

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**SUZANE OLIVEIRA ALENCAR LEÃO**

**PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS DE  
INDÚSTRIAS DE OLEORRESINAS AMAZÔNICAS**



MANAUS

2023

SUZANE OLIVEIRA ALENCAR LEÃO

**PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS DE  
INDÚSTRIAS DE OLEORRESINAS AMAZÔNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Valdir Florencio da Veiga Junior

MANAUS

## Ficha Catalográfica

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

L437p Leão, Suzane Oliveira Alencar  
Perfil Químico e Potencial Biotecnológico de Resíduos de  
Indústrias de Oleorresinas Amazônicas / Suzane Oliveira Alencar  
Leão . 2023  
78 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Junior  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal  
do Amazonas.

1. Resíduos. 2. Composição química . 3. Cromatografia . 4.  
Propriedades biológicas . I. Veiga Junior, Valdir Florêncio da. II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

2023

Ao meu falecido pai, **Josleão**, à minha querida mãe **Suzane**, aos meus irmãos **Jorge**, **Felipe** e **Leonardo**, por serem a minha base, apoio e motivação.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a **Deus**, que diariamente me fortalece para permanecer e continuar mediante todos os obstáculos, e a **Nossa Senhora da Conceição**, por toda proteção concedida a mim por teu manto.

À minha mãe **Suzane** e melhor amiga, a quem dedico todas as minhas conquistas, que nunca mediu esforços para me apoiar e auxiliar com tudo ao seu alcance para que eu conquistasse os meus objetivos. Mãe, saiba que não existem palavras para expressar a minha gratidão, admiração e amor por você. Amo-te eternamente!

Aos meus irmãos **Jorge, Felipe e Leonardo**, meus companheiros de vida, meus corações fora do peito, meu laço e ligação eterna. Saibam que todas as vitórias são nossas e que nunca medirei esforços para auxiliá-los em todas as fases da vida. À minha cunhada **Tassia**, irmã de coração e companheira dessa e outras trajetórias, sua amizade, seu apoio e seu alto astral me inspiram. Amo vocês.

À minha amiga e irmã **Laura**, que acompanhou os dias de crise e de alegria, seja ao meu lado ou em videochamada. Nossa amizade é para além da vida!

Aos meus amigos **Elizabeth e Tiago**, que nunca mediram esforços para me apoiar e me acolher em suas vidas e em sua residência, que estiveram ao meu lado durante as crises. Com seus conselhos, abraços e apoio, fizeram-me ter forças para continuar. Os carregarei para sempre com muito carinho e gratidão por tudo.

Às minhas colegas de laboratório **Josi, Tainá e Rayssa**, e, seguindo a tradição de ser acolhida por um casal de amigos, à **Bruna e Vicente**, por toda acolhida enquanto estive no Rio de Janeiro. Vocês tornaram a minha estadia mais leve e menos conturbada, mesmo diante das dificuldades, com as nossas conversas, conselhos, risos, viagens e até festinhas. Meu percurso até aqui foi construído com a ajuda e carinho de todos vocês.

À minha colega e amiga **Suiane**, a quem carinhosamente chamo de Sui, por todo apoio nessa trajetória antes mesmo de sermos aprovadas no processo seletivo. Saiba que você é uma pessoa abençoada e a quem sou muito grata.

Ao meu orientador **Valdir Florêncio**, pelo apoio e confiança no meu trabalho para dedicação exclusiva a esse projeto.

A todos os meus colegas e amigos do grupo de pesquisa ABC-NP.

Aos professores da seção de química e ao Instituto Militar de Engenharia – IME, por todo o acolhimento e conhecimento para o desenvolvimento da pesquisa.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM, pelos ensinamentos repassados.

Ao Laboratório de Química e Biomoléculas da Amazônia – Qbioma.

Ao Laboratório de cromatografia e espectrometria – LABCEM da central analítica da UFAM.

À plataforma de bioensaios biotecnológicos da Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane.

À CNPQ, pela concessão da bolsa de pesquisa de mestrado para conclusão desse projeto.

## RESUMO

As oleorresinas são substâncias exsudadas por diferentes espécies vegetais, como as dos gêneros *Copaifera* e *Protium*, aos quais diversas propriedades biológicas são atribuídas. Uma fração contendo óleo essencial é destilada para uso da indústria farmacêutica, enquanto a fração resinosa não possui direcionamento sustentável, sendo descartada no ambiente externo em que é extraída. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar a composição química dos resíduos de *Protium* e copaíba, a citotoxicidade, atividade enzimática e atividade antimicrobiana frente às cepas Gram-positivas e Gram-negativas. Para isso, foi realizada a cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM), para avaliar a composição química da oleorresina, a atividade citotóxica *in vitro*, utilizando células da linhagem MRC5 e linhagem tumoral HEPG2. A atividade enzimática dos resíduos foi testada para  $\alpha$ -glicosidase e lipase. A atividade microbiológica por difusão em poço e microdiluição em placas. Os resultados obtidos mostraram que os monoterpenos como p-cimeno presentes no gênero *Protium* e sesquiterpenos comuns em *copaifera* como o  $\beta$ -cariofileno estiveram nos resíduos, assim como substâncias oxidadas e degradadas. Para o resíduo de copaíba, também foi identificado ácido graxo metil linoleato, que não é o constituinte típico desse gênero. A atividade enzimática de  $\alpha$ -glicosidase foi comparada à acarbose e antilipase, à orlistat. Nenhum resíduo apresentou inibição enzimática. Um halo de inibição bacteriana foi apresentado pelo resíduo de copaíba à cepa de *S. mutans*. Os resultados obtidos indicaram a presença de diluentes adulterantes como ácido linoléico no resíduo de copaíba, além de atividades promissoras de citotoxicidade do resíduo de copaíba para as linhagens de MRC5 e do resíduo de *Protium* para a linhagem tumoral de HEPG2. Baixa inibição bacteriana foi observada para os resíduos contra as cepas avaliadas. Os resultados reforçam a importância de agregar valor econômico ao resíduo, com potencial para outras atividades.

**Palavras-chave:** Composição química; resíduos; propriedades biológicas.

## ABSTRACT

Oleoresins are substances exuded by different plant species, such as the genera *Copaifera* and *Protium*, to which various biological properties are attributed. A fraction containing essential oil is distilled for use in the pharmaceutical industry, while the resinous fraction does not have a sustainable direction, being discarded in the external environment in which it is extracted. Therefore, the objective of this work was to evaluate the chemical composition of *Protium* and *copaiba* residues, cytotoxicity, enzymatic activity and antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative strains. To this end, Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS) was performed to evaluate the chemical composition of the oleoresin and the *in vitro* cytotoxic activity using cells from the MRC5 lineage and the HEPG2 tumor lineage. The enzymatic activity of the residues was tested for  $\alpha$ -glucosidase and lipase. Microbiological activity by diffusion in wells and microdilution in plates. The results found demonstrated that monoterpenes such as p-cymene present in the *Protium* genus and sesquiterpenes common in *copaifera* such as  $\beta$ -caryophyllene were deposited in waste, as well as oxidized and degraded substances. For the dispersion of *copaiba*, methyl linoleate fatty acid was also identified, which is not the typical constituent of this genus. The enzymatic activity of  $\alpha$ -glucosidase was compared to acarbose and antilipase compared to orlistat. No highlights were presented with enzymatic changes. A halo of bacterial inhibition was presented by the extinction of *copaiba* for the *S. mutans* strain. The results obtained indicated the presence of adulterant diluents such as linoleic acid in *copaiba* extinction, in addition to promising cytotoxic activities of *copaiba* deletion for the MRC5 lineage and *Protium* extinction for the HEPG2 tumor lineage. Low antibacterial antibody was observed for residues against the evaluated strains. The results reinforce the importance of adding economic value to extinction, with potential for other activities.

**Keywords:** Chemical composition; residues; biological properties.

## ILUSTRAÇÕES

**Figura 1:** Dados da produção do óleo essencial de copaíba no Brasil entre os anos de 2016 e 2021.

**Figura 2:** Fluxograma do processo de extração por arraste a vapor.

**Figura 3:** Incisão no tronco da árvore de copaíba para extração da oleorresina.

**Figura 4:** Principais sesquiterpenos identificados no óleo essencial de copaíba.

**Figura 5:** Estereoquímica dos esqueletos diterpênicos: caurano, clerodano e labdano.

**Figura 6:** Resina exsudada do tronco da árvore de *Protium*.

**Figura 7:** Estruturas dos triterpenos dos tipos ursano e oleanano identificados em oleorresinas da família Burseraceae.

**Figura 8:** Componentes de um analisador de cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas.

**Figura 9:** Análises realizadas para a caracterização química dos resíduos por CG-EM.

**Figura 10:** Perfil CG-EM da amostra esterificada do resíduo industrial de copaíba pelas condições do padrão de hidrocarbonetos.

**Figura 11:** Perfil cromatográfico do resíduo industrial de copaíba obtido pelas condições abrangentes do CG-EM.

**Figura 12:** Espectro de massas do ácido graxo metil lineloato obtido do resíduo de copaíba.

**Figura 13:** Regiões de eluição da composição volátil e triterpênica do resíduo de *Protium* nas condições de maior abrangência do CG-EM.

**Figura 14:** Perfil cromatográfico obtido a partir das condições do padrão de alcanos com ampliação do espectro de massa do p-Cimeno.

**Figura 15:** Citotoxicidade dos resíduos da extração do OE de *Protium* e Copaíba frente à linhagem celular de fibroblastos MRC-5 avaliados em 24h (gráfico A), 48h (gráfico B) e 72h (gráfico C).

**Figura 16:** Curva de crescimento do resíduo de *protium* nas concentrações de 1,5625-100 µg/mL.

**Figura 17:** Citotoxicidade do resíduo de *Protium* (Gráfico A) e do resíduo de Copaíba (Gráfico B) contra a linhagem celular HEPG2.

**Figura 18:** Atividade antibacteriana das amostras RICO01 (copaíba) e RIBR02 (*Protium*) pelo método de difusão ágar. *Proteus* (40), *P. aeruginosa* (48), *S. aureus* (87), *S. sumulans* (94) e MRSA (97).

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Composição química presente no extrato residual de *Copaifera* (padrão de hidrocarbonetos).

**Tabela 2:** Composição química presente no extrato residual de *Copaifera*.

**Tabela 3:** Composição química presente no extrato residual de *Protium*

**Tabela 4:** Composição volátil presente no extrato residual de *Protium*.

**Tabela 5:** Atividade inibitória da lipase pancreática dos resíduos de copaíba e *Protium*

**Tabela 6:** Atividade inibitória da  $\alpha$ -glicosidase dos resíduos de copaíba e *Protium*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**OE**s – Óleos essenciais

**PN**s – Produtos Naturais

**CCD** – Cromatografia em camada delgada

**CG** – Cromatografia gasosa

**EM** – Espectrômetro de massas

**NIST** – Biblioteca de espectro de massas

**RIC** – Resíduo industrial de copaíba

**RIB** – Resíduo industrial de breu

**FE** – Fase estacionária

**FM** – Fase móvel

**TMSH** - Trimetilsilildiazometano

**DMEM** -Meio Eagle Modificado por Dulbecco

**BHI** – Infusão de cérebro e coração

**ATCC** - Cepas da coleção de Microrganismos Norte Americana

**CIM** - Concentração Inibitória Mínima

**FDA** – Administração de alimentos e medicamentos

**CLSI** – Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

**FIOCRUZ (ILMD)** - Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane

**IDESAM** – Instituto de Desenvolvimento da Amazônia

**PNRS** - Política Nacional de Resíduos Sólidos

**P&D** - Pesquisa e Desenvolvimento

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**OCDE** – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

**CONAMA** – Conselho Nacional do Meio Ambiente

**SIDRA** – Sistema IBGE de Recuperação Automática

**PEVS** - Produção de Extração Vegetal e Silvicultura

**LRI** – Índice de retenção linear

**CAS** – Serviço de resumo de números de referência químico

## SÍMBOLOS

**μl** – Microlitros

**β** – Beta

**α** – Alfa

**δ** - Gama

**λ** – Comprimento de Onda

**%** - Porcentagem

**°C** – Graus Celsius

**T** – Toneladas

**m/z** – Massa/carga

**cm** – Centímetros

**nm**– Nanômetros

**mL**– Mililitros

**eV** - Eletrovolts

## SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO.....	15
1.1OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Geral.....	16
1.1.2Específicos.....	16
2REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS E O MEIO AMBIENTE.....	17
2.1.1 O mercado de óleos essenciais (OEs) e a produção de resíduos.....	17
2.1.2 Impacto ambiental e a biodiversidade amazônica.....	20
2.1.3 Bioeconomia e a Química verde.....	21
2.2O GÊNERO <i>COPAIFERA</i> .....	22
2.2.1 Características gerais.....	22
2.2.2 Composição química e atividade biológica da oleorresina de copaíba.....	24
2.3O GÊNERO <i>PROTIUM</i> .....	26
2.3.1 A família Burseraceae.....	26
2.3.2 Perfil químico e farmacológico.....	27
2.4 PRODUTOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.....	29
2.5BIOATIVIDADE DE PRODUTOS NATURAIS.....	29
2.5.1 Atividade Citotóxica.....	29
2.5.2 Inibidores de Lipase pancreática.....	30
2.5.3 Inibidores de Alfa-glicosidase.....	30
2.5.4 Atividade Antimicrobiana.....	31
2.6TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS.....	31
3METODOLOGIA.....	33
3.1 OBTENÇÃO DOS RESÍDUOS.....	33

3.1.1 Resíduo da oleorresina de Copaíba.....	33
3.1.2 Resíduo da oleorresina de <i>Protium</i> .....	33
3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	33
3.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	33
3.2.2 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).....	34
3.2.3 Parâmetros CG-EM (Hidrocarbonetos).....	35
3.2.4 Parâmetros CG-EM (Copaíba).....	35
3.2.5 Parâmetros CG-EM (Breu).....	35
3.2.6 Derivatização do RIC.....	35
3.2.7 Determinação do índice de retenção linear (IRL).....	36
3.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	36
3.3.1 Atividade citotóxica.....	36
3.3.1.1 Cultivo celular.....	36
3.3.1.2 Ensaio <i>in vitro</i> com células MRC-5 e HEPG2.....	37
3.3.2 Atividade enzimática $\alpha$ -glicosidase.....	37
3.3.3 Atividade enzimática Lipase.....	37
3.3.4 Atividade antimicrobiana.....	38
3.3.5 Padronização dos inóculos.....	38
3.3.5.1 Teste de difusão em ágar.....	38
3.4 Análise estatística.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Perfil químico do resíduo de Copaíba.....	39

4.2	Perfil químico do resíduo de <i>Protium</i> .....	48
4.3	Atividade citotóxica (MRC-5).....	51
4.4	Atividade citotóxica (HEPG2).....	54
4.5	Atividade enzimática.....	56
4.5.1	$\alpha$ -glicosidase.....	56
4.5.2	Lipase.....	57
4.5.3	Atividade antimicrobiana.....	58
	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	64

## INTRODUÇÃO

A biodiversidade vegetal que compõe a flora brasileira tem grande potencial para o desenvolvimento tecnológico de novos medicamentos, entretanto não existem muitos medicamentos fitoterápicos elaborados a partir de plantas medicinais brasileiras registrados na Agência Anvisa (HASENCLEVER *et al.*, 2017). Em 2011, foram registrados 382 fitoterápicos, obtidos de 98 espécies vegetais, sendo que a maioria desses medicamentos provém de espécies exóticas e de amplo uso mundial; apenas 26% dessas espécies são das Américas (PERFEITO, 2012).

É fundamental ressaltar que o Ministério da Saúde brasileiro tem trabalhado para incentivar a integração de práticas de cuidados complementares ao Sistema Único de Saúde (SUS) nos últimos anos. Ressalta-se que a Política Nacional de Plantas Medicinais e Suplementos Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006a) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (BRASIL, 2006b) foram implementadas. Essas políticas visam aumentar o acesso às práticas complementares e às plantas medicinais para cuidados em saúde mais seguros e eficazes.

Os óleos essenciais (OE) são obtidos de uma variedade de plantas aromáticas aos quais diversos estudos têm atribuído bioatividade aos extratos e às substâncias isoladas. Os tipos e quantidades de constituintes presentes nos óleos podem ser extraídos de diversas partes da planta, incluindo flores, sementes, folhas, raízes e cascas (BURT, 2004). São compostos, majoritariamente, por mono e sesquiterpenos, bem como fenilpropanóides, que lhes conferem as características organolépticas. O método de extração é um dos principais fatores que determinam a qualidade dos óleos essenciais.

Segundo dados divulgados pelo Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas-SEBRAE, a produção de óleos essenciais é de aproximadamente 45 mil toneladas, avaliadas em US\$ 700 milhões, sendo a produção nacional equivalente a 13,5% do total, tornando o Brasil o quarto maior exportador (SEBRAE, 2022).

Somente em 2020, foram produzidos 163 toneladas de óleo de copaíba. A copaíba é uma espécie nativa da Amazônia, cujo óleo tem significativa importância comercial, especialmente, por suas propriedades terapêuticas utilizadas na medicina popular, como anti-inflamatório, cicatrizante, antimicrobiana, antisséptico e antitumoral (PIERI *et al.*, 2009). Não constam os dados de produção/exportação do óleo essencial de *Protium* no sistema de recuperação automática (SIDRA).

Os indivíduos da família Burseraceae também exsudam uma oleorresina do tronco das árvores. Com aproximadamente 700 espécies agrupadas em 19 gêneros, a oleorresina do breu, nome popular dado às espécies que pertencem ao gênero *Protium*, também são amplamente usadas na medicina popular por possuírem atividades como analgésico, cicatrizante e expectorante, além da indústria de verniz, na calafetagem de embarcações e em rituais religiosos (SUSSUNAGA, 1995; RIBERIRO *et al.* 1999).

Os OE são extraídos de plantas, em sua maioria, pela técnica de arrastar a vapor, bem como pela prensagem do pericarpo de frutas cítricas. Por ser um método simples e barato, dominam o mercado de exportação no Brasil, mas geram grandes quantidades de resíduos (BIZZO *et al.*, 2009; SANGTHONG, *et al.*, 2022). Os subprodutos deste processamento podem ser utilizados de diferentes formas, como adubo (compostagem), herbicida ou pesticida (CABRERA *et al.*, 2010), óleo residual, extração de componentes orgânicos como enzimas e de outros. É necessário estudar alternativas mais nobres para aplicação ou reuso desses resíduos sendo de extrema importância a busca de permanentes pontos de equilíbrio entre diferentes dimensões: produção e meio ambiente (COSTABEBER e MOYANO, 2000; SÁNCHEZ, 2008).

A caracterização permite identificar os constituintes químicos típicos dos gêneros, os possíveis contaminantes adicionados e substâncias formadas a partir da degradação térmica durante o processo de destilação. Como alternativa de reaproveitamento, as análises biotecnológicas permitem avaliar e possivelmente atribuir valor econômico à biomassa residual resinosa gerada pela indústria a partir da destilação dos óleos essenciais e das oleorresinas de espécies do gênero *Copaifera* e *Protium*.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Geral

- Determinar a composição química dos resíduos industriais da extração dos óleos essenciais de *Copaíba* ssp. e *Protium* ssp. e avaliar as propriedades biotecnológicas.

### 1.1.2 Específicos

- Analisar a constituição química dos resíduos da oleorresina de *Copaifera* ssp. e *Protium* ssp. por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM);
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* frente às linhagens não tumorais (MRC-5) e tumorais (HEPG-2) dos resíduos pelo método Alamar Blue;
- Avaliar atividade de inibição enzimática dos resíduos para  $\alpha$ -glicosidase e lipase;
- Determinar a atividade antibacteriana *in vitro* para as cepas dos gêneros *Acinetobacter* ssp., *Pseudomonas* ssp., *Escherichia* ssp., *Salmonella* ssp., *Enterococcus*, *Streptococcus* ssp. e *Staphylococcus* ssp. através da técnica de difusão em poço emicrodiluição em placas de 96 poços.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS E O MEIO AMBIENTE

#### 2.1.1 O mercado de óleos essenciais (OEs) e a produção de resíduos

O Brasil tem um importante papel na cadeia de produção e comercialização de óleos essenciais (OEs), ofertando esse tipo de insumo ao mercado internacional há quase 100 anos (BIZZO e REZENDE, 2009). Informações sobre o mercado internacional são difíceis de obter. Uma fonte gratuita e bem detalhada é a Comtrade Database, mantida pela ONU. O Trade Map, do International Trade Center (ITC) é outra fonte de acesso livre. No Brasil, informações sobre importação e exportação de OE estão disponíveis na base ComexStat, do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços (BIZZO e REZENDE, 2022). Essas bases mencionadas tratam de comércio internacional, vale dizer, não levam em conta os volumes de produção e os mercados internos.

