



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ – UFOPA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO
ANTIMICROBIANA E O DESENVOLVIMENTO DE UMA
FORMULAÇÃO COM O ÓLEO DE *Copaifera reticulata* Ducke**

JOSIANE ELIZABETH ALMEIDA E SILVA

Santarém, Pará
2019

JOSIANE ELIZABETH ALMEIDA E SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO
ANTIMICROBIANA E O DESENVOLVIMENTO DE UMA
FORMULAÇÃO COM O ÓLEO DE *Copaifera reticulata* Ducke**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pacheco de Oliveira

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

Santarém, Pará
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

-
- S586c Silva, Josiane Elizabeth Almeida e
Caracterização química, avaliação antimicrobiana e o desenvolvimento de uma
formulação com óleo de *Copaifera reticulada* Ducke./ Josiane Elizabeth Almeida e
Silva. – Santarém, 2019.
57 p. : il.
Inclui bibliografias.
- Orientadora: Elaine Cristina Pacheco de Oliveira.
Coorientador: Valdir da Veiga Júnior.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pes-
quisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biociên-
cias.
1. Atividade antibacteriana. 2. *Copaifera*. 3. Composição química. I. Oliveira, Elaine
Cristina Pacheco de, *orient.* II. Veiga Júnior, Valdir da, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 615.321

Bibliotecária – Documentalista: Mary Caroline Santos Ribeiro – CRB/2 566

JOSIANE ELIZABETH ALMEIDA E SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO
ANTIMICROBIANA E O DESENVOLVIMENTO DE UMA
FORMULAÇÃO COM O ÓLEO DE *Copaifera reticulata* Ducke**

TERMO DE APROVAÇÃO

APROVADO EM: ___/___/___

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. – Elaine Cristina Pacheco de Oliveira
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ – UFOPA

Prof^ª. Dra. – Kariane Mendes Nunes
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ – UFOPA

Prof^ª. Dra. – Silvia Katrine Silva Escher
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ – UFOPA

Aos meus amados pais Alcino e Socorro e meus irmãos que sempre foram meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** que me trouxe até aqui debaixo de sua proteção, permitindo a realização de mais um projeto.

À minha **família** que sempre esteve ao meu lado e me incentivou na busca da realização dos meus objetivos. Que compreenderam minhas ausências, que comemoraram minhas vitórias e cuidaram de mim mesmo de longe. Vocês são a razão da minha vida, o motivo dos meus esforços diários, da minha busca em ser uma pessoa melhor, de ser uma profissional competente para que possam sempre ser orgulhar da pessoa que me tornei. Obrigada por todo amor e carinho, eu amo vocês.

À minha orientadora **Profa. Dra. Elaine Cristina P. de Oliveira**, pelo apoio, confiança, paciência, incentivo e ensinamentos repassados. Que muitas vezes fez papel de mãe na minha vida, na busca de ensinar com amor, respeitando meus limites e sabendo a hora certa de falar cada palavra. Agradeço principalmente, por me ensinar a diplomacia e que às vezes calar-se e ouvir é a melhor resposta.

Ao meu Co-orientador **Prof. Dr. Valdir da Veiga Junior** pelas contribuições na análise química, pela receptividade na UFAM e por sempre estar disposto a contribuir para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Taiara Picanço, Jhéssica Caetano, Rayana Brito, Kamila Sousa, Maurício Caldas e Cássio Figueira, pelo companheirismo e auxílio ao longo deste trabalho.

A **Iasmin Paranatinga**, que além da parceria diária no laboratório de Biotecnologia Vegetal, fez da sua família a minha família, que me acompanhou nos experimentos e se fez presente nos momentos de angústia e alegria ao logo desta dissertação.

À **Larissa Silva**, pela recepção no Laboratório de Química e Biomoléculas – QBioma da UFAM, por toda paciência ao logo das análises químicas. Por sempre ser prestativa e disponível para auxiliar todos os experimentos realizados.

À **Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi** por aceitar a parceria e disponibilizar a plataforma de bioensaios biotecnológicos para a realização das análises biológicas, contribuindo significativamente com este trabalho.

À **Msc. Ivanildes Bastos**, técnica da plataforma de bioensaios biotecnológicos, que não mediu esforços para auxiliar na análise bacteriológica, sempre muito gentil e solícita em todo processo experimental.

Ao meu amigo de turma **Antônio Júnior**, por ser um verdadeiro irmão ao longo desta jornada, que está junto a mim desde a Graduação e que foi um grande incentivador no ingresso ao mestrado. Que nas horas difíceis ofereceu seu ombro amigo e nunca me deixou desanimar, sempre com uma palavra amiga que pudesse reconfortar aqueles momentos de aflição.

Aos meus amigos **Patrícia Pires** e **Luan Silva**, que fizeram da sua casa meu lar, que me acolheram como parte da família, que nos momentos difíceis me incentivaram para continuar e que fizeram das minhas vitórias as suas vitórias.

A minha afilhada/irmã de alma **Camila Maia**, que limpou minhas lágrimas, que sorriu comigo, que acredita em mim quando eu mesma já não acredito. Obrigada por ouvir meus desabafos sem reclamar e por não medir esforços para estar ao meu lado.

A minha amiga **Taiza Mirella** por ser uma irmã, que me incentivou em cada momento desse percurso acadêmico, desde a graduação. Que me deixou fazer parte de sua família, a qual me acolheu como uma verdadeira filha.

A minha amiga **Mariane Santos**, por estar ao meu lado desde a infância, por todo incentivo, amor e carinho. Acima de tudo agradeço por me acolher tão bem em sua família no período que estive em Manaus para realizar os experimentos para a concretização deste projeto.

Aos meus grandes amigos **Adriane Beatriz**, **Gabriel Ranieri**, **Natiele Sousa**, **Odilon Caetano**, **Kelly Lima**, **Laenir Anjos**, **Tayara Damasceno** e **Luciana Silva**, por todo carinho, apoio e cuidado que sempre dispensaram a mim.

