêutica de reparo tecidual cutâneo. As formulações SNEDDSOCPR, OCPM ou OCP (SNEDDS-OCP) foram preparadas sem co-surfactante, objetivando a redução de ingredientes carreadores que possam ausar reações adversas. SNEDDS-OCP contém óleo de copaíba em mistura com óleo de girassol (1:1) e um surfactante de uso farmacológico (faixa preferencial 7% - 25%), dispersos em meio aquoso neutro. As formulações SNEDDS-OCP foram avaliadas em rocedimentos in vivo (*Rattus norvegicus albinus*) para cicatrização de feridas. Análises histopatológicas e imunohistoquímicas foram realizadas após 7 e 14 dias e mostraram redução de neutrófilos e linfócitos, bem como aumento da colagênese, proliferação de fibroblastos e maior espessamento epitelial. Os resultados farmacológicos mostraram resposta antiinflamatória, cicatrizante e antiséptica, via uso tópico, bem como efeito antinociceptivo, via administração oral. Comparativamente, as formulações SNEDDS-OCP foram mais eficazes no processo associado com laser, no reparo tecidual cutâneo.