Em 2022, o mercado internacional de OE foi avaliado em US\$ 8,8 bilhões em 2022 e deve chegar a US\$ 15,3 bilhões em 2027, com uma taxa de crescimento de 11,8% de 2022 a 2027. Os dados destacam o potencial de crescimento da indústria de óleos essenciais nos próximos anos. Esses dados, entretanto, consideram todos os itens da posição 3301 do SH, o que inclui os óleos essenciais e resinóides, oleorresinas de extração, soluções concentradas de óleos essenciais em gorduras, em óleos fixos, em ceras ou em

matérias análogas, obtidas por tratamento de flores através de substâncias gordas ou por maceração; subprodutos terpênicos residuais da desterpenação dos óleos essenciais; águas destiladas aromáticas soluções aquosas de óleos essenciais (BIZZO e REZENDE, 2022).



Figura 1: Dados da produção do óleo essencial de copaíba no Brasil entre os anos de 2016 e 2021.

Dados da Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura mostram que, no ano de 2016 a 2021, foram produzidas 993 toneladas do óleo essencial de copaíba (Figura 1). Segundo Pinto (2010), a resina dissolvida no óleo corresponde entre 10% e 40% do volume do oleoresina *in natura*, permitindo inferir que uma grande quantidade de resíduos da extração do OE de copaíba é despejada anualmente. No Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA, não foram encontrados dados acerca da produção e exportação do OE de breu.

O processo de destilação por arraste a vapor (Figura 2) é um dos mais utilizados em escala industrial por ser um método simples e barato quando comparado com os métodos tecnológicos mais avançados. Este método consiste em passar vapor d'água superaquecido em temperatura próxima a 100°C pelo material vegetal, que permite a extração do óleo através do rompimento das células odoríferas da planta. O OE em contato com o vapor é direcionado para a parte superior do extrator até o condensador. Isso é causado por uma diferença de pressão entre a entrada do vapor no extrator e o bocal de saída do produto no condensador. Do bocal de saída do condensador, a água e o OE são conduzidos por gravidade ao vaso de decantação/separação, chamado de vaso florentino, onde ocorre a separação em duas fases líquidas. A fase aquosa, contendo óleo essencial dissolvido, é denominada de hidrolato (CASSEL e VARGAS, 2008; CASSEL *et al.*, 2009; LUCAS, 2011).

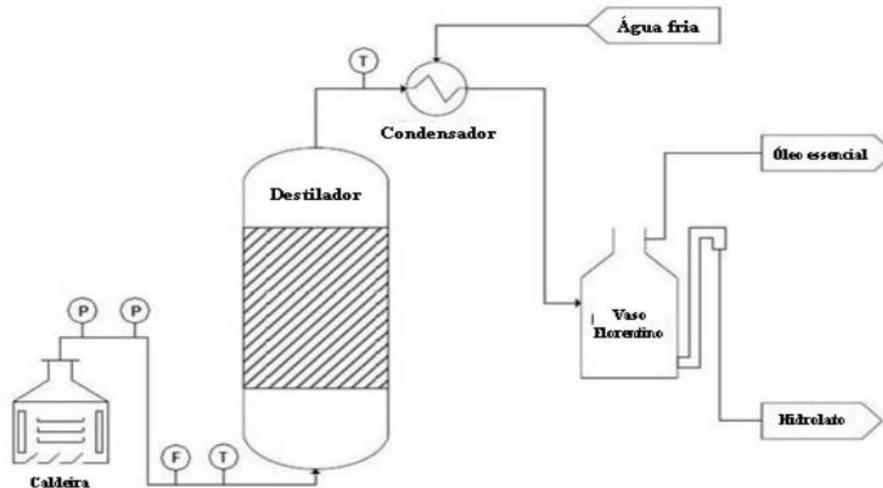


Figura 2: Fluxograma do processo de extração por arraste a vapor.  
 Fonte: TORRES, 2010 (adaptado).

Os métodos tradicionais de extração, como de arraste a vapor, apresentam algumas desvantagens e limitações. Os constituintes dos óleos essenciais podem sofrer degradação térmica ou, posteriormente, hidrólise, o que pode afetar o aroma do extrato e prejudicar a reprodução das fragrâncias características das plantas aromáticas. O uso de solventes tóxicos é uma limitação no caso de processos que extraem materiais utilizando solventes orgânicos, uma vez que os óleos essenciais são utilizados em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. Além disso, após a extração dos OEs, os processos de remoção de solventes geram custos energéticos ao processo e possibilidade de perda dos compostos voláteis. Além disso, a extração completa do solvente é dificultosa (BANDONI, 2000).

Após a extração do hidrolato, a fração resinosa com menor concentração de OEs é comumente descartada no solo do mesmo local de extração do OE, sendo um resíduo considerado rejeito. Atribuído a diferentes naturezas, os resíduos estão entre as questões mais abordadas no que se refere às problemáticas ambientais. A Lei nº 12.305 foi um marco regulatório para um novo conceito de resíduo e foi promulgada em 2010 com a urgência de uma nova perspectiva sobre o assunto (BRASIL, 2010).

A Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) trata do gerenciamento adequado de resíduos, dispondo sobre os princípios, objetivos e os instrumentos, no qual define os resíduos industriais como aqueles gerados nos processos produtivos de instalações industriais, determinando à obrigação dos geradores em buscar a destinação final ambiental correta dos resíduos (PNRS, 2022). O dispositivo legal exige uma compreensão diferente do que é resíduo, pois as sobras deixam de ser definidas como resíduos, ou geradores de

problemas e passam a desempenhar um novo papel na sociedade como subprodutos que podem ser utilizados como matérias-primas em novos processos sem maiores efeitos negativos sobre o meio ambiente (BRASIL, 2010).

### 2.1.2 Impacto ambiental e a biodiversidade amazônica

A resolução CONAMA nº 01 (1986) define impacto ambiental como qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente, afetam:

- I- A saúde, a segurança e o bem-estar da população;
- II- As atividades sociais e econômicas;
- III- A biota;
- IV- As condições estéticas e sanitárias do meio ambiente;
- V- A qualidade dos recursos ambientais.

Os efeitos sobre o meio ambiente são, por definição, todas as mudanças que podem ser feitas no meio ambiente como resultado de operações da empresa. O descarte inadequado de resíduos oriundos do processamento industrial pode resultar na destruição de habitats, extinção de espécies, erosões, poluição e mudanças climáticas (BRASIL, 1988).

O aproveitamento adequado dos resíduos como matéria prima secundária deve envolver o conhecimento dos processos que os originam, das unidades de geração, da caracterização completa, da identificação do potencial de aproveitamento, apontamento das características limitantes do uso e da aplicação e em especial das necessidades de gerenciamento e beneficiamento (ROCHA e CHERIAF, 2003).

Pela sua megadiversidade, o Brasil desperta crescente interesse de vários setores pelos recursos biológicos do país, para fazer bioprospecção. Essa diversidade oferece ao Brasil condições estratégicas para participar de maneira mais efetiva dos mercados nacional e internacional de bioprodutos inovadores (GUIMARÃES VASCONCELLOS, 2011). Estudos com foco no valor econômico permitem entender e quantificar o custo de manutenção e conservação dessa diversidade biológica e, ao mesmo tempo, avaliar as oportunidades de sua exploração sustentável para a economia (SACCARO JUNIOR, 2013).

O patrimônio genético e a diversidade biológica servem como um atrativo para os investidores. A disponibilidade dos recursos naturais tem um valor econômico e estratégico incalculável em diversos campos, mas seu maior potencial está no desenvolvimento de novos fármacos. A informação pode ser confirmada quando se observa o número de medicamentos obtidos direta ou indiretamente de produtos naturais (PANDELEY, 1998; CRAGG, 1997; VERPOORTE, 1998; SHU, 1998; HARVEY, 2000; DE SMET, 1997). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. Somente no período entre 1983-1994, das 520 novas drogas aprovadas pela agência americana de controle de medicamentos e alimentos (FDA), 220 (39%) foram desenvolvidas a partir de produtos naturais (CRAGG, 1997; SHU, 1998).

Embora apenas cerca de 10% da biodiversidade mundial tenha sido estudada, 140 mil metabólitos especializados oriundos, sobretudo de plantas e de microrganismos, foram isolados e caracterizados, mas ainda não foram avaliados biologicamente (VERPOORTE, 1998). Na Amazônia, onde existem variadas espécies, muitas ainda não foram identificadas ou seus usos tradicionais registrados (OLIVEIRA *et al.*, 2007), abrindo precedentes para a descoberta de novas moléculas bioativas.

### 2.1.3 Bioeconomia e a Química verde

O conceito de bioeconomia preconizado por Georgescu-Roegen (1971) reconhece a importância do processo tecnológico voltado para a descoberta de novas fontes de energia e como a natureza atua como limitante do processo econômico. Segundo o autor, uma tecnologia só seria viável se pudesse ser mantida sem reduzir a oferta de recursos não renováveis (DIAS e CARVALHO, 2017). Países desenvolvidos como os Estados Unidos aplicam a bioeconomia (ADMINISTRAÇÃO OBAMA, 2012), destacando o incentivo aos biocombustíveis, plásticos biodegradáveis, biomassas renováveis, biotecnologia industrial, bioinformática, bioinvenções, engenharia molecular, bioquímica e biomedicina, bem como outros termos que seguem o prefixo "bio" e denotam vida e qualquer coisa ligada aos seres vivos. Nesse sentido, percebe-se que o futuro depende da união de todos os avanços científicos e tecnológicos com os processos biológicos.

Ao longo das últimas quatro décadas, uma perspectiva completamente nova sobre o papel da bioeconomia emergiu como resultado de inovações que estão relacionadas ao uso de produtos e processos biológicos nas áreas de saúde humana, da produtividade agrícola e

da pecuária, bem como a biotecnologia. Em particular, os grandes avanços científicos no ramo da biotecnologia têm sido responsáveis por melhorar a eficiência ambiental da produção primária, processamento industrial e até recuperar ecossistemas degradados.

A Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) é um importante documento internacional sobre o assunto que visa a preservação da biodiversidade através do uso sustentável dos recursos naturais e pela equitativa distribuição dos seus benefícios. Mesmo com a introdução da Lei da Biodiversidade (nº 13.123/2015), o arcabouço legislativo brasileiro que rege o acesso aos recursos genéticos tem se mostrado insuficiente para evitar a exploração predatória bem como a apropriação e monopolização da natureza e do seu conhecimento tradicional para ganhos comerciais. O desenvolvimento de um plano nacional brasileiro sobre bioeconomia e biotecnologia seria ideal para regulamentar essas áreas (BARBA e SANTOS, 2020).

É preciso integrar essas tecnologias para torná-las mais verdes e eficientes. Para tanto, os processos biotecnológicos dependem de inúmeras frentes multidisciplinares de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) da Química Verde, tais como: a intensificação dos processos, a biologia sintética e molecular, solventes verdes, síntese orgânica, matérias-primas de base biológica/renováveis, toxicologia, engenharia genética, polímeros, ferramentas experimentais, analíticas. A biotecnologia juntamente com outros setores da ciência e saúde vem avançando no descobrimento de medicamentos, tratamentos e vacinas específicas para cada tipo de doenças. A produção de fármacos e biofármacos movimentam uma expressiva parcela da economia mundial, com altos rendimentos para as empresas desse setor.

## 2.2 O GÊNERO *COPAIFERA*

### 2.2.1 Características gerais

O gênero *Copaifera* pertence à família Leguminosae Juss., subfamília Caesalpinoideae Kunth. As copaíbas ou copaibeiras (do tupi cupa-yba, que significa “árvore com depósito”), como são popularmente chamadas as espécies desse gênero, que se encontram distribuídas na África e em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul principalmente na Venezuela, Guianas, Colômbia e Brasil (VEIGA JUNIOR e PINTO, 2002).

As copaíbas são arbustos ou árvores de crescimento lento, podendo atingir até 40 m de altura, com tronco rugoso e escuro de até 4 m de diâmetro. Essas plantas possuem casca aromática, folhagem densa, flores pequenas e frutos secos do tipo vagem. As sementes são de cor preta, ovóides com um arilo amarelo rico em lipídeos (RIGAMONTE-AZEVEDO, 2004).

Do tronco da árvore, é exsudada uma substância resinosa, denominada de oleorresina, que recebe essa denominação por ser uma mistura do óleo com uma fração resinosa não volátil cuja coloração varia do amarelo ao marrom (VEIGA JUNIOR e PINTO, 2002; PIERI *et al.*, 2009), que provém de canais axiais do tipo esquizógenos os quais são formados a partir do afastamento de células parenquimáticas que criam espaços intercelulares (meatos) ou lúmen dentro do qual a resina é secretada. Esses ductos estão localizados em círculos concêntricos que podem delinear o crescimento sazonal da planta. A oleorresina também pode acumular-se em cavidades formadas pela decomposição de células secretoras. Essas cavidades podem se conectar e se ampliar no tronco para acumular litros de óleo (PLOWDEN, 2003).

A produção de óleo de copaíba por árvore varia de 100 mililitros a 60 litros por ano (SHANLEY *et al.*, 1998). No entanto, nem todas as árvores produzem, podendo variar de acordo com a sazonalidade e tipo de solo. Um estudo mostrou que, no Amazonas, nos solos arenosos, 75% das árvores produzem, enquanto nos solos argilosos, a produção atinge apenas 45%. Dados do Acre mostraram que, de 62 árvores, 41% produziram na primeira extração, enquanto na segunda extração, a produção atingiu 72%, com maior produtividade na terra firme (ALENCAR, 1982).



Figura 3: Incisão no tronco da árvore de copaíba para extração da oleorresina.

A extração da oleorresina de copaíba acontece através de uma incisão feita com trado no tronco da árvore, cerca de 1,0 a 1,5 m de altura do solo. Após, é inserido um cano por onde escoar a oleorresina. Em alguns casos, após a extração, é peneirada para a retirada de impurezas grosseiras e filtrada para a retirada de impurezas mais finas. Para a extração do óleo essencial, a oleorresina passa pelo processo de destilação (PINTO *et al.*, 2010).

### 2.2.2 Composição química e atividade biológica da oleorresina de copaíba

De acordo com Leandro e colaboradores (2012) foram descritos, até o momento, 110 sesquiterpenos e 42 diterpenos em oleorresinas de copaíba. Os sesquiterpenos são a classe com maior concentração, podendo chegar a compor 90% das oleorresinas. Dentre os principais sesquiterpenos em oleorresinas de copaíba, destacam-se:  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -cadinol,  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -selineno,  $\beta$ -selineno,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -elemeno, trans- $\alpha$ -bergamoteno e  $\beta$ -bisaboleno (Figura 4).

Quando avaliados isoladamente, diversas atividades biológicas foram atribuídas aos sesquiterpenos. Para o  $\beta$ -cariofileno, foram descritas as atividades anticarcinogênica e anti-inflamatória, antifúngica, anticonvulsivante, inseticida e antioxidante (CHAVAN, WAKTE, SHINDE, 2010; CHENG *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006; NARARAK *et al.*, 2020; FLORES-SOTO *et al.*, 2020). Para o  $\alpha$ -cadinol são descritas atividades inseticidas contra larvas de mosquito da febre amarela, antitérmica e antifúngica (CHANG *et al.*, 2000; CHENG *et al.*, 2004; HE *et al.*, 1997). O sesquiterpeno  $\beta$ -elemeno apresentou atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais de câncer gástrico, do pulmão, laringe, ovário, cérebro, próstata e leucemia (LI *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011; TAO *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2011; ZOU, LIU, YU, 2001).

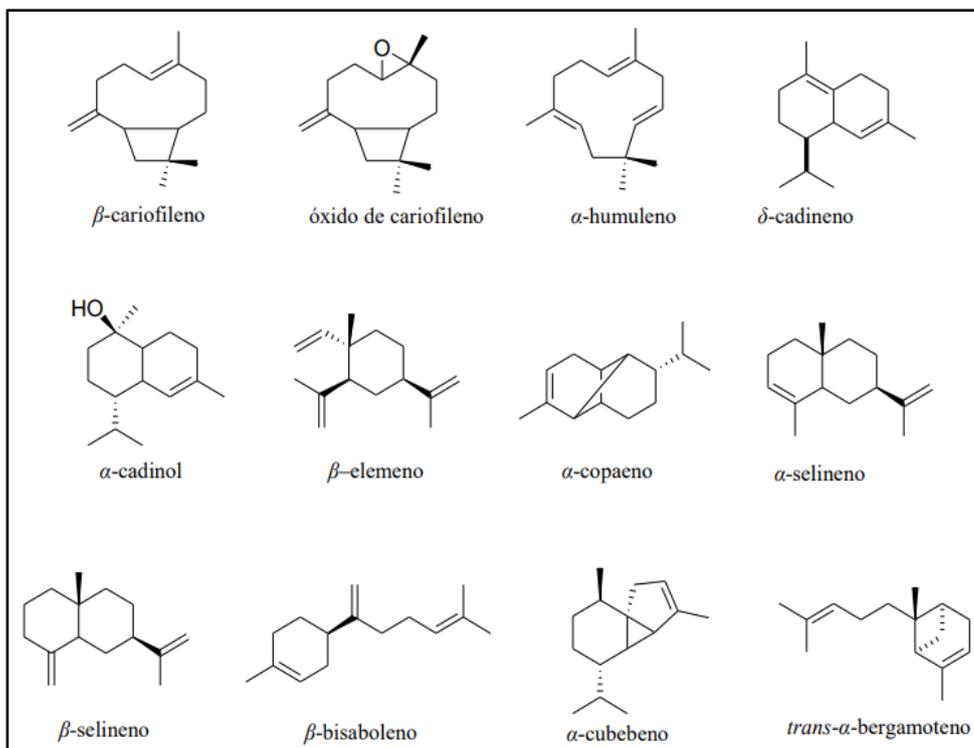


Figura 4: Principais sesquiterpenos identificados no óleo essencial de copaíba.  
 Fonte: LEANDRO *et al.* 2012 (adaptado).

Os 28 diterpenos descritos nos óleos de copaíba estudados pertencem aos esqueletos caurano, labdano e clerodano (Figura 5). O ácido copálico foi o único terpenóide encontrado em diversos óleos de copaíba extraídos de diferentes regiões do Brasil, sendo, portanto, utilizado como biomarcador para óleos de copaifera (VEIGA JUNIOR e PINTO, 2002). Os principais diterpenos encontrados nos oleorresinas de copaíba são o ácido copálico, ácido 3-hidroxi-copálico, ácido 3-acetoxi-copálico, ácido poliático, ácido hardwickiico, ácido caurenóico, ácido ent-caurenóico e ácido ent-agático (LEANDRO *et al.*, 2012).

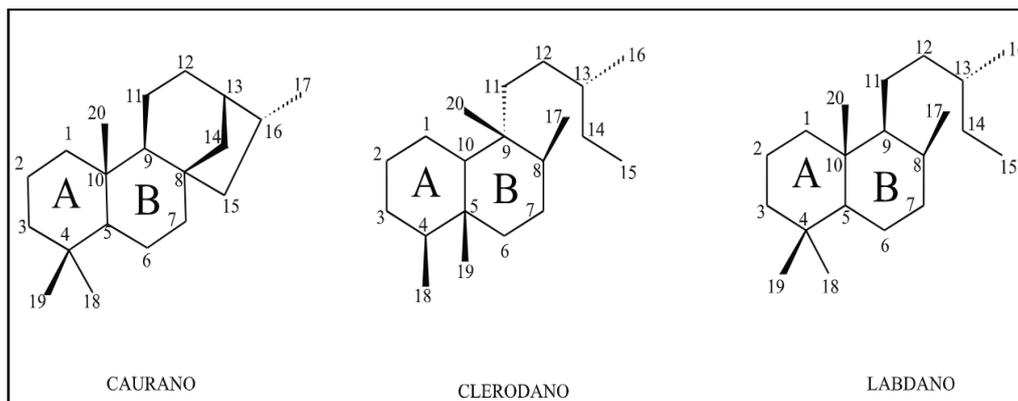


Figura 5: Estereoquímica dos esqueletos diterpênicos: caurano, clerodano e labdano.  
 Fonte: LEANDRO *et al.*, 2012 (adaptado).

Estudos descrevem para o ácido hardwickiico atividades antibacterianas e antifúngicas (KUETE *et al.*, 2007; MCCHESENEY, CLARK e SILVEIRA, 1991). O ácido caurenóico apresenta atividade relaxante muscular uterina, anti-inflamatória, antibacteriana, antitripanossoma, vasodilatadora, além de capacidade de indução de genotoxicidade (CAVALCANTI *et al.*, 2006; ALENCAR CUNHA *et al.*, 2003; PAIVA *et al.*, 2002; TINCUSI *et al.*, 2002; TIRAPELLI *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2002). O ácido poliático apresentou atividade antimuscarínica, antibacteriana, antifúngica e esquistossomicida (ABRÃO *et al.*, 2018; BARBOSA *et al.*, 2019; BORGES *et al.*, 2016; SÁNCHEZ-MENDOZA *et al.*, 2008). Para o ácido ent-agático, é descrita a atividade antifúngica (BARBOSA *et al.*, 2019).