Ao Laboratório de Botânica da Embrapa Amazônia Oriental pela identificação botânica das exsiccatas.

Ao ICMBio na pessoa do MsC. Darlison Andrade pelo apoio nas coletas.

A Coomflona pelo indispensável auxílio nas coletas.

Ao Laboratório de Química e Biomoléculas da Amazônia – Qbioma

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

A todos os **professores** do Programa de Pós-Graduação em Biociências da UFOPA pelos ensinamentos repassados.

Agradeço a **UFOPA** pela concessão da bolsa e assim poder concluir mais essa etapa.

A TODOS O MEU MUITO OBRIGADA!

“Uma flecha só pode ser lançada se for puxada para trás. Então, quando a vida te puxa para trás, com dificuldades, significa que vai te lançar para algo maravilhoso. Apenas mantenha o foco e não tire o olho do alvo” (Gabriel Sparks).

RESUMO

A óleorresina de copaíba possui diversas propriedades medicinais já comprovadas, entre elas destaca-se a atividade antimicrobiana. O objetivo desse trabalho foi avaliar a composição química da óleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke, a citotoxicidade e a atividade antimicrobiana frente às cepas *Staphylococcus aureus*; *S. aureus* resistente a meticilina e *S. simulans* nos períodos sazonais (seco e chuvoso) da óleorresina, bem como obter uma formulação fitoterápica semissólida contendo a óleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke. Para isso, foi realizada a cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM), para avaliar a composição química da óleorresina, a atividade citotóxica *in vitro* utilizando células da linhagem VERO. A atividade microbiológica por difusão em poço e microdiluição em placas e a formulação foi obtida por fusão da manteiga de murumuru a 45° C e em seguida, com a adição do tensoativo, água e óleo para formação de um sistema emulsionado. Os resultados obtidos mostram que, foi possível identificar apenas três amostras, sendo descritas como Amostra 1 do período seco e chuvoso (1S e 1C) Amostra 2 do período seco e chuvoso (2S e 2C) e Amostra 3 do período seco e chuvoso (3S e 3C) botanicamente, na análise química o β - cariofileno foi identificado como componente majoritário em todas as amostras utilizadas, as amostras 2 C, 2 S, 3 C e 3 S apresentaram citotoxicidade apenas na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, e a amostra 1 C e 1 S não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações utilizadas, nas bactérias utilizadas constatou ação antibacteriana indicando que houve ação da óleorresina. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) demonstrou que a óleorresina coletada no período chuvoso mostrou forte inibição para a bactéria *S. aureus* meticilina resistente e *S. aureus*, enquanto que do período seco mostrou uma fraca inibição para todas as cepas testadas. A formulação incorporada com a óleorresina apresentou-se estável, com aspecto de gel, de cor amarelo claro e odor amadeirado, com aparecimento de anisotropia e birrefringência, com textura em forma de estrias, característico de fase hexagonal que vem sendo empregada em alguns estudos para liberação sustentada de fármacos. Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam ainda mais a importância da óleorresina de copaíba proveniente da região Amazônica como fitoterápico com potencial antibacteriano, sendo desta forma, uma fonte promissora para a síntese de novos fármacos com atividade antimicrobianos.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana. Composição química. *Copaifera*. Formulação.

ABSTRACT

The copaiba oleoresin has several proven medicinal properties, among them the antimicrobial activity. The aim of this work was to evaluate the chemical composition of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin, cytotoxicity and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* strains; Methicillin-resistant *S. aureus* and *S. simulans* in the seasonal (dry and rainy) periods of oleoresin, as well as obtain a semi-solid herbal formulation containing *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin. For this, Gas Chromatography with Mass Spectrometry (GC-MS) was performed to evaluate the chemical composition of the oleoresin, cytotoxic activity in vitro using VERO cells. Microbiological activity by well diffusion and plate microdilution and the formulation was obtained by melting the murumuru butter at 45 ° C and then with the addition of surfactant, water and oil to form an emulsified system. The results showed that it was possible to identify only three samples, being described as Sample 1 of dry and rainy period (1S and 1C) Sample 2 of dry and rainy period (2S and 2C) and Sample 3 of dry and rainy period (3S and 3C) botanically, in the chemical analysis β -caryophyllene was identified as the major component in all samples used, samples 2 C, 2 S, 3 C and 3 S showed cytotoxicity only at 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$, and the sample 1 C and 1 S showed no cytotoxicity in any of the concentrations used, in the bacteria used it found antibacterial action indicating that there was action of oleoresin. The determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) showed that the oleoresin collected in the rainy season showed strong inhibition for *S. aureus* methicillin resistant bacteria and *S. aureus*, while in the dry period showed a weak inhibition for all strains tested. The formulation incorporated with oleoresin was stable, gel-like, light yellow in color and woody odor, with the appearance of anisotropy and birefringence, with streak-shaped texture, characteristic of hexagonal phase that has been used in some studies for sustained release of drugs. The results obtained in the present study further reinforce the importance of copaiba oleoresin from the Amazon region as a phytotherapeutic with antibacterial potential, thus being a promising source for the synthesis of new drugs with antimicrobial activity.

Keywords: Antibacterial activity. Chemical composition. *Copaifera*. Formulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Evolução da resistência do *S. Aureus* de 1996 a 2002.

Figura 2: Ilustração dos possíveis mecanismos de ação antimicrobiana dos óleos essenciais.

Figura 3: Árvore de Copaíba.

Figura 4: (a) Perfuração; (b) Corte transversal do tronco, canais secretores longitudinais; (c) Canais secretores longitudinais.

Figura 5: Variação na coloração da oleorresina de *Copaifera*.

Figura 6: Principais sesquiterpenos encontrados em óleos de copaíba.

Figura 7: Esqueletos diterpênicos de cauranos, labdanos e clerodanos.

Figura 8: Local da coleta – Belterra – PA, Floresta Nacional do Tapajós, km 117.

Figura 9: a) Perfuração da árvore de *Copaifera reticulata* Ducke; b) Coleta da oleorresina de copaíba; c) Cano PVC vedado; d) Transferência para frasco âmbar.

Gráfico 1: Dendrograma de HCA (Análise de Agrupamento Hierárquico) representando a relação de similaridade da composição dos óleos de *Copaifera reticulata* Ducke, em relação à sazonalidade árvores de procedência.

Gráfico 2: Análise dos componentes principais (HCA) dos óleos de *Copaifera reticulata* Ducke no estudo sazonal.

Gráfico 3: Análise da citotoxicidade da oleorresina em células da linhagem vero.

Figura 10: Formulação semissólida contendo oleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke.

Figura 11: Fotomicrografias da formulação semissólida, utilizando as objetivas de 5x e 10x, respectivamente.

Figura 12: Cromatograma da análise química da amostra 1 S (seco) e 1 C (chuvoso), respectivamente.

Figura 13: Cromatograma da análise química da amostra 2 S (seco) e 2 C (chuvoso), respectivamente.

Figura 14: Cromatograma da análise química da amostra 3 S (seco) e 3 C (chuvoso), respectivamente.

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Análise da composição química da óleorresina de *C. reticulata* da FLONA Tapajós no período seco e chuvoso.

Tabela 2: Análise da atividade antibacteriana da óleorresina de *C. reticulata* de ambos os períodos sazonais, frente às bactérias MRSA, *S. aureus* e *S. simulans*.

Tabela 3: CIM por microdiluição em placas da óleorresina de *C. reticulata* frente às cepas MRSA, *S. aureus* e *S. simulans*.

Tabela 4: Análise antibacteriana da formulação e da base frente às bactérias *S. aureus*, *S. simulans* e MRSA.

Tabela 5: Análise antibacteriana da óleorresina, da base e da formulação frente às bactérias MRSA, *S. aureus* e *S. simulans*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVO GERAL	18
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS PLANTAS MEDICINAIS	19
2.2	RESISTÊNCIA BACTERIANA	20
2.3	A BUSCA POR METABÓLITOS COM POTENCIAL MICROBIOLÓGICO	22
2.4	<i>COPAIFERA SP.</i> – CONSIDERAÇÕES GERAIS	23
2.4.1	A ÁRVORE DE COPAÍBA	23
2.4.2	ASPECTOS ECOLÓGICOS	25
2.4.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE <i>Copaifera sp.</i>	26
2.5	PRODUTOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	ÁREA DE ESTUDO	30
3.2	IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA	30
3.3	COLETA DA ÓLEORRESINA DE COPAÍBA	31
3.4	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM)	32
3.4.1	DERIVATIZAÇÃO DA AMOSTRA	32
3.4.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA ÓLEORRESINA DE <i>Copaifera reticulata</i> Ducke	32
3.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	32
3.5.1	CULTIVO CELULAR	32
3.5.2	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE <i>in vitro</i>	33
3.6	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	33
3.6.1	ENSAIO DE DIFUSÃO EM ÁGAR – (TÉCNICA DE POÇO)	33
3.6.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	34
3.7	OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ÓLEORRESINA DE <i>C. RETICULATA</i> DUCKE	35
4.1	ATIVIDADE CITOTÓXICA	42
4.2	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	43
4.2.1	DIFUSÃO EM ÁGAR – (TÉCNICA EM POÇO)	43
4.2.2	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	44
4.4	FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA CONTENDO ÓLEORRESINA DE <i>C. RETICULATA</i> DUCKE <i>IN NATURA</i>	45
4.4.1	MACROSCÓPIA DA FORMULAÇÃO	46
4.4.2	MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA	46
4.4.3	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA FORMULAÇÃO	47
5.	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
	ANEXOS	60

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Copaifera reticulata* Ducke pertence ao gênero *Copaifera*, família Fabaceae, subfamília *Detarioideae*, e atualmente possui aproximadamente 72 espécies descritas na literatura. Destas 16 são encontradas exclusivamente no Brasil. Popularmente conhecida como copaibeira ou pau d'óleo, é uma árvore nativa de regiões tropicais e, no Brasil, desenvolve-se principalmente nas regiões Norte e Nordeste (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002).

No Oeste do Pará a *C. reticulata* pode ser encontrada na área de conservação e manejo da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA-Tapajós), em Belterra-PA. Esta planta pode viver em média 400 anos, atingi uma altura entre 25 a 40 metros e diâmetro entre 0,4 e 4 metros. Apresenta a casca aromática, folhagem densa, flores pequenas e frutos secos, do tipo vagem (PIERI, 2009).

A *Copaifera* vem sendo valorizada pelos produtos e benefícios que dela provêm (BARBOSA et al., 2009), tanto pela sua madeira de boa qualidade, quanto pela produção de óleorresina, o qual é utilizado pelas populações tradicionais da Amazônia e indústrias farmacêuticas, devido às suas propriedades terapêuticas e cosméticas. Tais como xaropes, cápsulas, óvulos vaginais, sabonetes, pomadas, xampus entre outros (PIERI, 2009). Dessa forma se encontra como um dos produtos florestais não madeireiros mais importantes, sendo exportado para os Estados Unidos, França, Alemanha e Inglaterra (SILVA, 2014).

A óleorresina é exsudada da árvore através de um furo realizado no tronco e se apresenta como óleo transparente, de coloração variando entre amarelo claro ao castanho dourado, de viscosidade variável, apresentando odor forte e sabor amargo (LOURENÇO, 2009). O óleo de copaíba é constituída por uma parte resinosa (cerca de 55% a 60%), que é composta pelos seguintes diterpenos: ácido hardwíckico, colavenol, ácido copaiférico ou copaífero, ácido copaiferólico, ácido calavênico, ácido patagônico, ácido copálico entre outros (LEANDRO, 2012), e uma fração volátil composta principalmente por sesquiterpenos: β -cariofileno, β - bisaboleno, α - humuleno e o α e β - selineno que possuem comprovada ação anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiedêmica (PIERI, 2009).