## 2.3 O GÊNERO *PROTIUM*

### 2.3.1 A família Burseraceae

A família Burseraceae é amplamente distribuída nos trópicos e subtropicais nas Américas (Central e do Sul) e África (MENEZES FILHO, 2022). Atualmente, pertence à Ordem Sapindales, classe dicotiledônea e subclasse Rosidae, com mais de 700 espécies divididas em 19 gêneros em três famílias: Bursereae com 8 gêneros, Canarieae com 8 gêneros e Protieae com 3 gêneros (WEEKS, DALY e SYMPSON, 2005). Com mais de 160 espécies, *Protium* Burm. f. (Protieae) é considerado o maior representante do gênero e o segundo maior dentro da família Burseraceae (RAMOS-ORDOÑEZ *et al.*, 2013; SANTAMARIA-AGUILAR e LAGOMARSINO, 2017).

Na Região Norte do Brasil, as espécies do gênero *Protium* são conhecidas como “breu” ou “breu-branco”, sendo reconhecidas pela exsudação de uma resina esbranquiçada e aromática do tronco das árvores (Figura 6). Em outras regiões do território nacional, pode ser conhecido como almecega, goma-limão, almíscar e guapoi (LIMA *et al.*, 2005).

As espécies de Burseraceae são caracterizadas morfológicamente por folíolos pulvinulados, pétalas induplicadas e dois óvulos por carpelo (WEEKS, 2005). As árvores possuem na casca ductos de resina esquizógena vertical (contendo compostos terpênicos), que produzem óleos aromáticos, responsáveis por muitas de suas propriedades medicinais (SRI RAMA MURTHY *et al.*, 2016).



Figura 6: resina exsudada do tronco da árvore de *Protium*.  
Fonte: AMAZON FOREST TRADING, 2023 (adaptado).

Esta oleorresina apresenta coloração verniz, esbranquiçada ou incolor, que quando seca, apresenta massa cristalizada sobre o ferimento nos troncos (RIBERIRO *et al.*, 1999). Segundo Costa (1975), em oleorresinas recém-exsudadas, pode-se obter de 20-30% de óleo essencial, reduzindo seu percentual para 7-8% em oleorresinas já envelhecidas. A resina é solúvel em solventes apolares como éter etílico e clorofórmio, sendo rica em triterpenos (MARQUES *et al.*, 2010). A investigação da composição química não volátil dessas resinas é relevante na busca de atividades bioativas.

### 2.3.2 Perfil químico e farmacológico

As espécies de *Protium* exsudam uma oleorresina que é rica em mono e triterpenos, aos quais são atribuídas as principais propriedades medicinais das espécies desse gênero. Durante a solidificação, a quantidade de óleos essenciais nas oleorresinas frescas das espécies de Burseraceae pode reduzir para cerca de 8% ou menos (SIANI *et al.*, 1999).

Após liberar seus compostos voláteis, os exsudatos tornam-se maleáveis e amarelados, mas se transformam em uma dura resina nos troncos. Esse material é utilizado na fabricação de vernizes, corantes e para reparar e impermeabilizar barcos de madeira. Além disso, a resina é frequentemente queimada como repelente de insetos e para iluminar as casas na floresta. Sua queima também produz fumaça aromática utilizada em diversos rituais religiosos (RUDIGER, 2007).

Além dos óleos essenciais, os exsudatos de *Protium* contêm compostos não voláteis, principalmente triterpenos das séries oleanano, ursano, lupano, taraxane e friedelano, no qual ursano e oleananodiferenciam-se apenas na posição do hidrogênio em C-29 para oleananos e a presença do carbono em C-29 para ursanos (Figura 7). Os

triterpenos  $\alpha$ -amirina (ursa-12-eno-3 $\beta$ -ol) e a  $\beta$ -amirina (olean-12-eno-3 $\beta$ -ol) são os constituintes mais frequentes, seguidos pelo lupeol, e dos derivados carbonilados  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirenona (carbonila na posição C-3 do anel A) e os hidroxilados breína (3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diidroxieursa-12-eno) e maniladiol (3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diidroxieursa-12-eno) (RÜDIGER e VEIGA JÚNIOR, 2013).

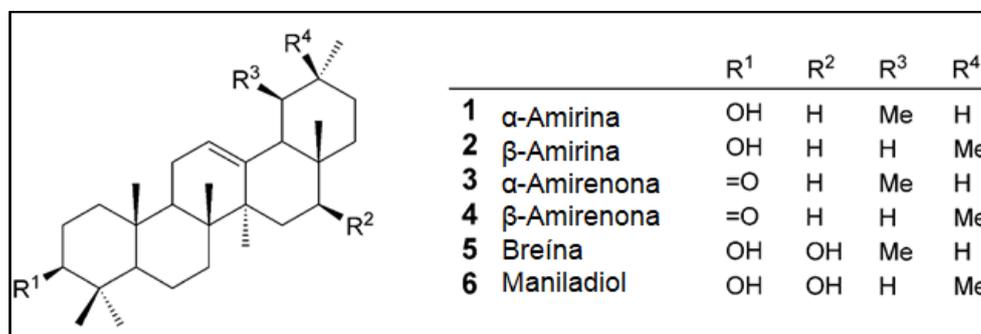


Figura 7: Estruturas dos triterpenos dos tipos ursano e oleanano identificados em oleorresinas da família Burseraceae.

Fonte: RÜDIGER e VEIGA JÚNIOR, 2013 (adaptado).

A maioria das investigações farmacológicas em espécies de *Protium* só se tornou disponível durante as duas últimas décadas e são altamente concentradas na oleorresina e seus compostos voláteis ou fração não volátil (RUDIGER 2007). Os monoterpenóides são comumente encontrados em plantas, apresentando vários efeitos como antioxidante, anti-inflamatório e anticancerígeno (KIM *et al.*, 2015; QUINTANS-JUNIOR *et al.*, 2013; YADAV e CHANDRA, 2017) e potenciais atividades antimicrobianas (LOŽIENĚ *et al.*, 2018).

Dentre os monoterpenos, p-cimeno e  $\alpha$ -pineno possuem ação leishmanicida sobre *L. amazonensis* sem citotoxicidade para macrófagos (SANTANA *et al.*, 2020), o carvacrol reduz os efeitos nocivos da cisplatina no ovário (DINC *et al.*, 2023) e atua como inibidor da formação de biofilme (WIJESUNDARA, LEE e RUPASINGHE, 2022). Entre esses triterpenóides,  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina são conhecidas por seus potenciais atividades reguladoras relacionadas a patógenos, demonstrando seus efeitos antibacterianos e antifúngicos (KWUN, LEE e LEE, 2021). A  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina possuem atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (KAREN CARDOSO *et al.*, 2020; DA SILVA *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, estudos têm se concentrado na AGIs de plantas medicinais na busca de inibidores eficazes da glicosidase (ABESUNDARA *et al.*, 2004; ONAL *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005). Uma revisão dos compostos glicêmicos menciona plantas como *Lactuca indica* L. (Compositae), *Hyssopus officinalis* L. (Lamiaceae), *Nicandrophysalodes* L. (Solanaceae), entre outras, que apresentam atividade AGI, mencionando que

flavonóides e polifenóis são comumente associados como inibidores eficazes da  $\alpha$ -glicosidase (JUNG *et al.*, 2006). Poucos estudos de inibição enzimática foram encontrados para espécies com predominância de classes como os terpenos.

## 2.4 PRODUTOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Em uma descrição ampla, "biotecnologia" é definida como "a aplicação da ciência e da tecnologia a organismos vivos, bem como as suas partes, produtos e modelos, a fim de modificar materiais vivos ou não vivos, a fim de produzir conhecimento, serviços e produtos" (OCDE, 2005, p. 9). A biotecnologia é um conjunto de tecnologias e conhecimentos que podem ser utilizados em diversos setores industriais. Em alguns casos, pode-se citar a existência de uma indústria de biotecnologia composta por diversos negócios com características sobrepostas, cuja atividade principal é a condução de processos de P, D&I em biotecnologia (BRINK, MCKELVEY e SMITH, 2004).

O modelo tradicional de P&D da indústria farmacêutica parecia ter se esgotado entre 1990 e 2000, o que impulsionou o mercado de medicamentos genéricos. Nesse cenário, a biotecnologia demonstrou seu valor estratégico para o desenvolvimento de inovações radicais, estabelecendo-se como uma rota para a competição global da indústria farmacêutica (MITIDIERI *et al.*, 2015). A porcentagem de moléculas biotecnológicas em todos os novos medicamentos aprovados pelo FDA aumentou de 10% nos três anos de 1995–1997 para 16% em 2007–2009 e depois para 28% em 2016–2018. Estima-se que hoje mais de 40% de todos os medicamentos em desenvolvimento no mundo possam ser qualificados como biofármacos (WALSH, 2018).

Segundo uma estimativa, 25% dos US\$ 8 bilhões que a indústria farmacêutica brasileira gerou em 1996 vieram da comercialização de medicamentos originados de plantas (GUERRA *et al.*, 2001). Nesse sentido, estima-se que as vendas neste setor cresçam 10% anualmente 2001 (KNAPP, 2001). Apenas cerca de 8% das espécies de plantas da flora brasileira foram estudadas para novos compostos bioativos. Sendo aproximadamente 25% dos produtos farmacêuticos comercializados são de origem vegetal, aumentando para 60% no caso dos medicamentos homeopáticos (CORRA *et al.*, 2003).

## 2.5 BIOATIVIDADE DOS PRODUTOS NATURAIS

### 2.5.1 Atividade Citotóxica

Conforme estipulado pela ISO 10993 da Organização Internacional de Normalização, o primeiro procedimento para avaliar a biocompatibilidade de um material destinado a dispositivos biomédicos consiste no teste de citotoxicidade *in vitro*. Após confirmada a ausência de toxicidade do produto, a análise da biocompatibilidade é então aprofundada por meio da realização dos testes necessários em animais de laboratório. Esses testes de citotoxicidade incluem a exposição do material a uma cultura de células de mamíferos, seja de forma direta ou indireta, permitindo a observação das alterações celulares desencadeadas por diversos mecanismos, como a introdução de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (CRUZ *et al.*, 1987; ROGERO *et al.*, 2000).

As vantagens dos métodos *in vitro* sobre os *in vivo* incluem a capacidade de restringir o número de variáveis experimentais e obter informações significativas mais facilmente. Além disso, o período de teste pode ser, em muitos casos, mais curto. O uso de materiais de referência adaptados, realizados em clínicas, pode superar o problema da extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para a aplicação clínica dos biomateriais. Pesquisas utilizando esses métodos mostraram que testes de cultura celular podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e acessíveis financeiramente para o estudo de biocompatibilidade *in vitro* (ROGERO *et al.*, 2003).

### 2.5.2 Inibidores De Lipase Pancreática

A obesidade está frequentemente associada ao consumo de uma dieta rica em gorduras. A lipase pancreática (triacilglicerol acetilhidrolase) é uma enzima que desempenha um papel fundamental na digestão lipídica e sua subsequente absorção. Como resultado, uma das principais estratégias utilizadas para controlar e tratar a obesidade é a inibição parcial da atividade da lipase, o que pode reduzir a quantidade de gorduras alimentares que são absorvidas (BIRARI e BHUTANI, 2007; LUNAGARIYA *et al.*, 2014).

### 2.5.3 Inibidores De Alfa-Glicosidase

O diabetes mellitus é uma síndrome de múltiplas etiologias que resulta na ausência da produção de insulina e/ou da incapacidade da insulina de desempenhar as funções. É

caracterizada por hipoglicemia crônica e alterações no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. Os sintomas característicos incluem polidipsia, poliúria, perda de visão e perda de peso (OMS, 1999).

Os inibidores da glicosidase (AGIs) estão entre os medicamentos disponíveis para controlar o índice glicêmico. A enzima glicosidase é localizada no intestino delgado e é necessária para a decomposição de carboidratos em monossacarídeos absorvíveis. Os AGIs atrasam, mas não impedem a absorção de carboidratos ingeridos, reduzindo a glicemia pós-prandial e picos de insulina (ROSS, GULVE e WANG, 2004).

#### 2.5.4 Atividade antimicrobiana

Devido ao crescente aumento da resistência bacteriana a diversas drogas antimicrobianas, surge uma crescente preocupação e busca por novas alternativas terapêuticas, sendo as plantas medicinais uma fonte significativa para a obtenção desses medicamentos (MICHELIN *et al.*, 2005). Estudos já evidenciaram a eficácia dos óleos essenciais e extratos vegetais no controle do crescimento de diversos microrganismos, abrangendo bactérias, fungos filamentosos e leveduras (RAMOS, 2016). Diversos mecanismos são considerados para explicar a ação antimicrobiana das plantas medicinais, sendo que a atividade biológica pode estar associada às características químicas e às quantidades dos componentes extraídos desses vegetais (NAZZARO *et al.*, 2013).

Os antibióticos de origem vegetal apresentam uma estrutura química distinta daquela dos antibióticos derivados de microrganismos, podendo modular o metabolismo intermediário de patógenos. Essa modulação ocorre ao ativar ou bloquear reações e sínteses enzimáticas, além de alterar a estrutura de membranas (MICHELIN *et al.*, 2005). Além disso, é possível que esses antibióticos causem danos à integridade da membrana celular, especialmente devido aos componentes lipofílicos presentes nos óleos essenciais (COWAN, 1999). No caso das bactérias, observa-se que as gram-negativas tendem a ser mais resistentes aos efeitos dos óleos essenciais em comparação com as gram-positivas (TROMBETTA *et al.*, 2005). Essa resistência pode ser atribuída às diferenças estruturais nas paredes celulares das bactérias, conforme discutido por NAZZARO *et al.* (2013).

## 2.6 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS

A cromatografia é um método físico-químico de separação baseada na migração dos componentes da mistura que ocorre como resultado de interações entre duas fases imiscíveis: a fase móvel e a fase estacionária. Uma grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna esta técnica versátil e amplamente aplicável (DEGANI *et al.*, 1998).

Os OEs de copaíba são comumente analisados por cromatografia em fase gasosa (CG) (SOUSA *et al.*, 2011; XAVIER-JÚNIOR *et al.*, 2017). A CG pode ser usada para separar gases ou outras substâncias voláteis, sendo uma técnica com excelentes capacidades de resolução que permite analisar milhares de substâncias diferentes a partir de uma única amostra. A separação se baseia na distribuição diferenciada dos componentes da amostra entre a fase estacionária (sólida ou líquida) e a fase móvel (gasosa). Um sistema de injeção é usado para introduzir a amostra em uma coluna contendo a fase estacionária. A utilização de temperaturas específicas no local de injeção da amostra e na coluna permite a vaporização dessas substâncias, que, de acordo com suas características e as da fase estacionária, são retidas por períodos pré-determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferentes. A utilização de um detector apropriado na saída da coluna possibilita a quantificação dessas substâncias (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

O recorrente uso da CG também pode ser atribuído aos baixos limites de detecção que podem ser obtidos. Essa característica torna necessária a utilização de um pequeno número de amostras, o que, em alguns casos, é problemático e restringe o uso de outras técnicas (LANÇAS, 1993; DEGANI *et al.*, 1998). Por outro lado, existem algumas desvantagens, visto que essa técnica pode ser usada para analisar substâncias voláteis e termicamente estáveis; caso contrário, seria necessário formar um derivado com essas características, o que nem sempre é viável, demandando tempo e maior custo para uma única análise.

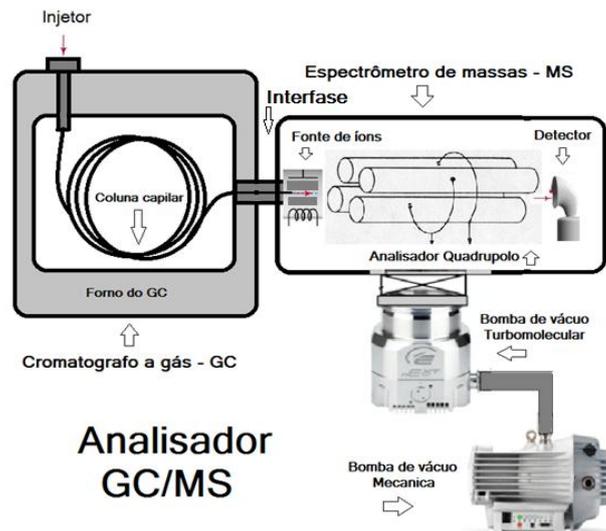


Figura 8: Componentes de um analisador de cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas.

FONTE: ANALYTICA, 2023 (adaptado).

É fundamental notar que, embora a cromatografia em fase gasosa seja uma excelente técnica quantitativa, não é uma técnica qualitativa eficaz, exigindo frequentemente o uso de técnicas auxiliares para identificação segura das substâncias contidas na amostra. O espectrômetro de massa (Figura 8) é um detector para análises qualitativas e quantitativas de constituintes em cromatografia gasosa ou líquida. Na espectrometria de massa, as moléculas gasosas são aceleradas por um campo elétrico e separadas de acordo com suas massas após serem ionizadas, muitas vezes para produzir cátions. O processo de ionização, geralmente, fornece energia suficiente para dividir a molécula em uma variedade de fragmentos. Um espectro de massa é um gráfico que exhibe a abundância relativa de cada fragmento que atinge o detector do espectro de massa (HARRIS, 2001).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS RESÍDUOS

##### 3.1.1 Resíduo da oleorresina de Copaíba

Obtido da indústria BERACA.

### 3.1.2 Resíduo da oleoresina de *Protium*

Os resíduos industriais das oleoresinas foram obtidos comercialmente das empresas amazônicas BERACA (oleoresina de copaíba) e IDESAM (oleoresina de breu-branco).

## 3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

### 3.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O comportamento das substâncias presentes nos resíduos das oleoresinas foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de fase normal com sílica gel 60 GF254 (CAMAG®), nas dimensões de 5 cm x 5 cm x 0,5 mm e solução de Hexano/Acetato de etila (7:3 v/v) para as amostras de RIC e de Hexano/Clorofórmio/Acetato de etila (2:7:1 v/v) como eluente, visualização em luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  nm e  $\lambda = 366$  nm) e revelação através de pulverização com sulfato cérico a 10%, seguida de aquecimento.

### 3.2.2 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM)

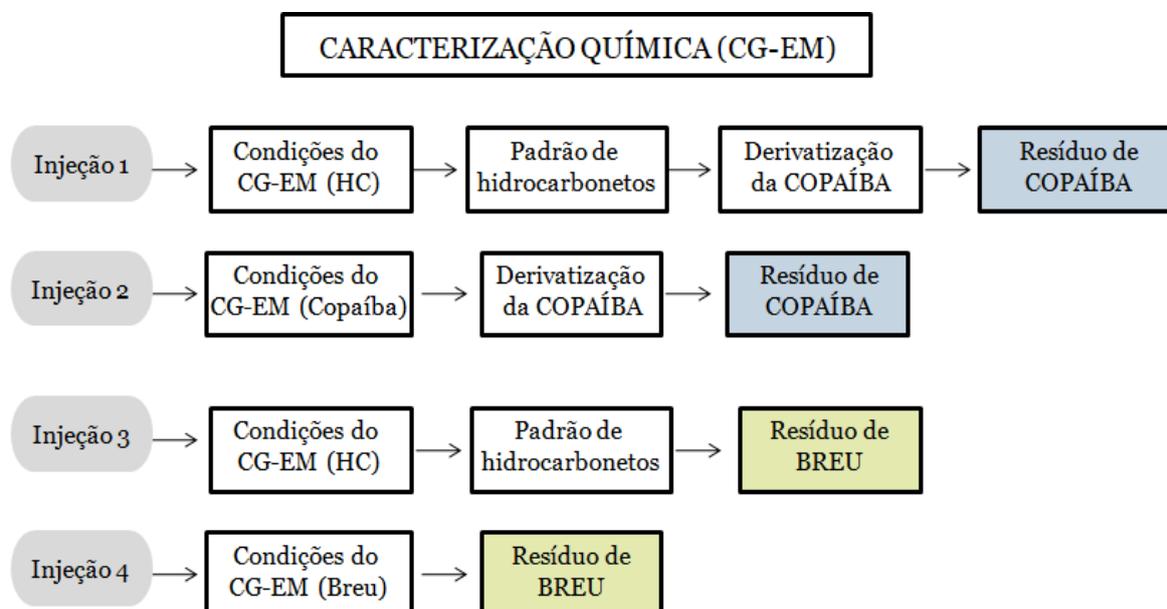


Figura 9: Análises realizadas para a caracterização química dos resíduos por CG-EM.