Há relatos muito antigos sobre as propriedades medicinais do óleo de copaíba. Barléu (1974) afirma que os índios latino-americanos observaram que os animais se esfregavam nos troncos das copaibeiras para curar suas feridas. Baseado nessas informações, Lourenço (2009) constatou que o óleo de copaíba apresentava propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral e antitética.

No Brasil, o óleo de copaíba é amplamente utilizado na medicina popular, sendo administrado oralmente e/ ou por aplicação tópica do óleo *in natura* ou em formulações (LEANDRO et al., 2012). Além disso, é largamente usado para tratamento de amigdalites e como cicatrizante nos casos de ferimentos e hematomas. Os povos mais antigos empregavam o óleo de copaíba contra catarros vesical e pulmonar, disenteria, bronquites, dermatoses e como antisséptico das vias urinárias contra a gonorréia e a leucorréia (SILVA, 2016).

Portanto é necessário que os medicamentos de origem natural sejam padronizados quimicamente e as provas serem apresentadas quanto à eficácia e uso em segurança. A análise e padronização química das óleorresinas de diferentes espécies de *Copaifera* é claramente indispensável, para que se possa relacionar composição química com atividade biológica e, assim, permitir a validação como um método seguro e eficaz com controle de qualidade adequado (LIMA, 2014).

Neste sentido, é importante lembrar que o Ministério da Saúde Brasileiro, nos últimos anos, busca estimular a inserção das práticas complementares de cuidado no Sistema Único de Saúde (SUS). Destaca-se a implementação da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF) (Brasil, 2006a) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (Brasil, 2006b), que visam estimular o acesso às práticas complementares e às plantas medicinais, para o cuidado em saúde, de forma eficaz e segura.

Considerando a importância de realizar buscas que confirmem os benefícios, as comprovações de eficácia e a inclusão de novos fármacos desenvolvidos a partir das plantas medicinais, o objetivo desse trabalho foi identificar os compostos químicos, avaliar a citotoxicidade e a ação antimicrobiana da espécie *Copaifera reticulata* Ducke, coletada sazonalmente na Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), localizada no município de Belterra-Pará no km 117 as margens da Br -163, para desenvolver uma formulação fitoterápica capaz de incorporar esta óleorresina em uma emulsão.

1.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a composição química da óleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke, a citotoxicidade e a atividade antimicrobiana da óleorresina em diferentes períodos sazonais, bem como obter uma formulação fitoterápica de semissólida contendo a óleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar a óleorresina de *Copaifera reticulata* nos períodos chuvoso e seco na Floresta Nacional do Tapajós;
- Identificar os compostos químicos da óleorresina por Cromatografia Gasosa aplicada a Espectrometria de Massa (CG-EM)
- Avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* da óleorresina de *C. reticulata* frente cepas de *Staphylococcus* spp. Através da técnica de difusão em poço e microdiluição em placas de 96 poços.
- Avaliar a citotoxicidade aguda *in vitro* da óleorresina de *C. reticulata*, utilizando as células da linhagem VERO, pelo método Alamar Blue.
- Obter uma formulação fitoterápica semissólida da óleorresina de *C. reticulata*.
- Avaliação da atividade antibacteriana da formulação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas medicinais pelo homem como forma terapêutica é historicamente comprovada por registros datados de muitos anos atrás, fazendo parte da sua cultura. Por gerações a população de cada região do país, tinha como única forma de tratamento, prevenção e cura de diversos males, o uso empírico de plantas medicinais, muitas vezes, identificando as indicações das mesmas por meio da sua utilização (BADKE et al., 2016).

Acredita-se que a maioria da população usa plantas medicinais, em especial os povos das áreas rurais dos países em desenvolvimento ou em locais onde a população não tem acesso ou condições de adquirir medicamentos (TADEG, 2005). Nos países desenvolvidos, a chamada medicina complementar e alternativa tem sido utilizada com frequência, de forma concomitante à medicina convencional. Nos anos 60, ocorreu nos países desenvolvidos, como Alemanha, França e Reino Unido, um interesse maior pela fitoterapia e, passaram a utilizar não só a infusão, cozimento ou tintura dos fármacos vegetais, mas a também em formas farmacêuticas mais elaboradas como os comprimidos, cápsulas, cremes e etc. (BRANDÃO et

al., 2006); nos Estados Unidos, o crescimento da fitoterapia foi superior a 50% no período de 1997 a 2002 (RIBEIRO & MOURA, 2009).

No Brasil, o uso de plantas medicinais no tratamento de enfermidades tem influências da cultura indígena, africana, europeia e pela vasta biodiversidade encontrada no país, cujo território possui os cinco principais biomas: Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Caatinga; portanto, é uma rica fonte de produtos terapêuticos. O País ainda preserva o valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas como terapêutica, demonstrando que a fitoterapia faz parte da sua cultura (ASSIS et al., 2015).

As propriedades biológicas das plantas medicinais são atribuídas ao seu potencial químico que desempenha algumas atividades já descritas na literatura; anti-inflamatória e antinociceptiva (CARVALHO et al., 1996) hipoglicemiante (FARIAS et al. 1997)); antiespasmódica, antiulcerogênica e antitumoral (MACIEL et al., 1998; MACIEL et al., 2000); antiestrogênica, citotóxica, antimicrobiana e cicatrizante (PIRIZ et al., 2014).

No entanto, o uso de plantas medicinais no tratamento de doenças, deve ser restrito a plantas conhecidas e/ou corretamente identificadas (COLOMBO et al., 2010), para que seja garantida sua segurança, eficácia e qualidade nas preparações, pois é necessário obter conhecimentos prévios sobre o potencial citotóxico e os efeitos adversos retardados e/ou assintomáticos que esta planta pode causar (VENDRUSCOLO et al., 2005).

2.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA

O surgimento e a disseminação de microrganismos patogênicos resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado constitui um sério problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (DUARTE, 2006; TOVAR & PETZEL, 2009). Sendo que, cada vez mais as doenças infecciosas afetam as pessoas em todo o mundo e ao longo da história da humanidade, sempre representaram uma das principais causas de morte.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças infecciosas representam 26% da mortalidade global, estimando-se que cerca de 50.000 pessoas morram a cada dia em todo o mundo por estas doenças (BECKER et. al. 2006; CHANDA & RAKHOLIYA, 2011). Fatores diretamente relacionados como, uso indiscriminado e irresponsável de antibióticos, terapêutica ou profilaticamente, humano ou veterinário, tem favorecido a pressão seletiva e predominância de espécies bacterianas cada vez mais resistentes (DEL FIOLE et al., 2010). A aquisição de resistência aos antimicrobianos trata-se de

um fenômeno genético, relacionado com alteração de genes contidos nos microrganismos, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem à ação das drogas (MICHELIN et al., 2005).

Apesar da disponibilização de novos antibióticos, a resistência bacteriana ocorre em ritmo crescente nos diferentes patógenos gram-positivos e gram-negativos representando um grande desafio terapêutico (ROSSI & ANDREAZII, 2005). No Brasil a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana em Serviços de Saúde (RM) foi criada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2004, em parceria com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública do Ministério da Saúde (CGLAB - SVS). Todos estes programas visam à conscientização sobre o uso racional de antibióticos, além da pesquisa sobre o mecanismo de transferência da resistência bacteriana e novos métodos de detecção da mesma (DRUMOND et al., 2004).

O primeiro relato de resistência antimicrobiana foi publicado em 1947, quando o isolamento de *Staphylococcus aureus* foi resistente à penicilina em 38 de 100 pacientes com infecções estafilocócicas na Inglaterra (BARBER, 1947). Em 1961 houve relatos de cepas *S. aureus* resistentes a meticilina e outras penicilinas semissintéticas (JEVONS, 1961). Em 1984, foi estimado que a sensibilidade de *S. aureus* à penicilina foi reduzida para 85%.

As infecções causadas por *S. aureus*, apresentam morbidade e mortalidade elevadas. Sendo que o *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) é o patógeno nosocomial mais envolvido em infecções hospitalares, responsável por inativar a ação de vários antibióticos (STRATTON, 2000).

A bactéria *S. simulans* é um microrganismo que pode se apresentar como bactérias oportunistas emergentes, especialmente em pacientes hospitalizados, imunocomprometidos, prematuros e com dispositivos implantados (HEIKENS et al., 2005). Grande causador de infecção primária de colonização, causa infecções hospitalares graves como bacteremias, septicemias e sepsis neonata (HUANG et al., 2003).

Em um estudo realizado por NGOWKE et al. (2011) demonstraram que a epidemiologia da resistência aos antibióticos varia de região e de país. Enquanto alguns países estão registrando um declínio, outros estão experimentando um aumento da resistência bacteriana. Porém, está evidente que o aumento ou a diminuição tem sempre uma ligação direta com o uso indiscriminado de antibióticos (TACCONELLI et al. 2009).

2.3 A BUSCA POR METABÓLITOS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO

O uso de plantas medicinais (óleos e extratos vegetais) no tratamento de doenças é uma estratégia antiga utilizada por praticamente todas as populações do mundo. No Brasil é comum, tanto nas regiões mais pobres como também nas grandes cidades, o comércio de plantas medicinais em feiras livres, mercados populares e plantadas nos quintais de casas (DUARTE, 2006).

Em razão ao aumento da resistência bacteriana às múltiplas drogas antimicrobianas, surgem à preocupação e a procura de novas alternativas terapêuticas, com as plantas medicinais representando uma importante fonte para obtenção destes medicamentos (MICHELIN et al., 2005). Estudos já comprovaram que os óleos essenciais e extratos vegetais são eficientes no controle do crescimento de vários microrganismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras (RAMOS, 2016). Diversos mecanismos são considerados para explicar a ação antimicrobiana das plantas medicinais. Onde a ação biológica pode estar relacionada à característica química e as quantidades dos componentes extraídos desse vegetal (NAZZARO et al., 2013).

Os antibióticos vegetais possuem uma estrutura química que difere daquela dos antibióticos derivados de microrganismos, podendo regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas (MICHELIN et al., 2005). Podem também estar relacionada ao dano causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial (COWAN, 1999). Em se tratando de bactérias, as gram-negativas são mais resistentes aos óleos essenciais do que as gram-positivas (TROMBETTA et al., 2005), devido às diferenças estruturais das paredes celulares (NAZZARO et al., 2013).

Rahman e Kang (2009) relataram que os riscos de microrganismos patogênicos desenvolvam resistência aos óleos essenciais e extratos vegetais são muito baixos, pois estes produtos contêm uma mistura de substâncias antimicrobianas que atuam por meio de diversos mecanismos. Constituindo uma característica benéfica e vantajosa dos produtos derivados de plantas sobre outros agentes antimicrobianos.

Além disso, dois fatos relevantes têm alavancado as pesquisas em buscas de novos agentes antimicrobianos, especialmente aqueles derivados de plantas: a crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos presentes no mercado e as dificuldades impostas pelo tratamento com medicamentos antifúngicos atuais (CLEFF et., 2012).

A óleoresina de copaíba possui diversas propriedades medicinais já comprovadas, como atividades anti-inflamatórias, antitétano, antitumorais, antiblenorrágicas e antissépticas urinárias. Além disso, tem sido usada para tratar bronquite, doenças de pele, úlceras e sífilis, bem como para curar feridas (CARVALHO & MILKE, 2014). Estudos farmacológicos demonstraram suas propriedades como um anti-inflamatório; gastroprotetor; analgésico; cicatrizante (ARAÚJO JUNIOR et al., 2005; PACHECO et al., 2006; CARVALHO et al., 2005, RAMOS, 2006); antinociceptivos (GOMES et al., 2007); antitumoral (LIMA et al., 2003); e antimicrobiano (COSTA-LOTUFO et al., 2009; VEIGA JUNIOR et al., 2005; TINCUSI et al., 2002).