Os resíduos foram caracterizados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). Foram realizadas duas injeções (uma para o resíduo de copaíba e outra para o resíduo de breu) com as condições do padrão de hidrocarbonetos (HC) para identificar os compostos voláteis presentes nos resíduos, e duas injeções com as condições cromatográficas específicas para identificar os compostos de maior peso molecular presentes nos resíduos de copaíba e breu. Os constituintes foram identificados baseados em seus índices de retenção, por comparação com padrões da literatura (ADAMS, 2007), com o banco de dados disponível na biblioteca Wiley 6,0 (Biblioteca Espectral NIST e Biblioteca Espectral WILEY), pelo índice de similaridade e CAS pelo sistema de informação TGSC (The Goods Cents Company). A análise por CG-EM foi realizada em cromatógrafo Shimadzu QP2020 NX, equipado com um amostrador automático AOC-20i, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS com as seguintes dimensões 30m x 0,25mm x 0,25 µm (Shimadzu), com software LabSolutions Insight™. A análise espectrométrica também foi realizada em cromatógrafo em fase gasosa da mesma marca e modelo, utilizando o detector de espectrometria de massas.

### 3.2.3 Parâmetros CG-EM (Hidrocarbonetos)

As amostras foram inseridas no sistema cromatográfico (1µL) por meio de injetor a 250°C, com proporção de divisão 20 e vazão de 2mL/min, utilizando hélio ultrapuro como gás de arraste e detector a 250 °C. As condições de temperatura do forno foram baseadas em uma rampa que inicia em 60°C até 180°C (2,5 °C/min.), de 180°C a 290 °C (10°C/min.) com uma isoterma final de 5 minutos. As amostras foram ionizadas por impacto de elétrons com energia de 70 eV, sendo em seguida fragmentada e separada em sistema quadrupolo com varredura de 80 a 500 uma.

### 3.2.4 Parâmetros CG-EM (Copaíba)

As amostras foram inseridas no sistema cromatográfico (1µL) por meio de injetor a 220°C, com proporção de divisão 20 e vazão de 2mL/min, utilizando hélio ultrapuro como gás de arraste e detector a 220 °C. As condições de temperatura do forno foram baseadas em uma rampa que inicia em 110°C até 140°C (3 °C/min.), de 140 °C a 220 °C (8 °C/min.) e de 220°C até 270°C com uma isoterma final de 5 minutos. As amostras foram ionizadas

por impacto de elétrons com energia de 70 eV, sendo em seguida fragmentada e separada em sistema quadrupolo com varredura de 60 a 400 uma.

### 3.2.5 Parâmetros CG-EM (Breu)

As amostras foram inseridas no sistema cromatográfico (1µL) por meio de injetor a 250°C, com proporção de divisão 20 e fluxo de purga de 2mL/min, utilizando hélio ultrapuro como gás de arraste e detector a 250 °C. As condições de temperatura do forno foram baseadas em uma rampa que inicia em 60 °C até 240°C (9°C/min.), de 240 °C a 290°C (2,5°C/min.) com uma isoterma final de 15 minutos. As amostras foram ionizadas por impacto de elétrons com energia de 70 eV, sendo, em seguida, fragmentadas e separadas em sistema quadrupolo com varredura de 50 a 500 uma.

### 3.2.6 Derivatização do RIC

A derivatização prévia foi necessária para realizar a análise das amostras de resíduo de copaíba. A metodologia de derivatização utilizada foi a de esterificação, realizada por Dron *et al.* (2004). Foram adicionados 90 µL de clorofórmio em um frasco para solubilização contendo 10 µL de amostra de resíduo. Após a introdução de 50 µL de reagente trimetilsilildiazometano (TMSH), o frasco foi levemente agitado até obter uma solução homogênea. Após esse processo, 1µL da amostra diluída foi injetada.

### 3.2.7 Determinação do índice de retenção linear (IRL)

Uma mistura padrão de n-Alcanos (Sigma-Aldrich C<sub>12</sub> –C<sub>17</sub>) foi utilizada para verificar o desempenho do sistema GC-MS e para calcular o índice de retenção linear (LRI) dos compostos voláteis das amostras. O padrão (1 µL) destes alcanos foi injetado no sistema CG-EM e seus respectivos tempos de retenção foram usados como padrão externo de referência para o cálculo do LRI, juntamente com os tempos de retenção de cada composto de interesse. O LRI de cada componente foi calculado, conforme a Equação 1:

$$(1) \text{ LRI} = 100 * \left( \frac{t_c - t_n}{t_{n+1} - t_n} + n \right)$$

Onde: LRI - índice de retenção linear;  $t_c$  - tempo de retenção do composto de interesse;  $t_{n+1}$  - tempo de retenção do hidrocarboneto posterior; n - nº de carbonos do hidrocarboneto anterior. Para auxiliar na identificação e caracterização dos compostos voláteis, os valores de índice de retenção linear calculados foram comparados com dados encontrados na literatura (ADAMS, 2007), por seus espectros de massas com dados das espectroscopias Wiley 6.0 e NIST, e pelo sistema de informação da empresa GoodScents (TGSC) através do CAS sugerido.

### 3.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

#### 3.3.1 Atividade citotóxica

##### 3.3.1.1 Cultivo celular

As linhagens celulares de fibroblastos (MRC-5) e adenocarcinoma do fígado (HEPG2) foram cultivadas em meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), sendo descartado o sobrenadante com adição de 1mL de meio para ressuspender o pellet, sendo 10 $\mu$ L de células para contagem na câmara de newbauer. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

##### 3.3.1.2 Ensaio *in vitro* com células MRC-5 e HEPG2

O ensaio foi realizado, conforme a metodologia de AHMED e colaboradores (1994), com o intuito de analisar a viabilidade celular em células da linhagem não tumoral de fibroblastos MRC-5 e linhagem tumoral do adenocarcinoma do fígado (HEPG2) após exposição aos extratos. Em placa de 96 poços, as células foram plaqueadas na concentração de 0,5 x 10<sup>4</sup> células por poço. Após 24 horas de incubação e aderência, as células MRC5 foram tratadas com os extratos na concentração única de 100 $\mu$ G/mL pelo período de 24, 48 e 72 horas. Enquanto as células HEPG2 foram tratadas nas concentrações entre 1,5625-100  $\mu$ g/mL, nos mesmos tempos de exposição. Passados os tempos de tratamento, foram adicionados 10 $\mu$ L da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4% 1:20 em meio de cultura). Após o tempo de metabolização da resazurina (3h), foi realizada a leitura da fluorescência em um leitor de microplacas (espectrofotômetro) para a quantificação de células viáveis.

### 3.3.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA A-GLICOSIDASE

A atividade enzimática da  $\alpha$ -glicosidase foi determinada consoante Andrade-Cetto *et al.* (2008) com modificações. A enzima foi preparada em uma concentração de 3mg/mL da acetona pós intestinal de rato, agitada por 5 minutos, em seguida centrifugada a 3600 rpm por 10 minutos. A enzima  $\alpha$ -glicosidase extraída contida no sobrenadante e o substrato 4-ítrofenil-D-glucopiranosídeo (4-NPGP) foram diluídos em tampão fosfato 10mM pH 6,9. Em seguida, foram colocados 30 $\mu$ L das amostras, padrão e/ou controle (DMSO) nos diferentes poços da microplaca em triplicata, 170 $\mu$ L da enzima extraída, incubada por 5 minutos a 37°C no escuro, foram adicionados 100 $\mu$ L do 4-NPGP (5mg/mL), incubado por 20 minutos ou até que a leitura do controle à 405nm de 1,000 $\pm$ 0,1.

### 3.3.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA LIPASE

A atividade enzimática da lipase foi determinada de acordo com Slanc *et al.* (2009) com ligeiras modificações. A Lipase pancreática tipo II de porcino da SIGMA com código L3126-25G foi diluída em tampão TRISMA-HCL 75mM pH 8,5, e o substrato 4-Nitrofenil palmitato (PNP) com código N2752-50G foi preparado através da diluição primeiro em acetonitrila depois em etanol na proporção de 1:4. O padrão usado foi o Orlistrate e as leituras foram feitas no Multimode Detetor DTX 800 da Beckman a 450nm. Foram colocados 30 $\mu$ L das amostras, padrão e/ou controle (DMSO) nos diferentes poços da microplaca em triplicata, 250 $\mu$ L da enzima (0,8 mg/mL), incubada 5 minutos a 37°C no escuro, em seguida, adicionados 20 $\mu$ L de PNP (4mg/mL), incubados por 10 minutos ou até que a leitura do controle de 1,000 $\pm$ 0,1.

### 3.3.4 Atividade antimicrobiana

As cepas utilizadas foram os isolados de Gram-negativos de *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606-143), *Pseudomonas aeruginosa* (CDC EDL-1284), *Escherichia coli* não diarreicogênica (ATCC 10536), *Escherichia coli* enterotoxigênica típica (EPEC) (ATCC E234869), *Pseudomonas putida* (oralis) (ATCC 15175-113), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), e os isolados Gram-positivos de *Enterococcus faecalis* (*Streptococcus faecalis*) (ATCC 4083), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175),

*Staphylococcus aureus* (ATCC 80958), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ATCC 33591) e *Staphylococcus simulans* (ATCC 27851), pertencentes à plataforma de bioensaios da Fiocruz.

### 3.3.5 Padronização dos inóculos

As cepas foram cultivadas previamente em 3mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) (HIMEDIA). As culturas microbianas foram, então, diluídas em meio de cultura conforme a escala de 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC mL).

#### 3.3.5.1 Teste de difusão em ágar

A determinação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de difusão em ágar, pela técnica do poço, segundo Grove e Randall (1955), com modificações, segundo Bastos *et al.* (2022). Utilizou-se o meio de cultura Ágar Müller Hinton (AMH) (HIMEDIA) para a realização dos testes. Após esterilização do AMH, o meio foi distribuído em placas de petri estéreis de 90 x 15 mm. As placas foram mantidas em temperatura ambiente até solidificar. O processo de estriamento das placas iniciou-se logo após o preparo dos inóculos. Para isso, foi inserido um swab estéril em cada um dos diferentes tubos contendo os diferentes inóculos. Após tal procedimento, os microrganismos alvos foram semeados em toda a superfície da placa em três direções, girando a placa aproximadamente 60° com o objetivo de assegurar distribuição uniforme do inóculo. Foram adicionados 50 µL de cada amostra na superfície do AMH na concentração de 1000 µg/mL. Também foram adicionados os controles positivos imipeném + cilastatina sódica (TIENAM) para (*P. aeruginosa* e *Proteus*) e oxacilina para (*S. aureus*, *S. simulans* e MRSA). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, após o período de incubação foi feita a medição dos halos de inibição.

### 3.4 Análise estatística

Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e a análise estatística foi realizada pelo programa Graphpad Prism® versão 10.0.2, utilizando análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguida do teste de Tukey com  $p < 0,05$  para indicar diferença estatística.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho possui quatro análises químicas realizadas no CG-EM. Para que os compostos voláteis pudessem ser identificados, é necessário que se realize o cálculo do Índice de Retenção Linear (IRL) para comparação com os padrões da literatura de Adams (2007). O cálculo (descrito na metodologia) é realizado a partir do tempo de retenção (Rt) do padrão de alcanos injetado e do Rt das substâncias do composto de interesse visto que o produto deste trabalho é o resíduo da extração do óleo essencial. Espera-se que a composição majoritária das amostras seja de terpenos de maior massa molar, que, por sua vez, necessitam de maior abrangência nas condições de detecção dos fragmentos.

### 4.1 Perfil químico do resíduo de Copaíba

A composição química do resíduo de copaíba foi analisada e os seus compostos foram identificados através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A primeira análise realizada foi nas condições do padrão de n-alcanos para identificação da composição volátil do resíduo de copaíba. No cromatograma da figura 10, é possível observar duas principais regiões de eluição. A primeira região, a de menor tempo de retenção, apresentou grande sobreposição de picos e correspondente aos hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados, denominada de Região de Sesquiterpenos. A segunda região corresponde aos ésteres metílicos de ácidos diterpênicos, denominada de Região de Diterpenos. A quantidade de picos é superior ao que se visualiza em um cromatograma típico do óleo essencial e apresenta picos menores entre as duas regiões principais. As diferenças entre as quantidades de fragmentações dos cromatogramas estão associadas às condições de injeção no CG-EM e as características das amostras.

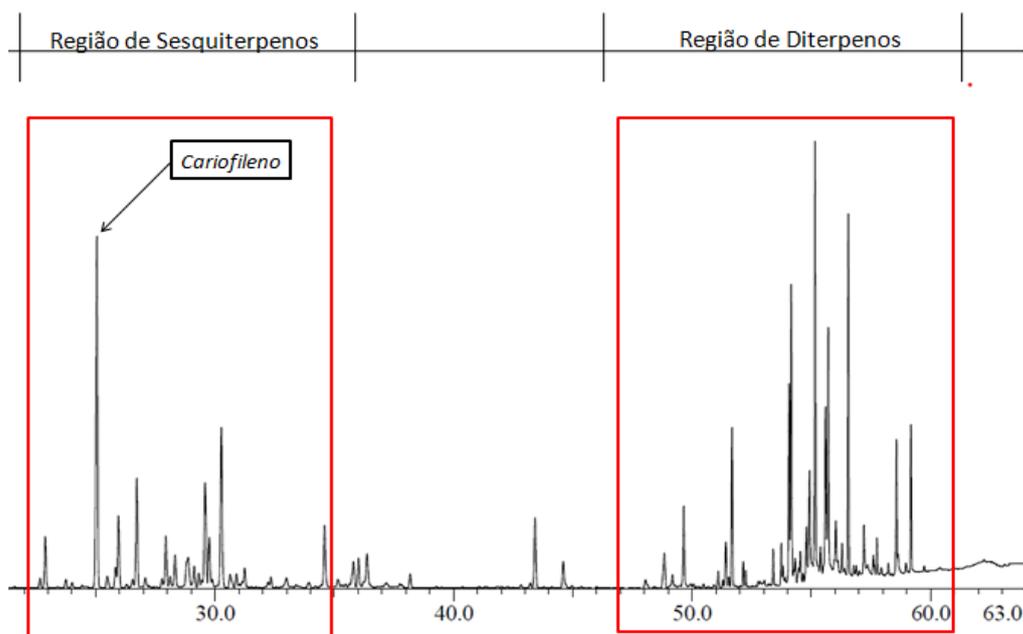


Figura 10: Perfil CG-EM da amostra esterificada do resíduo industrial de copaíba pelas condições do padrão de hidrocarbonetos.

Quando comparado com outros estudos, o perfil cromatográfico obtido demonstra a fragmentação e presença de substâncias que não são características do gênero *copaifera*. Conforme o estudo de Veiga Jr. (2002), no cromatograma obtido para o óleo essencial de copaíba através da cromatografia gasosa de alta resolução, é possível observar duas regiões de eluição, no qual eluem os sesquiterpenos entre 8 e 13 minutos, entre 20 e 26 minutos, eluem os ácidos diterpênicos. Essas regiões podem divergir de acordo com o método de caracterização e com a coluna utilizada.

Na tabela 1, são apresentados os principais constituintes químicos identificados no resíduo de copaíba. Os sesquiterpenos oxigenados corresponderam a junenol (1,85%),  $\alpha$ -epi-Murolol (0,81%),  $\alpha$ -Murulol (0,76%),  $\alpha$ -Cadinol (1,15%) e Eudesm-7(11)-en-4-ol (0,32%). O (E)-Cariofileno apresentou-se como o principal composto no resíduo, concordando com os dados descritos por Almeida Borges *et al.* (2013), em que o cariofileno é o constituinte mais abundante da fração volátil.

Os sesquiterpenos são componentes majoritários da fração do óleo essencial presente na oleorresina de copaíba. Durante o processo de destilação do óleo essencial, parte dessa fração volátil é mantida no resíduo (fração resinosa), para prevenir o comprometimento dos balões utilizados no processo. Portanto, foi possível identificar diferentes monoterpenos e sesquiterpenos no resíduo.

O cariofileno é reconhecido como marcador químico da fração sesquiterpênica por ser o único presente em todas as oleorresinas analisadas. Este composto também é considerado o principal constituinte da espécie *C. reticulata* Ducke (BARBOSA *et al.*,

2012). No estudo realizado por Ziech e colaboradores (2013), os principais componentes do óleo que *C. reticulata* Ducke foram identificados como  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -bergamoteno,  $\alpha$ -selineno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -selineno e  $\beta$ -bisaboleno.

Tabela 1: Compostos voláteis identificados no resíduo de copaíba a partir do índice de retenção do padrão de alcanos C<sub>10</sub>-C<sub>17</sub>.

Pico	Área%	CAS	Substância	Rt	IRL	IRL Ref.	Ref.
1	1,32%	3856-25-5	$\alpha$ -Copaeno	22,887	1371	1374	Adams, 2007
2	10,01%	87-44-5	(E)-Cariofileno	25,047	1414	1417	Adams, 2007
3	0,31%	18252-44-3	$\beta$ -Copaeno	25,450	1422	1432	Adams, 2007
4	0,51%	29873-99-2	$\gamma$ -Elemeno	25,826	1430	1434	Adams, 2007
5	2,04%	13474-59-4	$\alpha$ -trans-Bergamoteno	25,952	1432	1432	Adams, 2007
6	2,96%	6753-98-6	$\alpha$ -Humuleno	26,714	1447	1454	Adams, 2007
7	1,35%	30021-74-0	$\gamma$ -Muroleno	27,938	1472	1479	Adams, 2007
8	0,90%	17066-67-0	$\beta$ -Selineno	28,329	1480	1490	Adams, 2007
9	1,46%	30021-74-0	$\gamma$ -Muroleno	28,867	1491	1479	Adams, 2007
10	0,62%	.	$\alpha$ -Muroleno	29,128	1496	.	.
11	0,32%	495-61-4	cis- $\alpha$ -Bisaboleno	29,320	1500	1505	Adams, 2007
12	2,83%	495-61-4	$\beta$ -Bisaboleno	29,585	1505	1505	Adams, 2007
13	1,16%	39029-41-9	$\gamma$ -Cadineno	29,752	1509	1513	Adams, 2007
14	4,60%	483-76-1	$\delta$ -Cadineno	30,264	1520	1522	Adams, 2007
15	0,41%	29837-12-5	cis-Cadina-1,4-dieno	30,617	1527	1495	Adams, 2007
16	0,33%	24406-05-1	$\alpha$ -Cadineno	30,889	1533	.	TGSC
17	0,71%	25532-79-0	(E)-Beta-bisaboleno	31,239	1540	.	TGSC
18	1,85%	472-07-1	Junenol	34,592	1610	1618	Adams, 2007
19	0,81%	19912-62-0	$\alpha$ -epi-Muurolol	35,801	1637	1640	Adams, 2007
20	0,76%	19435-97-3	$\alpha$ -Murulol	36,016	1642	1644	Adams, 2007
21	1,15%	481-34-5	$\alpha$ -Cadinol	36,366	1649	1652	Adams, 2007
22	0,32%	473-04-1	Eudesm-7(11)-en-4-ol	38,185	1689	1700	Adams, 2007
23	2,02%	.	Degradação	43,417	.	.	.
24	0,64%	.	Degradação	44,600	.	.	.

25	1,11%	1438-62-6	13-epimanol	48,836	.	.	TGSC
26	1,87%	.	cis-3,14-Clerodadien-13-ol	49,642	.	.	.
27	0,33%	.	cis-3,14-Clerodadien-13-ol	51,095	.	.	.
28	0,98%	1438-62-6	13-epimanol	51,419	.	.	TGSC
29	2,95%	.	Kolavelool	51,681	.	.	.
30	0,44%	112-63-0	Metil linoleato	52,145	.	.	TGSC
31	0,63%	.	Degradação	53,405	.	.	.
32	0,67%	172549-29-0	Degradação	53,744	.	.	TGSC
33	0,32%	.	Degradação	53,819	.	.	.
34	3,63%	21738-29-4	Éster metílico do ácido eperúico	54,065	.	.	TGSC
35	5,22%	.	Éster metílico do ácido clerodenóico	54,151	.	.	.
36	0,69%	.	Éster metílico do ácido labdânico	54,318	.	.	.
37	0,39%	.	Éster metílico do ácido labda-7-em-15óico	54,467	.	.	.
38	0,59%	.	Isômero do éster metílico do ácido labdenóico	54,541	.	.	.
39	1,48%	.	Ácido eperúico	54,800	.	.	.
40	2,77%	.	Não identificado	54,930	.	.	.
41	8,18%	.	Éster metílico do ácido copálico	55,150	.	.	.
42	1,10%	.	Éster metílico do ácido catívico	55,382	.	.	.

43	4,28%	21738-29-4	Éster metílico derivado do ácido eperúico	55,595	.	.	TGSC
44	5,25%	.	Metil kolavenato	55,710	.	.	.
45	2,14%	.	Derivado do metal kolavenato	56,033	.	.	.
46	0,39%	.	Não identificado	56,133	.	.	.
47	0,72%	.	Éster metílico derivado do ácido kaurenóico	56,283	.	.	.
48	6,12%	.	Hardwickiato de metila	56,547	.	.	.
49	0,36%	.	Pinifolato de metila	56,767	.	.	.
50	0,43%	.	7-acetoxi-hardwickiato de metila	56,883	.	.	.
51	1,20%	.	15-hidroxi-16-oxo-hardwickiato de metila	57,210	.	.	.
52	0,81%	.	Agatato de dimetila	57,599	.	.	.
53	0,71%	1259-10-5	Não identificado	57,753	.	.	TGSC
54	2,53%	1259-10-5	3-acetóxi-copalato de metila	58,564	.	.	TGSC

CAS: número de registro químico; Rt: tempo de retenção; IRL: índice de retenção linear; IRL Ref: índice de retenção linear de referência; Ref: referência de identificação.