2.4 *Copaifera* sp. – CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.4.1 A ÁRVORE DE COPAÍBA

A árvore de copaíba pertence ao gênero *Copaifera* é constituído de espécies de elevado valor econômico e ecológico, não apenas na Amazônia, mas em todo continente Sul-Americano (VEIGA JUNIOR et al., 2007). Este gênero pertence à família *Fabaceae*, Subfamília *Detarioideae*, possui aproximadamente 72 espécies descritas na literatura, sendo 16 dessas encontradas apenas no Brasil (AZANI et al., 2017; LEANDRO, 2012).

Figura 1: Árvore de Copaíba.



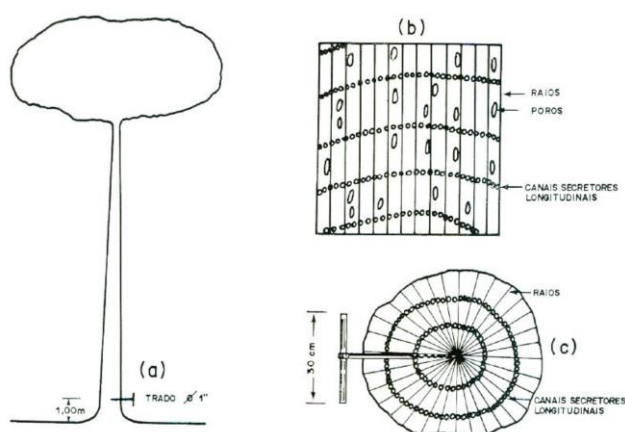
Fonte: autora

As copaibeiras (Figura 1) crescem em média 40 metros, são fornecedoras de madeira e óleoresina, produtos extraídos de seu tronco e explorados em níveis comercial e industrial. Apresentam caule áspero, de cor escura, com diâmetro médio entre 0,4 e 4 metros. As folhas são alternadas e pecioladas e as sementes são ovoides, envolvidas por um arilo abundante e colorido, possuindo flores pequenas, hermafroditas e apetaladas. Os frutos são do

tipo vagem, geralmente monospermicos (VEIGA JÚNIOR et al., 2005). É popularmente conhecida como copaíba, copaibeira, pau-de-óleo e copai, originalmente seu nome vem do tupi “cupa-yba” que significa “árvore de depósito”, ou que tem jazida, referindo-se ao a óleorresina existente em seu interior (CASCON, 2004).

A óleorresina de copaibeiras provém de canais axiais do tipo esquizógenos (Figura 2), que 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 óleorresina 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).

Figura 2: (a) Perfuração; (b) Corte transversal do tronco, canais secretores longitudinais; (c) Canais secretores longitudinais.



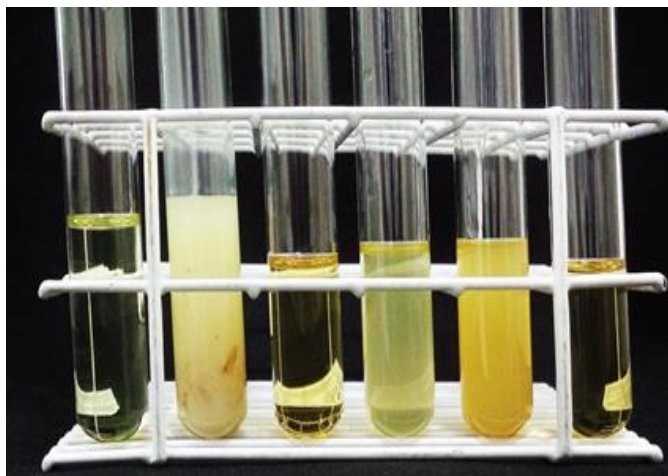
Fonte: Alencar, 1982

A obtenção da óleorresina se dá através da perfuração no tronco da árvore, com um trado de aproximadamente 2 metros de diâmetro em dois furos. O primeiro deve ser feito 1 metro acima da base da planta e o segundo de 1 a 1,5 metros acima do primeiro. Posteriormente inserindo um cano de PVC de $\frac{3}{4}$ de polegada nos orifícios, por onde o óleo escoar, e reserva-se o óleo. Após a finalização da extração, veda-se o orifício como uma tampa de plástico para proteção contra infestação de fitopatógenos (OLIVEIRA et al., 2006).

A óleorresina é assim denominada, por se tratar de uma seiva vegetal constituída por ácidos resinosos e compostos voláteis (MUNIZ, 2009). É um líquido transparente que apresenta variação em suas características físicas conforme a espécie, variando de amarelo

claro ao marrom (Figura 3). Possui sabor amargo, odor aromático, insolúvel em água e parcialmente solúvel em álcool (RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2004).

Figura 3: Variação na coloração da óleoresina de *Copaifera*.



Fonte: Autora

Em relação à produtividade da óleoresina de copaíba, alguns estudos relatam as variações existentes entre as espécies, (SILVA, 2014). A média de retirada de óleo, por vez para cada árvore, varia de 0,3 a 3 litros, dependendo da espécie e condições às quais está submetida, e algumas árvores podem chegar a fornecer até 30 litros em uma só retirada. Porém, é importante salientar que não há estudos definitivos sobre o tempo necessário para uma copaibeira recompor o óleo extraído (RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2006).

Essa óleoresina produzida pela copaíba é um produto secundário de excreção ou de desintoxicação que funciona como mecanismo de defesa da árvore contra animais, fungos e bactérias (PIERI, 2009). Ele é composto em sua grande maioria por hidrocarbonetos sesquiterpênicos: α -humuleno, β -selineno, β -bisaboleno, β -cariofileno, β -elemeno, γ -cadineno, α -cadinol, entre outros (PINTO et al., 2000), além de diterpenos pertencentes aos esqueletos caurano, labdano e clerodano (LEANDRO et al., 2012). Dentre os principais sesquiterpenos encontrados na óleoresina de copaíba estão o β -cariofileno, β -bisaboleno, α -humuleno e o α e β -selineno que possuem comprovada ação anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica (PIERI et al., 2009).