A segunda análise realizada foi nos parâmetros de maior varredura do CG-EM, a fim de se obter uma abrangência maior dos compostos presentes no resíduo (Figura 11).

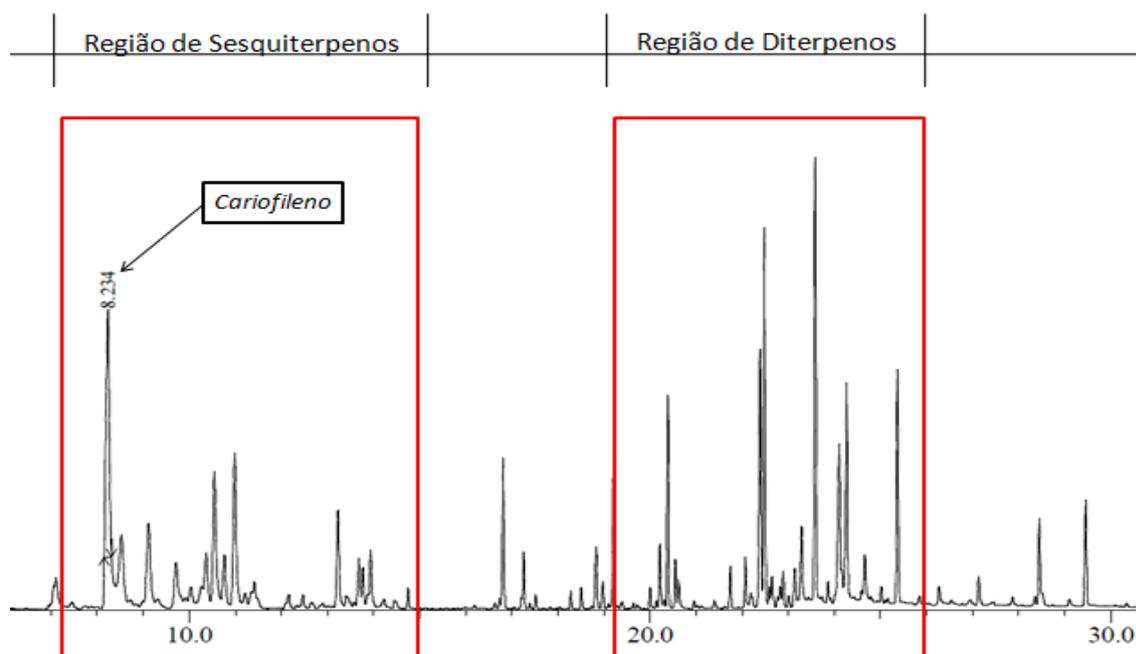


Figura 11: Perfil cromatográfico do resíduo industrial de copaíba obtido pelas condições de maior varredura do CG-EM.

Na região de sesquiterpenos pico principal, também corresponde ao marcador químico dos óleos de copaíba, o cariofileno (14,10%), sendo confirmado pela primeira análise química realizada com as condições dos hidrocarbonetos através do índice de retenção linear (IRL), sendo o composto majoritário nas duas análises.

Quando o perfil cromatográfico obtido para o resíduo de copaíba é comparado ao perfil de óleos comerciais adulterados, é possível observar uma semelhança na distribuição dos picos, pois também apresentam duas regiões principais de retenção, mas com os picos sobrepostos, conforme descrito por Veiga Jr. (1997), que avaliou a autenticidade dos óleos essenciais de copaíba. As degradações e oxidações são resultantes do processo de destilação devido à submissão da oleorresina a altas temperaturas (tabela 2). Outros picos não característicos podem indicar a presença de adulterantes como os óleos vegetais e minerais.

Tabela 2: Composição química presente no extrato residual de *Copaifera* a partir das condições de maior abrangência do CG-EM.

Pico	Área %	CAS	Substância	Rt
1	0,77%	3856-25-5	Copaeno	7,108
2	14,10%	87-44-5	Cariofileno	8,234
3	3,76%	17699-05-7	$\alpha$ -Bergamoteno	8,531
4	3,13%	6753-98-6	$\alpha$ -Humuleno	9,12
5	1,77%	30021-74-0	$\gamma$ -Muroleno	9,716
6	1,68%	30021-74-0	$\gamma$ -Muroleno	10,371

7	4,49%	495-61-4	$\beta$ -Bisaboleno	10,552
8	1,55%	39029-41-9	R- $\gamma$ -Cadineno	10,763
9	5,13%	483-76-1	$\delta$ -Cadineno	10,988
10	0,75%	25532-79-0	(E)- $\alpha$ -Bisaboleno	11,415
11	2,36%	472-07-1	Junenol	13,229
12	1,30%	19912-62-0	T-murulol	13,684
13	0,84%	19435-97-3	$\alpha$ -Murulol	13,768
14	1,40%	481-34-5	$\alpha$ -Cadinol	13,938
15	2,68%	21738-29-4	Copalol	16,814
16	0,93%	.	Kolavenol	17,257
17	1,32%	1438-62-6	13-epimanool	18,831
18	2,18%	.	Kolavelool	19,204
19	1,26%	1438-62-6	Degradação	20,214
20	3,39%	.	Degradação	20,388
21	0,78%	112-63-0	Degradação	20,551
22	0,70%	.	Degradação	21,744
23	0,94%	.	5-(7a-Isopropenil-4,5-dimetil-octahidroinden-4-il)-3-metil-pent-2-en-1-ol	22,069
24	5,17%	.	Éster metílico do ácido eperúico	22,386
25	7,11%	.	(S)-Etil 3-metil-5-((4aS,8aS)-2,5,5,8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftaleno-1-il)pentanoato	22,478
26	0,64%	.	Ciclohexano, 1,5,5-trimetil-6-acetilmetil	22,645
27	0,65%	.	(S)-Etil 3-metil-5-((1S,4aS,8aS)-2,5,5,8a-tetrametil-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)pentanoato	22,891
28	0,88%	.	Ácido eperúico	23,146
29	1,71%	.	Não identificado	23,291
30	7,92%	.	Éster metílico do ácido copálico	23,583
31	4,18%	21738-29-4	Éster metílico derivado do ácido eperúico	24,108
32	4,61%	.	Metil kolavenato	24,267
33	0,96%	.	Metil kolavenato	24,662
34	4,38%	.	Hardwickiato de metila	25,370
35	0,63%	1259-10-5	Acetato de cicloartenol	27,136

36	1,83%	.	Não identificado	28,452
37	2,15%	.	1.alfa.-(Acetoximetil)- 7.alfa.,8.alfa.-dimetil-7- (2-(3- fúril)etil)biciclo(4.4.0)de c-2-eno-2-carboxílico ácido metil ester	29,455

CAS: número de registro químico; Rt: tempo de retenção.

A presença do éster metílico linoleato de metila, derivado do ácido graxo do ácido linoléico (éster metílico 10-trans,12-cis-octadecadienoato), confirma a presença de diluentes adulterantes, uma vez que não são característicos de espécies de copaíba. Dois isômeros de ácido linoléico conjugado (ALC) foram descobertos por Pariza *et al.*, (2001), o 9-cis,11-trans-octadecadienoato e o 10-trans,12-cis-octadecadienoato, que são biologicamente ativos, com esqueletos químicos semelhantes ao éster metílico 10-trans,12-cis-octadecadienoato, que também é um isômero derivado de ácido linoléico.

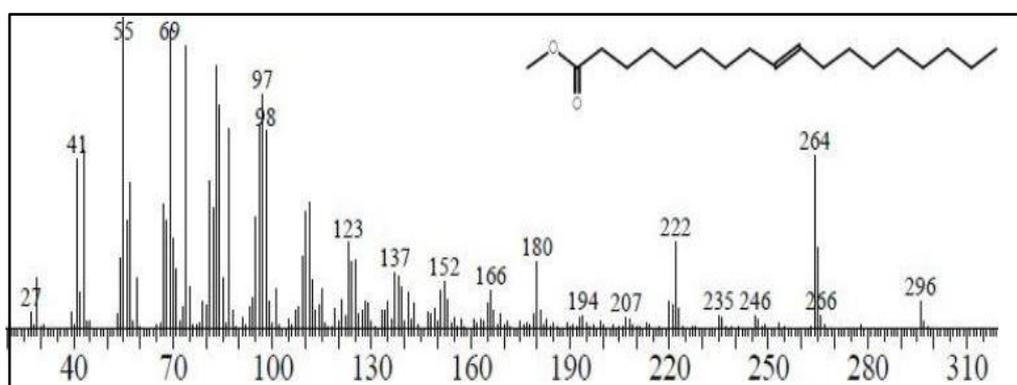


Figura 12. Espectro de massas do ácido graxo metil linoleato obtido do resíduo de copaíba.

A presença do éster metílico linoleato de metila, derivado do ácido graxo do ácido linoléico (éster metílico 10-trans,12-cis-octadecadienoato), indica a presença de diluentes adulterantes, uma vez que não são característicos de espécies de copaíba. A composição química observada neste trabalho foi semelhante às pesquisas anteriores como de Veiga *et al.*(2007), Cascon e Gilbert (2000) e Pasquel-Reategui *et al.*(2022), que encontraram majoritariamente o  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -bergamoteno, germacreno D e  $\alpha$ -humuleno com pequenas variações na composição química consequentes da sazonalidade ou da mistura dos óleos essenciais com outras espécies.

Outros óleos podem ser adicionados durante o processamento da oleorresina quando obtidas ou provenientes do processo de destilação. Segundo Barbosa, Yoshida e Scudeller (2009), a adulteração desses óleos pode ser feita tanto com a adição de óleos

vegetais como óleo de soja e mineral, quanto pela adição de óleos vegetais de sabor semelhante obtidos de espécies de outro gênero ou família.

#### 4.2 Perfil químico do resíduo de *Protium*

Por meio da análise direta dos cromatogramas (Figura 13) e dos espectros de massas, foi possível determinar as regiões dos compostos voláteis e compostos triterpênicos, cujas identificações são apresentadas na tabela 3. O perfil químico do resíduo da resina de *Protium*, obtido por CG/EM nas condições do padrão de n-alcenos revelou um total de doze (12) constituintes em sua composição química.

Os constituintes foram classificados em três (3) monoterpenos (44%), dois (2) sesquiterpeno (16,91%), dois (2) triterpenos (14,05) e outras substâncias (24,62%). O monoterpeno p-Cimeno (37,94%) foi o constituinte majoritário, seguido do sesquiterpeno Junenol (14,61%) e do triterpeno Lupeol (9,71%).

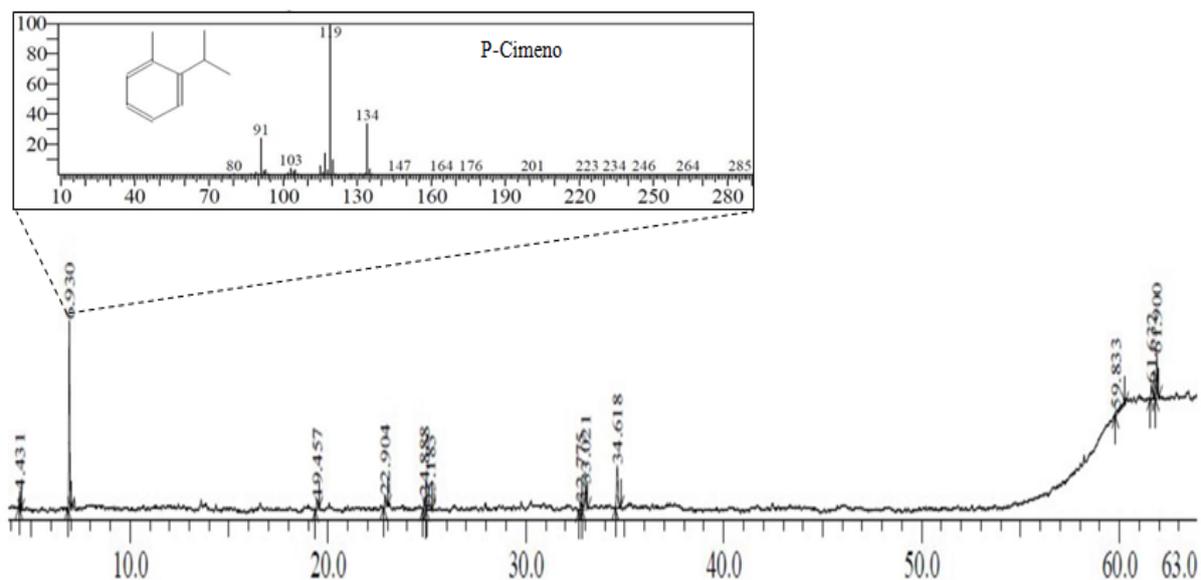


Figura 13: Perfil cromatográfico obtido a partir das condições do padrão de alcanos com ampliação do espectro de massa do p-Cimeno.

Tabela 3: Compostos voláteis identificados no resíduo de *Protium* a partir do índice de retenção do padrão de alcanos C<sub>10</sub>-C<sub>17</sub>.

Pico	Área %	CAS	Substância	Rt	IR	IR Ref.	Ref.
1	2,69%	80-56-8	$\alpha$ -Pinoeno	4,431	1251	932	Adams, 2007
2	37,94%	527-84-4	p-Cimeno	6,930	1371	1022	Adams, 2007
3	3,37%	499-75-2	Carvacrol	19,457	1400	1298	Adams, 2007
4	3,41%	3856-25-5	Copaeno	22,904	1416	1374	Adams, 2007
5	3,67%	5888-52-8	1,2-Dimetoxi-4-n-	24,888	1572	.	.

			propilbenzeno				
6	3,54%	55955-53-8	(4R,5R)-4-hidroxi-5-isopropil-2-metilciclo	25,183	1577	.	.
7	2,30%	6750-60-3	Espatulenol	32,775	1611	1577	Adams, 2007
8	9,04%	134-62-3	Dietiltoluamida	33,021	.	.	TGSC
9	14,61%	472-07-1	Junenol	34,618	.	.	TGSC
10	5,37%	.	Hexasiloxano, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11-dodecametil	59,833	.	.	.
11	4,34%	515-03-7	Esclareol	61,632	.	.	TGSC
12	9,71%	545-47-1	Lupeol	61,900	.	.	TGSC

CAS: número de registro químico; Rt: tempo de retenção; IRL: índice de retenção linear; IRL Ref: índice de retenção linear de referência; Ref: referência de identificação.

Os monoterpenos da série p-mentano são os mais comuns em oleorresinas de Burseraceae. O p-cimeno (p-isopropiltolueno) é um hidrocarboneto monocíclico monoterpeno, encontrado como composto principal em OEs de várias espécies de plantas aromáticas, como as do gênero *Protium* (Burseraceae), tendo sido relatada em grande parte da literaturade Burseraceae como componente da fração volátil (VEIGA JUNIOR, SIANI e RÜDIGER, 2007).

Silva *et al.* (2021) avaliaram o perfil químico de *Protium hebetatum* Daly, que apresentou apenas cinco (5) constituintes, sendo o p-cimeno o composto majoritário (59,4%). Na caracterização por CG-EM realizada por Balahbib *et al.*(2021), o p-cimeno foi o segundo constituinte mais abundante no óleo essencial de *P. heptaphyllum*, seguido do p-cimen-8-ol, monoterpenos esses que foram observados tanto nos óleos essenciais quanto em oleorresinas envelhecidas. Ainda segundo Balahbib e colaboradores (2021), o conteúdo de p-cimeno costuma ser alto em oleorresinas envelhecidas.

Uma das hipóteses que explica a alta concentração de p-cimeno é de que ele surge a partir de uma oxidação do monoterpeno terpinoleno e o p-cimen-8-ol surge a partir de uma subsequente oxidação do p-cimeno. Outros dados da literatura corroboram essa hipótese, afirmando que o p-cimeno e o p-cimen-8-ol são produtos da oxidação e conversão do terpinoleno, sendo o p-cimeno, também identificado como produto da isomerização do terpinoleno.

O  $\alpha$ -Pino (2,69%) é um dos monoterpenos mais comuns entre as espécies do gênero *Protium*. No estudo de Oliveira *et al.* (2016), as espécies *P. strumosum* e *P. heptaphyllum* apresentaram o  $\alpha$ -Pino como constituinte majoritário. Já o *P. strumosum* apresentou o p-cimeno em maior quantidade. Nas análises realizadas por Araujo *et al.*(2011), o  $\alpha$ -Pino também foi o composto majoritário identificado para *P. heptaphyllum*.

Cabral e colaboradores (2020) caracterizaram o óleo essencial das folhas de *P. heptaphyllum*, no qual  $\beta$ -elemeno o spatulenol e o  $\alpha$ -cubebeno foram os compostos majoritários, sendo o spatulenol também identificado no resíduo resinoso de breu. No estudo de Rocha *et al.*(2022), destaca-se a variabilidade química que existe tanto na concentração como na presença de componentes diversos entre os exemplares de *P. heptaphyllum* que foram coletados em diferentes regiões.

O triterpeno pentacíclico de esqueleto lupano, o Lupeol (9,71%), foi a terceira substância mais abundante no resíduo resinoso de breu. No estudo de Merali *et al.*(2018), a resina foi analisada por CLAE-EM, na qual as folhas de *P. Copal* apresentaram uma alta concentração de Lupeol. Grande parte dos estudos com o gênero *Protium* caracteriza o óleo essencial (constituído majoritariamente de monoterpenos), enquanto os estudos com os triterpenos focam em análises com as substâncias isoladas.

Albino *et al.*(2017) utilizaram diferentes métodos de cromatografia para caracterizar e diferenciar quimicamente as oleorresinas de espécies da família Burseraceae conhecidas popularmente por breu-preto e breu-branco. Na análise por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE-EM), ambas mostraram um pico correspondente ao Lupeol.

Na análise realizada com as condições de maior varredura (Figura 14), os triterpenos estiveram majoritariamente presentes, sendo a  $\beta$ -amirona (27,54%),  $\alpha$ -amirina (18,30%) e Acetato de  $\beta$ -amirina (11,27%) correspondendo a 57% da amostra do resíduo (Tabela 4), apresentando resultados semelhantes a estudos anteriores, como de Sussunaga (1996), em que a resina apresentou alto conteúdo de triterpenos, sendo a amirina compondo 40,98%.

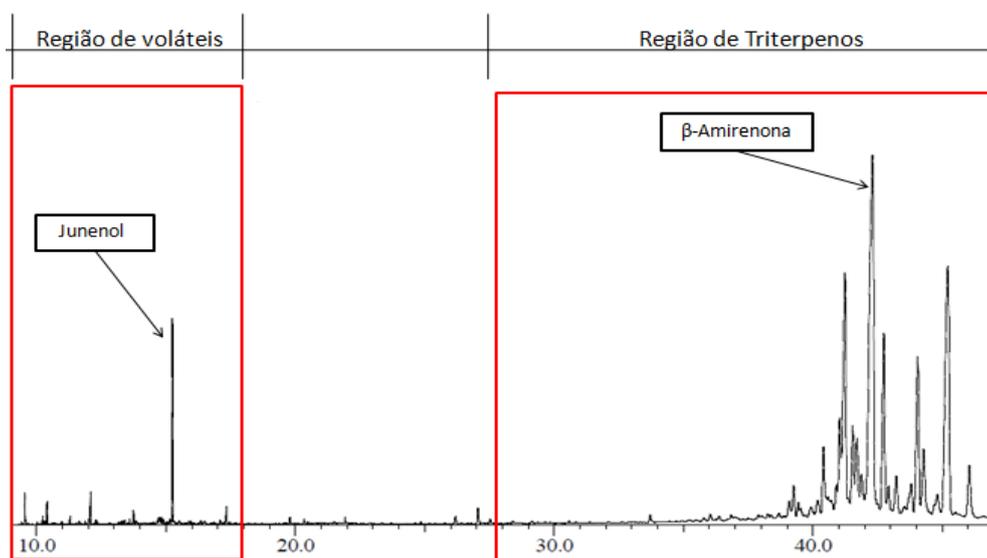


Figura 14: Regiões de eluição da composição volátil e triterpênica do resíduo de *Protium* nas condições de maior abrangência do CG-EM.

Tabela 4: Composição química presente no extrato residual de *Protium* a partir das condições de maior varredura do CG-EM.