2.4.2 ASPECTOS ECOLÓGICOS

A época em que uma droga vegetal é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante todo ano. São relatados variações sazonais no conteúdo de praticamente

todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais, lactonas, sesquiterpênicas, alcalóides, taninos, ácidos fenólicos, flavonóides, cumarinas, saponinas, graxas epicuticulares, iridóides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

A produtividade dos metabólitos secundários, ao serem submetida a estímulos ambientais está sob o controle simultâneo de dois padrões de resposta, um de maior dimensão e mais lento provocado pelas variações climáticas sazonais, e outro de menor alteração, porém mais rápido influenciado pelas flutuações climáticas diárias (LUZ et al., 2014; EHLERT et al., 2013).

O efeito da sazonalidade no crescimento, desenvolvimento e teor de substâncias ativas dos vegetais nada mais é do que a combinação dos elementos climáticos (vento, temperatura, umidade, luz, pluviosidade) que ocorrem de maneira diversificada ao longo das quatro estações do ano (PINTO & BERTOLUCCI, 2002).

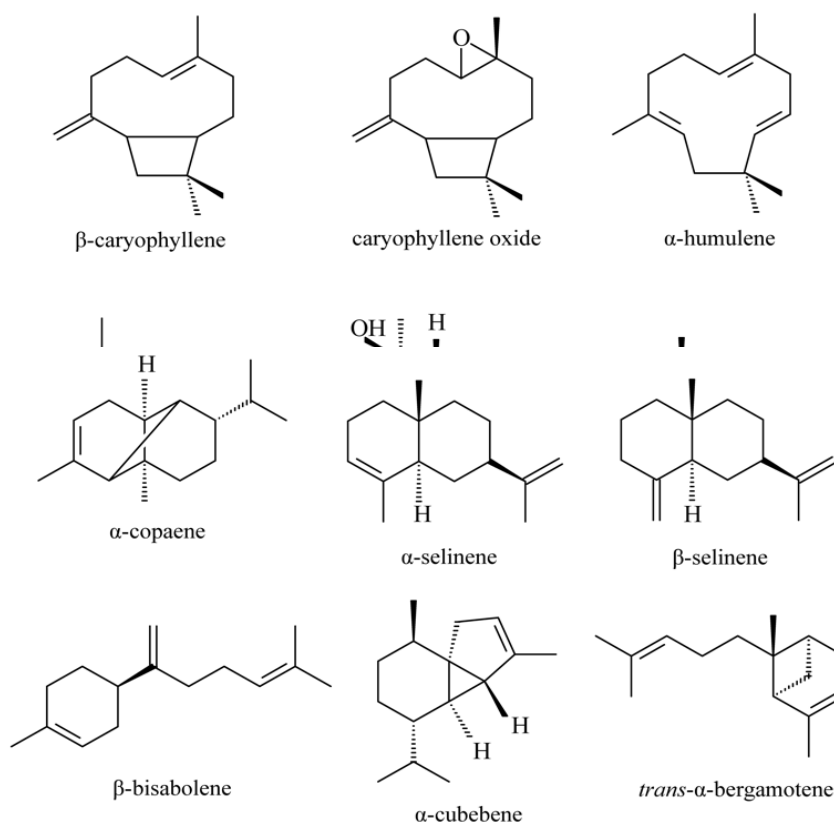
A produção de óleoresina por árvore é muito variável, e ainda não se tem conhecimento sobre os fatores que a determinam. As condições ambientais dos locais de crescimento das árvores, a época do ano e suas características genéticas são tidas como responsáveis por parte da variação observada na produção das árvores (RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2006). Alguns estudos avaliaram o efeito de características físicas do solo, dados dendrométricos e época do ano sobre a produção da copaíba (PLOWDEN, 2003; ALENCAR, 1982; LEITE et al., 2001; FERREIRA, 1999).

Outro fator observado foi que ao longo do dia o aroma peculiar de cada espécie torna-se acentuado, levando-se a conclusão que a concentração dos compostos voláteis seja maior em horários específicos, demonstrando dessa forma, que o horário de coleta pode ser um aspecto relevante na produção de óleos (NASCIMENTO et al., 2006). Entretanto, até o momento não há nenhuma conclusão definitiva sobre quais variações afetam a produtividade de uma árvore de copaíba. Além disso, a maioria das copaibeiras ainda são descritas apenas em nível de gênero, devido a sua difícil identificação botânica, que na maioria das vezes é realizada segundo as características das flores, como: pubescência, forma das sépalas, comprimento dos anteros e a condição glabrosa ou não do pistilo. As características dos frutos são muito importantes na identificação, porém dificilmente são encontradas nas coleções botânicas (SILVA, 2011).

2.4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *Copaifera sp.*

Nos estudos realizados acerca da composição química da óleoresina de copaíba, ocorre a predominância de dois grupos de substâncias distintos, solúveis entre si, sendo um majoritariamente de sesquiterpenos, e outro não volátil correspondendo aos diterpenos (SILVA, 2016), sendo 72 sesquiterpenos e 27 diterpenos (PIERI et al., 2009). Dentre os hidrocarbonetos sesquiterpênicos (Figura 4) mais encontrados na óleoresina estão o α -copaeno, α -humuleno, α e β -selineno, β -bisaboleno e β -cariofileno. O β -bisaboleno possui propriedades anti-inflamatória e analgésica e o β -cariofileno é descrito na literatura como anti-inflamatório e antimicrobiano (VEIGA & PINTO et al., 2002; LEANDRO, 2012).