Pico	Área %	CAS	Substância	Rt
1	0,38%	89-81-6	Piperitona	9552
2	0,25%	499-75-2	Carvacrol	10,401
3	0,38%	.	Ácido benzoico, 4-hidroxi-3-propil-	12,097
4	2,80%	472-07-1	Junenol	15,256
5	0,32%	1617-70-5	Lupenona	27,065
6	0,46%		13,27-Cicloursan-3-ona	39,065
7	1,03%	.	Ursa-9(11),12-dien-3-ona	39,249
8	2,01%	.	Ursa-9(11),12-dien-3-ona	40,409
9	0,73%	1617-70-5	Lupenona	40,901
10	3,60%	.	2,6,6,9,2',6',6',9'-Octametil-[8,8']bi[tricyclo[5.4.0.0(2,9)]undecil]	41,040
11	11,27%	1616-93-9	Acetato de $\beta$ -amirina	41,241
12	3,09%	1617-70-5	Lupenona	41,542
13	2,79%	559-70-6	$\beta$ -amirina	41,702
14	1,28%	.	Alopregnan-20-ol-3-one acetato	41,870
15	27,54%	638-96-0	$\beta$ -amirenona	42,298
16	7,57%	638-95-9	$\alpha$ -amirina	42,741
17	0,87%	1617-68-1	3-acetil lupeol	42,927
18	1,50%	.	24-Norursa-3,12-dieno	43,225
19	0,55%	863-76-3	Acetato de $\alpha$ -amirina	43,795
20	7,61%	1616-93-9	Acetato de $\beta$ -amirina	44,051
21	3,09%	1617-68-1	3-acetil lupeol	44,280
22	18,30%	638-95-9	$\alpha$ -amirina	45,211
23	2,58%	559-74-0	Friedelano	46,047

CAS: número de registro químico; Rt: tempo de retenção.

#### 4.3 Atividade citotóxica (MRC-5)

O símbolo (\*) indica diferença estatisticamente significativa pelo teste ANOVA e de Tukey em  $p < 0,05$ , denotando uma estatística significativa da amostra de *protium* quando comparada ao controle nos tempos de exposição avaliados. Os resíduos da extração do óleo essencial de *Protium* e Copaíba foram testados para citotoxicidade na linhagem celular de fibroblastos (MRC-5). A viabilidade foi testada na concentração máxima de 100  $\mu\text{g/mL}$  e avaliadas em três tempos (24h, 48h e 72h), conforme os gráficos da figura 15. Para a amostra de *Protium* que apresentou redução da viabilidade inferior a 80%, foi aberta uma curva de crescimento na faixa de concentração de 1,5625-100  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 16).

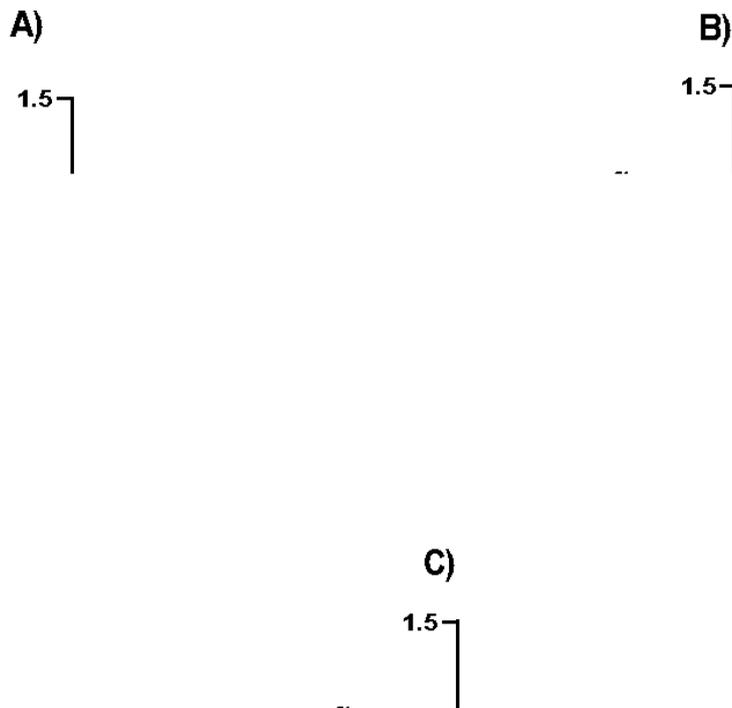


Figura 15: Citotoxicidade dos resíduos da extração do OE de *Protium* e Copaíba frente a linhagem celular de fibroblastos MRC-5 avaliados em 24h (gráfico A), 48h (gráfico B) e 72h (gráfico C).

O resíduo de Copaíba apresentou estatística não significativa quando comparado ao controle. O gráfico da citotoxicidade na linhagem celular MRC-5 contendo o resíduo de Copaíba demonstrou faixa de segurança nos três tempos analisados. Em 24h e 48h de exposição, as células se mantiveram com 100% de viabilidade, apresentando redução de 15% após 72h de incubação. Mesmo com a redução entre os dois últimos tempos de exposição ao resíduo de copaíba, as células mantiveram boa viabilidade celular. Portanto, o resíduo industrial da oleorresina de copaíba não apresentou citotoxicidade significativa frente as células não tumorais de fibroblastos MRC5.

Resultados semelhantes foram encontrados por Rodrigues *et al.*(2023) para óleo de copaíba pelo ensaio MTT na linhagem celular A549, no qual a amostra apresentou biocompatibilidade na mesma concentração analisada neste trabalho, sendo de 100µg/mL. No estudo de Masson-meyers (2013), a oleorresina de *Copaifera langsdorffii* não foi tóxica para os fibroblastos 3T3 em concentrações tão altas quanto 100 µg/mL. Vargas e

colaboradores (2015) testaram a viabilidade celular dos ácidos diterpênicos das oleorresinas de *copaifera* spp. nas células 3T3-L1 a 5 mg/mL, que não apresentaram redução significativa na viabilidade após 24 horas de tratamento.

A maior parte dos estudos realizados com a citotoxicidade do OE de copaíba apresentou baixa toxicidade a uma concentração de 100 µg/mL em células não tumorais, resultado encontrado também para o resíduo da extração do OE avaliado no presente estudo. Estudos de citotoxicidade com isolados de sesquiterpenos e ácidos diterpênicos de copaíba também obtiveram resultados promissores, o que permite atribuir a baixa toxicidade aos sesquiterpenos e diterpenos majoritariamente encontrados nos OE de copaíba (LIMA *et al.*, 2003).

O resíduo de *Protium* apresentou viabilidade celular de 93% em 24h, com redução significativa em 48h e em 72h, sendo altamente tóxico para fibroblastos (MRC5). Uma curva de concentração foi aberta para avaliar concentrações menores do resíduo de *Protium*, demonstrada no gráfico da figura 16.

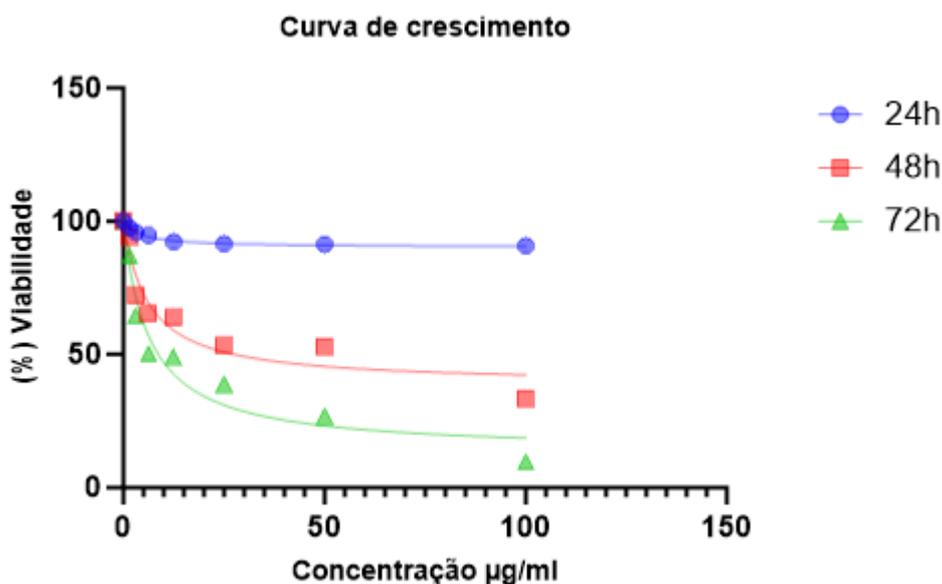


Figura 16: Curva de crescimento do resíduo de *Protium* nas concentrações de 1,5625-100 µg/mL.

A inibição da concentração em 50% ( $IC_{50}$ ) foi de 4,252 µg/mL em 24h,  $IC_{50}=6,152$  µg/mL em 48h e  $IC_{50}=6,458$  µg/mL em 72h. No primeiro tempo de exposição (gráfico A) ao resíduo de *Protium*, as células se mantiveram viáveis em todas as concentrações testadas, com redução não significativa da viabilidade celular. Em 48h (gráfico B), o resíduo de *Protium* apresentou toxicidade significativa em todas as concentrações, exceto em 1,5625µg/mL, no qual manteve 94% das células viáveis. No último tempo avaliado (gráfico C), a concentração de 1,5625µg/mL apresentou boa viabilidade, com 87% das

células viáveis. Portanto, o resíduo industrial de *Protium* se apresentou citotóxico para todas as concentrações testadas, com média viabilidade na menor concentração avaliada.

O resultado encontrado está de acordo com os de Almeida e colaboradores (2015), que demonstraram os efeitos citotóxicos dos triterpenos  $\alpha$ ,  $\beta$ -amirina, breína/maniladiol em células de macrófagos murinos J774, que apresentaram redução na viabilidade dos macrófagos, apresentando  $IC_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$ , exceto o triterpeno breína/maniladiol que apresentaram  $IC_{50} = 16,02 \mu\text{g/mL}$  em 24 horas de tratamento, enquanto o resíduo apresentou  $IC_{50} = 4,252 \mu\text{g/mL}$  em 24h.

#### 4.4 Atividade citotóxica (HEPG2)

Os resíduos foram avaliados frente às células do denocarcinoma do fígado HEPG-2 na faixa de concentração de 1,5625-100  $\mu\text{g/mL}$  em três tempos de exposição (24h, 48h e 72h), conforme a figura 17. Os efeitos citotóxicos revelados pelos resíduos de copaíba e de *Protium* destacam a importância dos testes de citotoxicidade para a pesquisa e desenvolvimento de moléculas com potenciais atividades biológicas. A análise permite identificar a concentração eficaz em causar 50% de morte celular ( $IC_{50}$ ), informação que se torna crucial para a determinação da concentração a ser utilizada na condução de outros estudos.

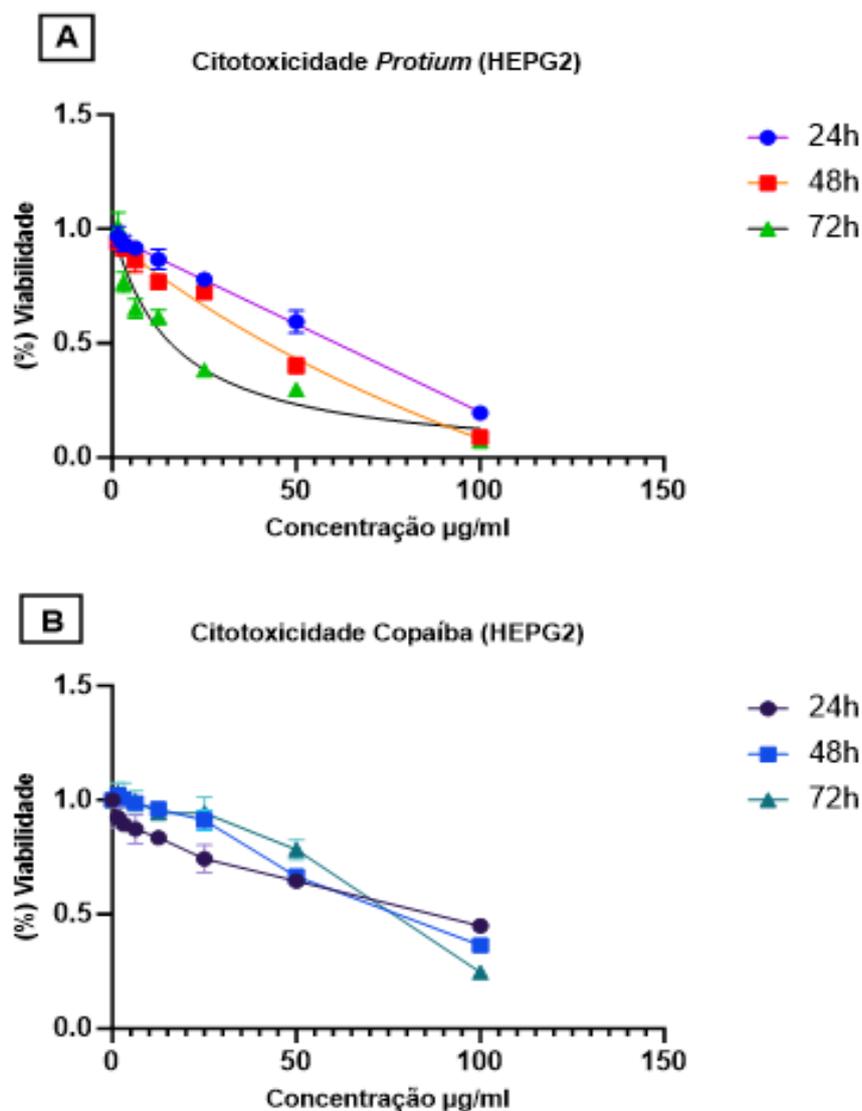


Figura 17. Citotoxicidade do resíduo de *Protium* (Gráfico A) e do resíduo de Copaíba (Gráfico B) contra a linhagem celular HEPG2.

O resíduo de copaíba apresentou  $IC_{50}$  variando entre os tempos de 24h, 48h e 72h de 94 µg/mL a 72 µg/mL indicando baixa toxicidade para as células tumorais, enquanto o resíduo de *Protium* apresentou moderada toxicidade em 24h e 48h, com  $IC_{50}$  de 57 µg/mL e 41 µg/mL, respectivamente, e maior toxicidade em 72h com  $IC_{50}$  de 14 µg/mL. O resíduo de *Protium* foi altamente citotóxico tanto para a linhagem não tumoral de fibroblastos (MRC5) quanto tumoral de HEPG2 na concentração de 100µg/mL. O resíduo de copaíba apresentou baixa toxicidade frente às células tumorais HEPG2, indicando maior seletividade para linhagem não tumoral. Já o resíduo de *Protium* foi moderadamente citotóxico para a mesma linhagem e concentração avaliadas, indicando ausência de seletividade para ambos os resíduos avaliados.

Vários estudos trataram das propriedades citotóxicas e anticancerígenas do oleorresina de copaíba, suas frações e compostos puros. Barbosa e colaboradores (2019)

isolaram seis diterpenos ácidos, dentre eles o ácido caurenóico e kolavenico, que não apresentaram atividade tóxica com IC<sub>50</sub> de 59,4 µg/mL e 68,9 µg/mL, respectivamente, para a linhagem HEPG2. Resultado diferente foi encontrado no presente estudo, no qual o IC<sub>50</sub> do resíduo de copaíba em 72h de exposição foi 72 µg/mL contra a mesma linhagem tumoral, mas sem atividade significativa.

O ácido ent-caurenico e seis outros ácidos diterpênicos também fizeram parte de um estudo de citotoxicidade em quatro linhagens de células tumorais, mas nenhum dos compostos mostrou atividade significativa (TINCUSI *et al.*, 2002). Em dois estudos sobre o potencial citotóxico do ácido ent-caurenico, descobriu-se que o composto era ativo contra células leucêmicas (CEM), bem como células de câncer da mama (MCF7) e câncer do cólon (HCT-8), no entanto a atividade não foi considerada seletiva (COSTA- LOTUFO *et al.*, 2002; CAVALCANTI *et al.*, 2009).

KUBO e colaboradores (1996) observaram que o sesquiterpeno β-cariofileno foi ativo contra células HeLa, BT-20, B-16 e HTB, com valores de IC<sub>50</sub> variando de 3,86 a 4,86 µg/mL. Os valores de IC<sub>50</sub> observados foram muito superiores, sendo ineficaz contra a linhagem HEPG2. A atividade antitumoral foi atribuída à presença do β-cariofileno, que, no presente estudo, apresentou quantidade relativamente pequena, uma possível razão para a baixa atividade *in vitro* do resíduo da oleorresina de copaíba.

Lima e colaboradores (2014) avaliaram a viabilidade celular da resina de *P. heptaphyllum* pelo método de MTT contra células do adenocarcinoma mamário (MCF-7) que não exibiu citotoxicidade significativa a uma concentração de 40 µg/mL, sendo um resultado diferente do observado para o resíduo de *Protium*, que apresentou toxicidade em 25 µg/ml após 72h.

#### 4.5 Atividade enzimática

##### 4.5.1 α-glicosidase

Os resultados da análise de inibição da enzima α-glicosidase são expressos em porcentagem de inibição (%). A concentração das amostras dos resíduos de *protium* e copaíba foram de 10µ/mL e 100µ/ml e do controle positivo Acarbose foi de 1 mg/mL. Pelos resultados obtidos, verifica-se que os resíduos não apresentaram resultados satisfatórios para inibição da enzima α-glicosidase, uma vez que os valores encontrados são inferiores a 10% (0,8 ± 0,1 e 0,5 ± 0,2, respectivamente).

Tabela 6: Atividade inibitória da α-glicosidase dos resíduos de copaíba e *Protium*.

Amostra	Inibição (%)
<b>RCOP</b>	0,5 ± 0,2
<b>RPRO</b>	0,8 ± 0,1
<b>RCOPd</b>	0,7 ± 0,2
<b>RPROd</b>	1,3 ± 0,3
<b>ACARBOSE</b>	65,3 ± 0,6

Legenda: Acarbose é o controle positivo; RCOP: resíduo de copaíba 100µ/mL; RPRO: resíduo de *Protium* 100µ/mL; RCOPd: 10µ/mL; RPROd: 10µ/mL.

Oliveira *et al.*(2005) avaliaram o efeito dos extratos etanólico, butanólico e aquoso de carqueja em concentrações superiores aos testados no presente estudo, sobre a glicemia de ratos diabéticos e não diabéticos e constataram que apenas a fração aquosa de *Baccharis trimera* (2000mg/kg, duas vezes por dia) reduziu a glicemia após um tratamento de sete dias.

O extrato etanólico das cascas de *Allamanda blanchetti* (Apocynaceae), espécie nativa do Cerrado, demonstrou percentual de inibição da  $\alpha$ -glicosidase 33,57±0,065%, valor superior ao apresentado pelos resíduos de *Protium* e copaíba, que não apresentaram inibição (SOUZA, 2011).

#### 4.5.2 Lipase

Tanto o resíduo de *Protium* quanto de copaíba não apresentaram resultados promissores em inibir a ação da enzima lipase. As porcentagens de inibição enzimática obtida nas concentrações testadas não foram eficientes quando comparadas ao controle positivo utilizado (Orlistat 93,2 ± 1,1%).

Tabela 5: Atividade inibitória da lipase pancreática dos resíduos de copaíba e *Protium*.

Amostras	Inibição (%)
<b>RCOP</b>	5,5 ± 1,8
<b>RPRO</b>	4,6 ± 1,3
<b>RCOPd</b>	3,4 ± 1,1
<b>RPROd</b>	0,3 ± 0,8
<b>ORLISTRAT</b>	93,2 ± 1,1

Orlistat é o controle positivo; RCOP: resíduo de copaíba 100 µ/mL; RPRO: resíduo de *Protium* 100 µ/mL; RCOPd: 10µ/mL; RPROd: 10µ/mL.

Souza (2009) avaliou a capacidade das cascas de *Malus communis* (Rosaceae) em inibir a ação da enzima lipase. Foi determinado que o extrato metanólico das cascas da

espécie apresentou um percentual de inibição de  $24,1 \pm 0,08$ , com baixo percentual de inibição enzimática, mas superior ao encontrado para os resíduos de *Protium* e Copaíba.

Ferreira (2018) encontrou resultados promissores em inibir a ação da enzima lipase para a fração em diclorometano das cascas de *C. sessilis* ( $71,2 \pm 10,7\%$ ), além de resultados tão eficientes para acetato de etila das cascas ( $98,4 \pm 2,1\%$ ) quanto o controle positivo (Orlistat  $94,5 \pm 8,3\%$ ).

#### 4.5.3 Atividade antimicrobiana

Como não existe um padrão sobre o nível aceitável para determinar a eficácia de um extrato, utilizou-se como critério para a determinação da atividade antimicrobiana a presença de halo de inibição igual ou superior a 5 milímetros (AL-HEBSHI *et al.*, 2006; OSTROSKY *et al.*, 2008).

A avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) é realizada após o teste de triagem denominado difusão em Ágar/antibiograma e, em caso de viabilidade, as amostras são avaliadas novamente. Em relação à atividade antibacteriana, os resíduos de *Protium* e Copaíba não apresentaram ação frente aos isolados Gram-negativos (Tabela 7). O resíduo de *Protium* não apresentou atividade frente aos Gram-positivos (Tabela 8), enquanto o resíduo de copaíba apresentou ação apenas frente à *Streptococcus mutans*.

Tabela 7: Avaliação da atividade antimicrobiana dos resíduos de Copaíba e *Protium* frente a bactérias Gram-positivas.

-	Gram-positivas				
	ATCC 4083 <i>S. faecalis</i>	ATCC 25175 <i>S. mutans</i>	ATCC 80958 <i>S. aureus</i>	ATCC 33591 MRSA	ATCC 27851 <i>S. simulans</i>
Copaíba	-	15 mm	-	-	-
<i>Protium</i>	-	-	-	-	-
TIENAM	28 mm	31 mm	-	-	-
OXA	-	-	$25 \pm 0,59$	$26 \pm 0,59$	$27 \pm 0,59$

(-) sem atividade, ATCC 4083 (*Streptococcus faecalis*), ATCC 25175 (*Streptococcus mutans*), ATCC 80958 (*Staphylococcus aureus*), ATCC 33591 (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) e ATCC 27851 (*Staphylococcus simulans*).

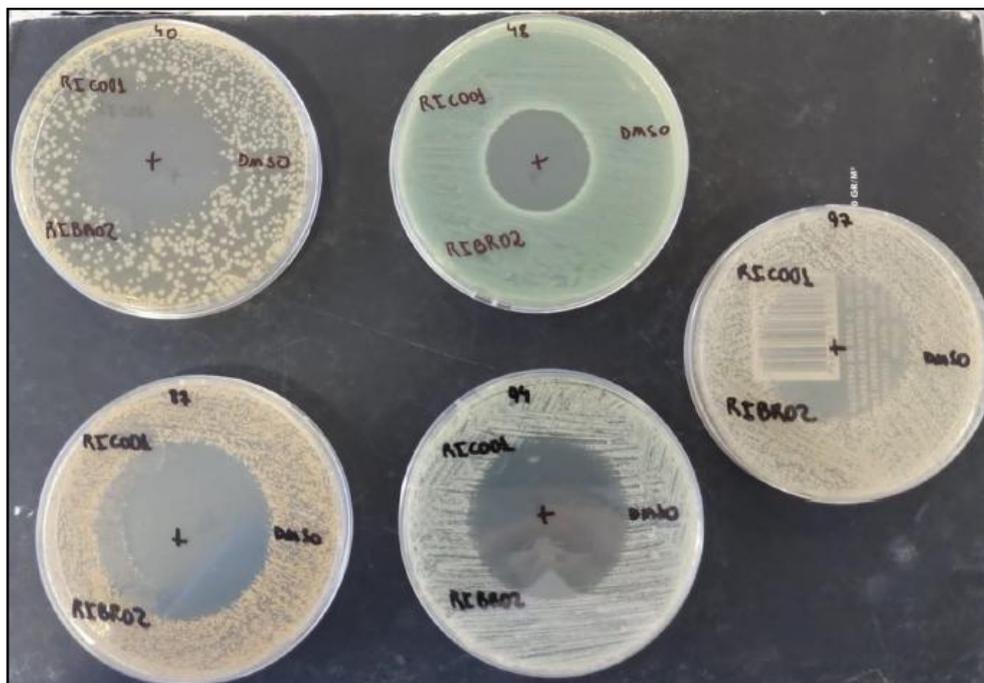


Figura 18: Atividade antibacteriana das amostras RICO01 e RIBR02 pelo método de difusão ágar. *Proteus* (40), *P. aeruginosa* (48), *S. aureus* (87), *S. sumulans* (94) e MRSA (97).

No estudo de Silva Moraes e colaboradores (2020), a oleorresina de *C. pubiflora* foi testada contra patógenos bucais, sendo determinados os valores de CIM e CBM, que foram iguais para a maioria das bactérias aeróbias testadas, incluindo *S. mutans* e *E. faecalis*, que apresentaram CIM de 25µ/mL. No presente estudo *S. mutans*, foi sensível ao resíduo de copaíba, apresentando um halo de inibição de 15 mm, mas não apresentou inibição frente a *E. faecalis*.

Diversos estudos relatam a eficiência da oleorresina de *C. officinalis* em diferentes concentrações frente a *S. aureus*. Enquanto para o resíduo da extração do OE de copaíba não apresentou inibição. Gondim (2023) obteve eficiência a uma concentração inibitória mínima de 100µ/mL, enquanto as cepas inoculadas por Santos *et al.*(2020) apresentaram atividade sob concentrações entre 62,5 e 125 µL/mL. Já Mendonça e Onofre (2009) abordaram eficiência antibacteriana sob CIM igual a 3,12%.

Outro estudo que corrobora com os resultados encontrados para o resíduo de Copaíba neste trabalho é o apresentado por Santos e colaboradores (2008), que confirma a atividade bactericida da oleorresina de *C. reticulata* Ducke frente as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. aureus* meticilina resistente (MRSA). É fundamental ressaltar que variações nas concentrações dos metabólitos na composição química dos resíduos, a degradação dos mesmos e as diferenças dentro das espécies podem estar relacionados aos diferentes resultados obtidos pelos diversos estudos. Nascimento e colaboradores (2007) demonstraram, em seu trabalho, a atividade antimicrobiana do β-bisaboleno frente à

*Staphylococcus aureus* e que a sinergia com os  $\beta$ -lactâmicos pode ser eficaz frente a cepas  $\beta$ -lactamase positivas.

Tabela 8: Avaliação da atividade antimicrobiana dos resíduos de Copaíba e *Protium* frente a bactérias Gram-negativas.

Amostras	Gram-negativas					
	CDC EDL-1284 <i>P. aeruginosa</i>	ATCC 10536 <i>E. coli</i>	ATCC E234869 <i>E. coli</i> (EPEC)	ATCC 15175-113 <i>P. putida</i>	ATCC 13311 <i>S. typhimurium</i>	ATCC 15290-095 <i>P. mirabilis</i>
Copaíba	-	-	-	-	-	-
<i>Protium</i>	-	-	-	-	-	-
TIENAM	16±0,60	22 mm	22 mm	21 mm	28 mm	19±0,59
OXA	-	-	-	-	-	-

(-) sem atividade, CDC EDL-1284 (*Pseudomonas aeruginosa*), ATCC 10536 (*Escherichia coli* não diarreicogênica), ATCC E234869 (*Escherichia coli* enterotoxigênica típica (EPEC), ATCC 15175-113 (*Pseudomonas putida* (oralis), ATCC 13311 (*Salmonella typhimurium*) e ATCC 15290-095 (*Proteus mirabilis*).

Santos e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes espécies do gênero *Copaifera* através da técnica de diluição em poço, no qual a oleorresina das oito espécies foi inativa frente aos isolados Gram-negativos, sendo o mesmo resultado encontrado neste trabalho para o resíduo da copaíba.

Mendonça e Onofre (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana da *C. multijuga* Hayne também pela técnica de difusão em disco frente as cepas Gram-negativas de *E. coli*, *P. aeruginosa*. A oleorresina foi eficiente em todos os isolados, com maior halo de inibição de 12±2,23mm apresentado para o isolado de *E. coli* na concentração de 100%. Resultado semelhante também foi obtido para *Pseudomonas aeruginosa*, no qual o crescimento foi inibido concentração de 100% da oleorresina formando um halo de inibição de 13±1,97 mm. Ambos foram diferentes dos resultados encontrados para o resíduo de copaíba.

Santos e colaboradores (2020) avaliaram a oleorresina bruta, a fração de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e de diterpenos ácidos obtidos de *C. reticulata* frente aos isolados de *S. aureus*, *S. enterica* serovar Typhimurium, *L. monocytogenes* e *E. coli*, e observaram que tanto a oleorresina bruta quanto às frações obtidas inibiram somente a bactéria *S. aureus*, sendo as demais resistentes. Com exceção de *S. aureus*, os resultados para os demais isolados foram os mesmos obtidos para o resíduo da extração.

Santos e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antibacteriana das oleorresinas de *C. martii*, *C. officinalis* e *C. reticulatae* foram analisadas para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas boa atividade só foi observada contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus* resistentes à metilina, *Staphylococcus epidermidis*,

*Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*) com uma faixa de CIM de 62,5-125 µg/mL, sendo essas oleorresinas inativas contra bactérias gram-negativas.

As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas diferem nas suas paredes celulares, com as membranas externas das bactérias Gram-negativas agindo como uma barreira mais forte do que as bactérias Gram-positivas. A oleorresina de copaíba parece alterar a estrutura da parede celular bacteriana, como resultado, uma explicação plausível para a ausência de qualquer atividade contra bactérias Gram-negativas poderia estar relacionada à sua complexa morfologia das estruturas da parede celular (MASSON *et al.*, 2013).

O extrato hidroetanólico do exocarpo do fruto de *Protium spruceanum* foi avaliado frente aos isolados de *Staphylococcus aureus* (ATCC 9891), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) e *Escherichia coli* (ATCC 8739). O extrato apresentou alto potencial de inibição bacteriana sobre *S. aureus* e *E. coli*. Discreta inibição foi observada para *S. serovar* Enteritidis, enquanto *S. serovar* Typhimurium não foi possível verificar inibição antibacteriana em nenhuma das doses, demonstrando ser ineficaz. No presente estudo, o resíduo de *Protium* não apresentou atividade para nenhuma das cepas avaliadas, concordando com parte dos resultados encontrados por Menezes filho (2022).

Cabral e colaboradores (2020) testaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído das folhas de *P. heptaphyllum* frente à *Streptococcus mutans* (MIC = 50 mg/mL) e *S. mitis* (MIC = 62,5mg/mL), e os óleos da fruta verde e madura contra *Prevotella nigrescens* (ambos, MIC = 50 mg/mL), apresentando forte atividade, enquanto o resíduo não apresentou nenhuma ação de inibição aos isolados.

O resíduo apresentou como um dos compostos principais o p-cimeno, no qual uma variedade de estudos com compostos purificados demonstrou que esse monoterpene demonstrou inibição contra uma variedade de microrganismos. O efeito antimicrobiano do p-cimeno contra *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* e *Escherichia coli* foi determinado usando o ensaio de difusão em poço de ágar. Os resultados obtidos mostraram que esta molécula não tinha atividade antibacteriana (BAGAMBOULA *et al.*, 2004).

Outros estudos mostram o efeito biológico significativo do *P. spruceanum*, como o estudo de Amparo *et al.*(2018) utilizando o extrato etanólico dos galhos de *P. spruceanum* com boa eficácia sobre zonas de inibição maiores que 10 mm em 19 bactérias patogênicas, sendo este um extrato com alto potencial bacteriostático.

Silva *et al.*(2013) observaram a baixa atividade inibitória dos óleos essenciais comerciais de *Protium* spp. frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. As amostras

foram mais ativas testadas contra os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus Níger* com Valores de CIM iguais ou superiores a 2,5 mg/mL.

Bandeira e outros (2006) observaram que o óleo essencial de *P. heptaphyllum*, que contém terpinoleno (28,5%), limoneno (16,9%), -felandreno (16,7%) e -pineno (10,5%) foi ativo contra *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*. Estes resultados sugerem que a falta ou baixa concentração de monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados na composição destes óleos pode estar relacionada com a sua baixa atividade antimicrobiana (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Segundo alguns estudos, a atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais está relacionada a altas concentrações de compostos fenólicos, como fenilpropanóides (eugenol, metil-eugenol e 4-etil-guaiacol) e monoterpenos (timol e carvacrol), que não foram encontrados nos resíduos utilizados neste estudo.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na análise química entre as análises com as diferentes condições do CG-EM demonstraram que uma variedade de sesquiterpenos nos resíduos da destilação das oleorresinas de copaíba e de *Protium*. Os perfis obtidos foram semelhantes aos encontrados na literatura. O resíduo de *Protium* spp. apresentou como componente majoritário o p-Cimeno (37,94%), seguido do sesquiterpeno Junenol (14,61%) e do triterpeno Lupeol (9,71%). Enquanto o resíduo de copaíba apresentou o sesquiterpeno cariofileno como componente mais abundante, sendo também o biomarcador do gênero.

Os perfis cromatográficos também mostraram transformações químicas como degradações e oxidações resultantes do processo de destilação do óleo essencial, além de indicadores da presença de ácidos graxos na composição do resíduo de copaíba.

O resíduo de copaíba apresentou baixa citotoxicidade para as duas linhagens testadas, sendo um resultado promissor apenas para a linhagens não tumoral MRC5. O resíduo de *Protium* foi citotóxico para a linhagem não tumoral de MRC5, e altamente citotóxico para a linhagem tumoral de HEPG2, sendo um resultado viável para estudos posteriores.

Foi verificada a ação inibitória das enzimas digestivas dos resíduos para a enzima lipase pancreática e  $\alpha$ -glicosidase, no entanto não foram obtidos resultados significativos.

Com relação à atividade antibacteriana dos resíduos frente às cepas testadas, uma baixa atividade foi observada com pequeno halo formado pelo resíduo de copaíba para a *S. mutans*.

Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho reforçam que os resíduos apresentam potencial bioativo e que outras avaliações devem ser realizadas a fim de avaliar outras propriedades biotecnológicas, sendo uma fonte promissora para elaboração de bioprodutos.

## REFERÊNCIAS

ABESUNDARA, Kanthi JM; MATSUI, Toshiro; MATSUMOTO, Kiyoshi.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of some Sri Lanka plant extracts, one of which, *Cassia auriculata*, exerts a strong antihyperglycemic effect in rats comparable to the therapeutic drug acarbose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2541-2545, 2004.

ABRÃO, Fariza *et al.*, Antibacterial effect of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin and its main diterpenes against oral pathogens and their cytotoxic effect. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 201, 2018.

ADAMS, P., Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Allured Publishing, Carol Stream, IL, 4 ed., 2007.

AHMED, S. Ansar; GOGAL JR, Robert M.; WALSH, Jane E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

ALBINO, Rayane C. *et al.*, Oxidation of monoterpenes in *Protium heptaphyllum* oleoresins. **Phytochemistry**, v. 136, p. 141-146, 2017.

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

AL-HEBSHI, Nezar; AL-HARONI, Mohammed; SKAUG, Nils. In vitro antimicrobial and resistance-modifying activities of aqueous crude khat extracts against oral microorganisms. **Archives of oral biology**, v. 51, n. 3, p. 183-188, 2006.

AMPARO, Tatiane Roquete *et al.* Antibacterial activity of extract and fractions from branches of *Protium spruceanum* and cytotoxicity on fibroblasts. **Natural product research**, v. 32, n. 16, p. 1951-1954, 2018.

ANDRADE-CETTO, Adolfo; BECERRA-JIMÉNEZ, Jaime; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, René. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 27-32, 2008.

ARAÚJO, Deborah AO *et al.* Gastroprotective effects of essential oil from *Protium heptaphyllum* on experimental gastric ulcer models in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 721-729, 2011.

BAGAMBOULA, C. F.; UYTENDAELE, Mieke; DEBEVERE, Johan. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food microbiology**, v. 21, n. 1, p. 33-42, 2004.

- BALAHBIB, Abdelaali *et al.* Health beneficial and pharmacological properties of p-cymene. **Food and Chemical Toxicology**, v. 153, p. 112259, 2021.
- BANDEIRA, P. N. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of resin of *Protium heptaphyllum*. **Natural Product Communications**, v. 1, n. 2, p. 1934578X0600100207, 2006.
- BANDONI, Arnaldo *et al.* Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. **Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. Argentina**, v. 417, 2000.
- BARBA, Romina Ysabel Bazán; SANTOS, Nivaldo dos. A Bioeconomia no século XXI: Reflexões sobre Biotecnologia e Sustentabilidade no Brasil. **Revista de Direito e Sustentabilidade**, v. 6, n. 2, p. 26-42, 2020.
- BARBOSA, Anna Laís Pfeifer *et al.* Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. **Journal of ethnopharmacology**, v. 233, p. 94-100, 2019.
- BARBOSA, Karol de S.; YOSHIDA, Massayoshi; SCUDELLER, Veridiana V. Detection of adulterated copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil-resins by refractive index and thin layer chromatography. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 57-60, 2009.
- BARBOSA, Paula *et al.* 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, p. 1823-1833, 2012.
- BASTOS, I. S. *et al.* Silver tungstate microcrystals and their performance over several clinical multidrug resistant microorganisms. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 647, 20 ago. 2022.
- BIRARI, Rahul B.; BHUTANI, Kamlesh K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug discovery today**, v. 12, n. 19-20, p. 879-889, 2007.
- BIZZO, Humberto R.; HOVELL, Ana Maria C.; REZENDE, Claudia M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.
- BIZZO, Humberto R.; HOVELL, Ana Maria C.; REZENDE, Claudia M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química nova**, v. 32, p. 588-594, 2009. BIZZO, Humberto R.; REZENDE, Claudia M. O mercado de óleos essenciais no Brasil e no mundo na última década. **Química Nova**, v. 45, p. 949-958, 2022.
- BORGES, Carly HG *et al.* *Copaifera duckei* oleoresin and its main nonvolatile terpenes: in vitro schistosomicidal properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 10, p. 1348-1356, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 04 de maio de 2006a.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília: Diário Oficial, 5 de outubro de 1988.

BRASIL. Decreto nº. 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de junho de 2006b.

BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2010/Lei/L12305.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2010/Lei/L12305.htm)>. Acesso em: 20ago. 2023

BRASIL. Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015 (Lei da Biodiversidade). Disponível em:<[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2015-2018/2015/lei/l13123.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2015/lei/l13123.htm)>. Acesso em: 20/09/2022.

BRINK, Johan; MCKELVEY, Maureen; SMITH, Keith. Conceptualizing and measuring modern biotechnology. **Chapters**, 2004.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CABRAL, Rodrigo SC *et al.* Chemical composition of essential oils from different parts of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand and their in vitro antibacterial activity. **Natural Product Research**, v. 34, n. 16, p. 2378-2383, 2020.

CABRERA, A. *et al.* Estudio del efecto de la adición de alperujo sobre la persistencia de diuron en el cultivo del olivar. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 209-216, 2010.

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

CASSEL, E. *et al.* Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial crops and products**, v. 29, n. 1, p. 171-176, 2009.

CASSEL, Eduardo; VARGAS, Rubem M. Figueiró. Proceso industrial de destilación por arrastre a vapor de aceite esencial de romero. **Revista de investigacion**, v. 1, p. 11-18, 2008.

CAVALCANTI, B. C. *et al.* Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and chemical toxicology**, v. 44, n. 3, p. 388-392, 2006.

CAVALCANTI, Bruno C. *et al.* Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 7, p. 560-568, 2009.

CHANG, Shang-Tzen *et al.* Comparison of the antifungal activity of cadinane skeletal sesquiterpenoids from Taiwan (Taiwania cryptomerioides Hayata) heartwood. 2000.

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from Annona squamosa L. bark. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 149-151, 2010.

CHENG, Sen-Sung *et al.* Antitermitic and antifungal activities of essential oil of Calocedrus formosana leaf and its composition. **Journal of chemical ecology**, v. 30, p. 1957-1967, 2004.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. Fundamentos de cromatografia. In: **Fundamentos de cromatografia**. 2006. p. 453-453.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA, Resolução n.º 01 de 23 de janeiro de 1986. Elabora o Estudo de Impacto Ambiental -EIA e respectivo Relatório de Impacto Ambiental -RIMA. Diário Oficial da União. Brasília. 1986.

CORRÊA, Anderson Domingues; BATISTA, Rodrigo Siqueira; QUINTAS, Luis Eduardo M. Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica: contém formulação e modo de preparo de cosméticos. In: **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica: contém formulação e modo de preparo de cosméticos**. 2003. p. 247-247.

COSTA, A. F. Farmacognosia, V. 1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbeukian, 1975.

COSTABEBER, José Antônio; MOYANO, Eduardo. Transição agroecológica e ação social coletiva. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v. 1, n. 4, p. 50-60, 2000.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from Copaifera langsdorffii oleo-resin. **Toxicicon**, v. 40, n. 8, p. 1231-1234, 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, 60:52-60, 1997.

CRUZ, Áurea Silveira *et al.* Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 47, n. 1-2, p. 51-57, 1987.

DA SILVA MORAES, Thaís *et al.* Assessment of the antibacterial, antivirulence, and action mechanism of *Copaifera pubiflora* oleoresin and isolated compounds against oral bacteria. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 129, p. 110467, 2020.

DA SILVA, Eduardo R. *et al.* Essential oils of *Protium* spp. samples from Amazonian popular markets: chemical composition, physicochemical parameters and antimicrobial activity. **Journal of essential oil research**, v. 25, n. 3, p. 171-178, 2013.

DA SILVA, Kathryn AB Simão *et al.* Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyryn inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. **PAIN®**, v. 152, n. 8, p. 1872-1887, 2011.

DA SILVA, Kennedy Lima *et al.* Composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial da resina de *Protium hebetatum* Daly (Burseraceae). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 8, n. 2, p. 245-253, 2021.

DE ALENCAR CUNHA, K. M. *et al.* Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus in vitro. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 17, n. 4, p. 320-324, 2003.

DE ALMEIDA BORGES, Vinícius Raphael *et al.* Development of a high performance liquid chromatography method for quantification of isomers  $\beta$ -caryophyllene and  $\alpha$ -humulene in copaiba oleoresin using the Box-Behnken design. **Journal of Chromatography B**, v. 940, p. 35-41, 2013.

DE ALMEIDA, Patrícia *et al.* Anti-inflammatory activity of triterpenes isolated from *Protium paniculatum* oil-resins. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola**, v. 7, n. 1, 1998.

DE MENEZES FILHO, Antonio Carlos Pereira. Avaliação fitoquímica e atividades biológicas do extrato do exocarpo do fruto de *Protium spruceanum*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 10, n. 1, p. 034-043, 2022.

DE OLIVEIRA, Elaine Cristina Pacheco *et al.* Avaliação do óleo de copaíba (*Copaifera*) na inibição do crescimento micelial in vitro de fitopatógenos. 2006.

DE SMET, Peter AGM. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, v. 54, p. 801-840, 1997.

DE SOUZA, P. A. *et al.* Isolation of two bioactive diterpenic acids from *Copaifera glycyarpa* oleoresin by high-speed counter-current chromatography. **Phytochemical analysis**, v. 21, n. 6, p. 539-543, 2010.

DIAS, Rodnei Fagundes; DE CARVALHO, C. A. A. Bioeconomy in Brazil and in the world: current situation and prospects. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 410-430, 2017.

DINC, Kemal *et al.* The effect of carvacrol on the proinflammatory cytokines, histology, and fertility outcome of cisplatin-related ovarian change in a rat model. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 62, n. 2, p. 256-263, 2023.

DRON, Julien *et al.* Trimethylsulfonium hydroxide as derivatization reagent for the chemical investigation of drying oils in works of art by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, n. 1, p. 111-116, 2004.

FERREIRA, Alanna Evellin Alves *et al.* Atividade biológica e caracterização de compostos presentes nas folhas e cascas de *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze. 2018.

FLORES-SOTO, M. E. *et al.*  $\beta$ -Caryophyllene exerts protective antioxidant effects through the activation of NQO1 in the MPTP model of Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 742, p. 135534, 2021.

FREEMAN, Christopher. Inovação e ciclos longos de desenvolvimento econômico. **Ensaio FEE**, v. 5, n. 1, p. 5-20, 1984.

GONDIM, Renata Freire Alves; DA SILVA, Jaqueline Damos; DE SÁ SILVA, Claudileide. Aplicação de essencial de tea tree (*melaleuca alternifolia*) e óleo balsamo de copaíba (*copaifera officinalis*) no controle de *staphylococcus aureus* em carne de frango cozida. **CONTRIBUCIONES A LAS CIENCIAS SOCIALES**, v. 16, n. 5, p. 2531-2550, 2023.

GROVE, D. C.; RANDALL, W. A., 1955. Assay Methods of Antibiotic: a Laboratory Manual. Medical Encyclopedia, New York.

GUERRA, Miguel Pedro *et al.* Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 6, p. 13-28, 2001.

GUIMARÃES VASCONCELLOS, Alexandre *et al.* Research and patent of phytotherapeutic and phytocosmetic products in the Brazilian Amazon. **Journal of technology management & innovation**, v. 6, n. 4, p. 136-150, 2011.

HARRIS, D. C. Análise química quantitativa. **Rio de Janeiro: LTC Editora**, 2001.

- HARVEY, Alan. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug discovery today**, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.
- HASENCLEVER, Lia *et al.* A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559-2569, 2017.
- HE, Kan *et al.* Bioactive compounds from *Taiwania cryptomerioides*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 38-40, 1997.
- JUNG, Mankil *et al.* Antidiabetic agents from medicinal plants. **Current medicinal chemistry**, v. 13, n. 10, p. 1203-1218, 2006.
- JUNIOR, VF Veiga *et al.* Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 248-254, 2007.
- KAREN CARDOSO, Bruna *et al.* Antioxidant activity of  $\alpha$  and  $\beta$ -amyryn isolated from *Myrcianthes pungens* leaves. **Natural product research**, v. 34, n. 12, p. 1777-1781, 2020.
- KIM, Dae-Seung *et al.* Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF- $\kappa$ B pathway in mouse peritoneal macrophages. **The American journal of Chinese medicine**, v. 43, n. 04, p. 731-742, 2015.
- KNAPP, L. Fitoterapia abre novos campos de pesquisa. **Gazeta Mercantil**, v. 1, n. 6, 2001.
- KUBO, Isao *et al.* Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. **Planta médica**, v. 62, n. 05, p. 427-430, 1996.
- KUETE, Victor *et al.* Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (Ixonanthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 1, p. 54-60, 2007.
- KWUN, Min Seok; LEE, Ha Jung; LEE, Dong Gun.  $\beta$ -amyryn-induced apoptosis in *Candida albicans* triggered by calcium. **Fungal Biology**, v. 125, n. 8, p. 630-636, 2021.
- LANÇAS, Fernando M. Cromatografia em fase gasosa. **Revista de Química Industrial**, v. 55, n. 646, p. 12-5, 1986.
- LEANDRO, Lidiam Maia *et al.* Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3866-3889, 2012.

LI, Qingdi Quentin *et al.* Antineoplastic effect of  $\beta$ -elemene on prostate cancer cells and other types of solid tumour cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 8, p. 1018-1027, 2010.

LI, X. *et al.* Antiproliferative effect of  $\beta$ -elemene in chemoresistant ovarian carcinoma cells is mediated through arrest of the cell cycle at the G2-M phase. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 62, p. 894-904, 2005.

LI, Yuhao *et al.* Punica granatum flower extract, a potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 239-244, 2005.

LIMA, Ewelyne M. *et al.* Triterpenes from the Protium heptaphyllum resin-chemical composition and cytotoxicity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 399-407, 2014.

LIMA, Fabiana V. *et al.* Three new triterpenes from the resinous bark of Protium kleinii and their antinociceptive activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 578-582, 2005.

LIMA, Sylvia RM *et al.* In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of Copaifera multijuga Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 17, n. 9, p. 1048-1053, 2003.

LIU, Jing *et al.*  $\beta$ -Elemene-induced autophagy protects human gastric cancer cells from undergoing apoptosis. **BMC cancer**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2011.

LOŽIENĖ, Kristina *et al.* Influence of plant origin natural  $\alpha$ -pinene with different enantiomeric composition on bacteria, yeasts and fungi. **Fitoterapia**, v. 127, p. 20-24, 2018.

LUCAS, Aline Machado. **Estudo comparativo de extratos voláteis de eucaliptos geneticamente modificados e não geneticamente modificados**. 2011. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

LUNAGARIYA, Nitin A. *et al.* Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. **EXCLI journal**, v. 13, p. 897, 2014.

MARQUES, D.D.; SATORI, R.A.; LEMOS, T.L.G.; MACHADO, L.L.; SOUZA, J.S.N. MONTE, F.J.Q. Chemical composition of the essential oils from two subspecies of Protium heptaphyllum. *Acta Amazonica*, v. 40, n. 1, p. 227-230, 2010.

MASSON, D. S. *et al.* Antimicrobial activity of copaiba (Copaifera langsdorffii) oleoresin on bacteria of clinical significance in cutaneous wounds. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 664-669, 2013.

MASSON-MEYERS, D. S. *et al.* Cytotoxicity and wound healing properties of Copaifera langsdorffii oleoresin in rabbits. **Int. J. Nat. Prod. Sci**, v. 3, p. 10-20, 2013.

MCCHESENEY, James D.; CLARK, Alice M.; SILVEIRA, Edilberto R. Antimicrobial diterpenes of Croton sonderianus, 1. Hardwickic and 3, 4-secotrachylobanoic acids. **Journal of natural products**, v. 54, n. 6, p. 1625-1633, 1991.

MENDONÇA, Davidy Eduardo; ONOFRE, Sideney Becker. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba-Copaifera multijuga Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 577-581, 2009.

MENEZES FILHO. Avaliação fitoquímica e atividades biológicas do extrato do exocarpo do fruto de Protium spruceanum. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. v.10 n.1 (2022) 034-043. ISSN: 2179 - 4804. DOI:<https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v10n1.menezes>

MERALI, Zul *et al.* Sacred Maya incense, copal (Protium copal-Burseraceae), has antianxiety effects in animal models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 216, p. 63-70, 2018.

MICHELIN, D. C.*et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p. 316-320, 2005.

MITIDIARI, Thiago Leone *et al.* Há espaços competitivos para a indústria farmoquímica brasileira? Reflexões e propostas para políticas públicas. 2015.

NARARAK, Jirod *et al.* Excito-repellency and biological safety of  $\beta$ -caryophyllene oxide against Aedes albopictus and Anopheles dirus (Diptera: Culicidae). **Acta tropica**, v. 210, p. 105556, 2020.

NASCIMENTO, Andréa MA *et al.* Synergistic bactericidal activity of Eremanthus erythropappus oil or  $\beta$ -bisabolene with ampicillin against Staphylococcus aureus. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 92, p. 95-100, 2007.

NAZZARO, F. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, Basel, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

OCDE, O. p. a. C. e. D. E.A framework for biotechnology statistics. 2005

OLIVEIRA NETO, A. R. *et al.* O uso de Eleutherine plicata no tratamento de doenças gastrointestinais na Amazônia paraense. In: **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. 2007.

OLIVEIRA, Antônio Carlos P. *et al.* Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 465-469, 2005.

OLIVEIRA, Danilo R. *et al.* Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* HBK. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236-240, 2007.

OLIVEIRA, Danilo Ribeiro de *et al.* Report on the Malungo expedition to the Erepecuru river, Oriximiná, Brazil. Part I: is there a difference between black and white breu? **Volume 26, Pags. 647-656**, 2016.

ÖNAL, Seçil *et al.* Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 29-36, 2005.

OSTROSKY, Elissa A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

PAIVA, L. A. F. *et al.* Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 303-307, 2002.

PANDEY, Ramesh C. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources. **Medicinal research reviews**, v. 18, n. 5, p. 333-346, 1998.

PARIZA, Michael W.; PARK, Yeonhwa; COOK, Mark E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in lipid research**, v. 40, n. 4, p. 283-298, 2001.

PASQUEL-REÁTEGUI, José Luis *et al.* Fractionation of sesquiterpenes and diterpenic acids from copaiba (*Copaifera officinalis*) oleoresin using supercritical adsorption. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 184, p. 105565, 2022.

PERFEITO, João Paulo Silvério. O registro sanitário de medicamentos fitoterápicos no Brasil: uma avaliação da situação atual e das razões de indeferimento. 2012.

PIERI, Fabio Alessandro; MUSSI, Maria Carolina; MOREIRA, Maria Aparecida S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 11, p. 465-472, 2009.

PINTO, ANDRÉIA *et al.* Boas práticas para manejo florestal e agroindustrial de produtos florestais não madeireiros: açaí, andiroba, babaçu, castanha-do-brasil, copaíba e unha-de-gato. **Belém: Imazon**, 2010.

PINTO, Darlene da Silva *et al.* Volatiles of foliar rachis, branches and resin elicited by insects from *Protium hebetatum* grows wild in Amazon. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 13, n. 6, p. 699-703, 2010.

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

POLÍTICA NACIONAL DE RESÍDUOS SÓLIDOS (PNRS), Lei 12.305. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2 ago. 2010. Disponível em: <[www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/.../lei/112305.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/.../lei/112305.htm)> Acesso em: 22 jan. 2022.

QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo *et al.* Antinociceptive activity and redox profile of the monoterpenes. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.

RAMOS, K.; ANDREANI JUNIOR, R. KOZUSNY- ANDREANI, D. I. Óleos essenciais e vegetais no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.18, n.2, supl. I, p.605-612, 2016.

RAMOS-ORDOÑEZ, M.F.; ARIZMENDI, M.D.C.; MARTÍNEZ, M.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, J. The pseudaril of *Bursera* and *Commiphora*, a foretold homology? *Revista Mexicana de Biodiversidad*, v. 84, p. 509-520, 2013.

RIBERIRO, J. E. L. S. *et al.* Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra Firme na Amazônica Central. **DFID, INPA, Manaus, Brazil**, 1999.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C.; WADT, P. G. S.; WADT, LH de O. *Copaiba: ecologia e produção de óleo-resina*. 2004.

ROCHA, J.; CHERIAF, M. Aproveitamento de Resíduos na Construção. *Coletânea Habitar*, vol. 4. Utilização de Resíduos na Construção Habitacional. cap. 3. p. 72-93. 2003.

ROCHA, Thiago Soares *et al.* Variabilidade química de óleos essenciais de *Protium heptaphyllum*. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 10, p. e288111032835-e288111032835, 2022.

RODRIGUES, Victor M. *et al.* Copaiba Oil-Loaded Polymeric Nanocapsules: Production and In Vitro Biosafety Evaluation on Lung Cells as a Pre-Formulation Step to Produce Phytotherapeutic Medicine. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 161, 2023.

ROGERO, S. O. *et al.* Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in vitro**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

- ROGERO, Sizue Ota *et al.* Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317-320, 2003.
- ROSS, Stuart A.; GULVE, Eric A.; WANG, Minghan. Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. **Chemical reviews**, v. 104, n. 3, p. 1255-1282, 2004.
- RÜDIGER, André L.; VEIGA-JUNIOR, Valdir F. Chemodiversity of Ursane-and Oleanane-Type Triterpenes in Amazonian Burseraceae Oleoresins. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 6, p. 1142-1153, 2013.
- RÜDIGER, André Luis; SIANI, Antônio Carlos; JUNIOR, VF Veiga. The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). **Pharmacognosy reviews**, v. 1, n. 1, p. 93-104, 2007.
- SACCARO JUNIOR, Nilo Luiz. O Uso de recursos genéticos para o desenvolvimento sustentável brasileiro. 2013.
- SÁNCHEZ, Luis Enrique. Avaliação de impacto ambiental: conceitos e métodos. Oficina de textos, 2020.
- SÁNCHEZ-MENDOZA, María Elena *et al.* Polyalthic acid isolated from *Croton reflexifolius* has relaxing effect in guinea pig tracheal smooth muscle. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 10-11, p. 800-807, 2008.
- SANGTHONG, Sarita *et al.* Chemical Constituents, Antioxidant, Anti-Tyrosinase, Cytotoxicity, and Anti-Melanogenesis Activities of *Etilingera elatior* (Jack) Leaf Essential Oils. **Molecules**, v. 27, n. 11, p. 3469, 2022.
- SANTAMARIA-AGUILAR, D.; LAGOMARSINO, L.P. Two new species and a new combination in *Protium* (Burseraceae) from Costa Rica. **Phytokeys**, v. 76, p. 89-113, 2017.
- SANTANA, Raissa Couto *et al.* In vitro leishmanicidal activity of monoterpenes present in two species of *Protium* (Burseraceae) on *Leishmania amazonensis*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 259, p. 112981, 2020.
- SANTOS, Adriana Oliveira dos *et al.* Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 277-281, 2008.
- SANTOS, D. G. *et al.* *Copaifera reticulata*: caracterização química e atividade bactericida frente a patógenos de alimentos. **Rev. Virtual Quím**, v. 12, n. 2, p. 474-491, 2020.
- SANTOS, Tailane Caína de Souza. Extração de compostos bioativos de *Zingiber officinale* Roscoe e avaliação da sua atividade frente a fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. 2018.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). Como montar uma fábrica de óleos essenciais. Disponível em: <<https://sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/ideias/como-montar-uma-fabrica-de-oleosnaturais-e-essencias,c2387a51b9105410VgnVCM1000003b74010aRCRD#apresentacao-de-negocio>>. Acesso em 22 de maio de 2022.

SHANLEY, Patricia. **Frutíferas da mata na vida amazônica**. Editora Supercores, 1998.

SHU, Yue-Zhong. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of natural products**, v. 61, n. 8, p. 1053-1071, 1998.

SIANI, A. C. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of Protium. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 57-69, 1999.

SÍNTESE NATURAL AMBIENTE LTDA. maio 28th, 2021. <[Óleo Vegetal. https://www.snaturaloleos.com.br/voce-conhece-os-beneficios-do-oleo-vegetal-de-copaiba](https://www.snaturaloleos.com.br/voce-conhece-os-beneficios-do-oleo-vegetal-de-copaiba)> acesso em 08/02/2023>

SISTEMA IBGE DE RECUPERAÇÃO AUTOMÁTICA (SIDRA). PEVS 2021. <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2021>>. Acesso em 01/02/2023>

SLANC, Petra *et al.* Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 23, n. 6, p. 874-877, 2009.

SOUSA, João Paulo B. *et al.* Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 4, p. 653-659, 2011.

SOUZA, O. S. Ação inibitória de extratos de plantas sobre a lipase pancreática com ênfase em *Bacharis trimera* (Less.) DC. 2009.

SOUZA, Paula Monteiro de. Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado. 2011.

SRI RAMA MURTHY K, CHANDRASEKHARA REDDY M, SANDHYA RANI S, PULLAIAH T. Bioactive principles and biological properties of essential oils of Burseraceae: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.5, n.2, p.247-258, 2016

- SUSUNAGA, G. *et al.* Resumos da 18 a Reunião Anual da SBQ PN 087. **Caxambu (MG)**, 1995.
- SUSUNAGA, Glória Susunaga. Estudo químico e biológico da resina produzida pela espécie *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae). **Manaus, UFAM**, 1996.
- TAO, Lei *et al.* Elemene displays anti-cancer ability on laryngeal cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 58, p. 24-34, 2006.
- THE OBAMA ADMINISTRATION. NATIONAL BIOECONOMY BLUEPRINT. The White House: Washington. April 2012. Disponível em: <[https://obamawhitehouse.archives.gov/sites/default/files/microsites/ostp/national\\_bioeconomy\\_blueprint\\_april\\_2012.pdf](https://obamawhitehouse.archives.gov/sites/default/files/microsites/ostp/national_bioeconomy_blueprint_april_2012.pdf)>. Baixado em: 21/09/2022.
- TINCUSI, Benigna M. *et al.* Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Planta médica**, v. 68, n. 09, p. 808-812, 2002.
- TIRAPELLI, C.R. *et al.* Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. *European Journal of Pharmacology*, v. 492, n. 2, p. 233–241, 2004.
- TROMBETTA, D. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Bethesda, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.
- VARGAS, Fabiano de S. *et al.* Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194-6210, 2015. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 15, p. 316-320, 2005.
- VEIGA JR, Valdir F.; PATITUCCI, Maria Lucia; PINTO, Angelo C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 20, p. 612-615, 1997.
- VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C. O gênero *copaifera* L. **Química nova**, v. 25, p. 273-286, 2002.
- VERPOORTE, Rob. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 3, n. 5, p. 232-238, 1998.
- VIEIRA, Henriete S. *et al.* Novel derivatives of kaurenoic acid. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 151-157, 2002.
- WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*, [S.l.], v. 36, p. 1.136-1.145, 6 dez. 2018.

WANG, G. *et al.* Antitumor effect of  $\beta$ -elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 62, p. 881-893, 2005.

WEEKS, A.; DALY, D.C.; SYMPSON, B.B. The phylogenetic history and biogeography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.35, n.1, p.85-101, 2005.

WIJESUNDARA, Niluni M.; LEE, Song F.; RUPASINGHE, HP Vasantha. Carvacrol inhibits *Streptococcus pyogenes* biofilms by suppressing the expression of genes associated with quorum-sensing and reducing cell surface hydrophobicity. **Microbial Pathogenesis**, v. 169, p. 105684, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus.** World health organization, 1999.

XAVIER-JUNIOR, Francisco Humberto *et al.* Development of a gas chromatography method for the analysis of copaiba oil. **Journal of chromatographic science**, v. 55, n. 10, p. 969-978, 2017.

YADAV, Niket; CHANDRA, Harish. Suppression of inflammatory and infection responses in lung macrophages by eucalyptus oil and its constituent 1, 8-cineole: Role of pattern recognition receptors TREM-1 and NLRP3, the MAP kinase regulator MKP-1, and NF $\kappa$ B. **PLoS One**, v. 12, n. 11, p. e0188232, 2017.

YEO, Syn Kok *et al.*  $\beta$ -Bisabolene, a sesquiterpene from the essential oil extract of *opoponax* (*Commiphora guidottii*), exhibits cytotoxicity in breast cancer cell lines. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 3, p. 418-425, 2016.

ZHAO, Yong-Shun *et al.* B-Elemene inhibits Hsp90/Raf-1 molecular complex inducing apoptosis of glioblastoma cells. **Journal of neuro-oncology**, v. 107, p. 307-314, 2012.

ZIECH, Rosangela E. *et al.* Atividade antimicrobiana do oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata*) frente a *Staphylococcus coagulase positiva* isolados de casos de otite em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 909-913, 2013.

ZOU, L.; LIU, W.; YU, L.  $\beta$ -elemene induces apoptosis of K562 leukemia cells. *Zhonghua Streptococcus mutans* Zhong Liu Za Zhi, v. 23, n. 3, p. 196-198, 2001.