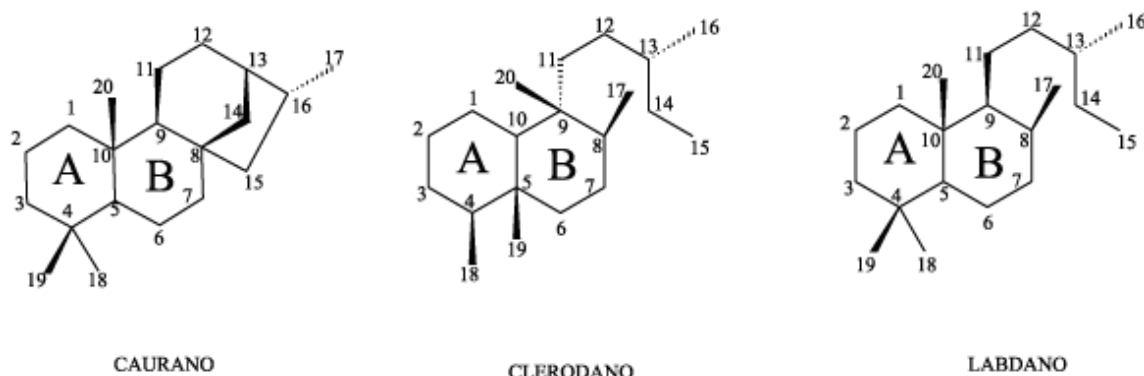
Figura 4: Principais sesquiterpenos encontrados em óleos de copaíba.



Fonte: LEANDRO et al., 2012.

A fração formada por diterpenos (Figura 5) é composta de ácido harwíckico, colavenol, ácido copaíferico, ácido copaiferólico, ácido calavênico, ácido patagônico, ácido copálico, entre outros, sendo estes identificados por cromatografia gasosa (VEIGA & PINTO et al., 2002).

Figura 5: Esqueletos diterpênicos de cauranos, labdanos e clerodanos.



Fonte: LEANDRO et al., 2012.

A composição dos óleos extraídos de copaíba pode variar em relação à concentração e a natureza dos sesquiterpenos e diterpenos presentes (VEIGA JUNIOR et al., 2005), levando em consideração as variações entre espécies, fatores bióticos (RAMOS, 2006), ou fatores abióticos como luminosidade e nutrientes (OLIVEIRA et al., 2006). Em estudos acerca da influência da sazonalidade sobre o perfil químico de óleos de copaíba, Cascon e Gilbert (2000) avaliaram diversos exemplares de *C. Duckei* e observaram que não houve diferenças significativas na composição de óleos extraídos de um mesmo indivíduo em diferentes períodos sazonais. Em outro estudo, Oliveira et al (2006) observaram que as concentrações de β -bisaboleno e β -cariofileno, em todos os meses do ano para *C. duckei*, independem da variação pluviométrica, além disso, a mesma tendência foi observada em *C. reticulata* e *C. martii*. Embora o óleo apresente variações no teor de diterpenos e sesquiterpenos, apenas essas classes de substâncias estão presentes na composição do óleo puro (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Em relação à caracterização química da óleoresina, não se esclarece a causa das variações na composição química do óleo de copaíba. Devido a isso, é necessário a investigação acerca dos fatores que causam essa variabilidade, pois a óleoresina de copaíba pode ser utilizado como matéria prima para a preparação de medicamentos e cosméticos, logo, essa variação poderá influenciar na atividade farmacológica e na toxicidade dos óleos (BARBOSA, 2012).

2.5 PRODUTOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

A biotecnologia é um campo da ciência que vem crescendo devido o potencial de desenvolver soluções para as três principais grandes demandas do século XXI, em todo o

mundo: alimentação, saúde e energia, contribuindo com o desenvolvimento de terapias na área da saúde, minimizando os problemas na produção de alimentos e criando alternativas na utilização de combustíveis fósseis (FREIRE, 2014). Através desses avanços, é possível definir a biotecnologia como uma ferramenta para a utilização de processos celulares e biomoleculares, capazes de resolver problemas ou fazer produtos (BIO, 2007). De forma a pensar nas aplicações da biotecnologia, nas bases moleculares da saúde, por exemplo, onde as técnicas e ferramenta biotecnológicas abram novos caminhos na pesquisa, na descoberta de novas terapias e de métodos de prevenção de doenças, utilizando a engenharia genética na produção de biofármacos e vacinas ou mesmo medicamentos baseados em plantas, com o enriquecimento genético de espécies; trazendo uma maior precisão no diagnóstico de doenças, bem como estudos genômicos para prevenção e indicação de novas terapias (OCDE, 2005; SILVEIRA et al., 2004).

No Brasil, aproximadamente 25% dos US\$ 8 bilhões do faturamento anual das indústrias farmacêuticas nacional são oriundos de medicamentos derivados de plantas, sendo que apenas cerca de 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de novos compostos bioativos e 1100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (PROCHNOW, 2015). Em relação aos medicamentos produzidos pelas indústrias e comercializados nas farmácias e drogarias, 25% têm componentes químicos de plantas, sendo que no caso dos medicamentos homeopáticos, esta porcentagem aumenta para 60% (CORRÊA et al., 2003).

Dentre as espécies vegetais com propriedades medicinais, destaca-se a óleorresina de copaíba, que vem sendo utilizada para diversas finalidades como na indústria de perfumes, mostrando-se um excelente fixador de odores; no setor energético, constitui-se um combustível em potencial, devido compor uma matéria prima renovável e rica em hidrocarboneto (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002), além de apresentar uma gama de utilizações na medicina popular, indígena e na indústria farmacêutica (RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004). A óleorresina da copaíba também pode ser usada como componente na preparação de uma variedade de produtos terapêuticos e cosméticos, como xaropes, pomadas, cápsulas, óvulos vaginais, cremes, sabonetes, xampus, detergentes e loções; possui ainda potencial para uso industrial em tintas e vernizes (PIERI, 2009).

Outro produto com potencial biotecnológico é a manteiga extraída da semente de murumuru (*Astrocaryum murumuru*), que é uma palmeira típica de áreas florestais primárias, tanto de terra firme quanto periodicamente alagadas (ROCHA et al., 2007). Esta palmeira produz frutos de janeiro a julho, que são constituídos de polpa e amêndoa, sendo que esta

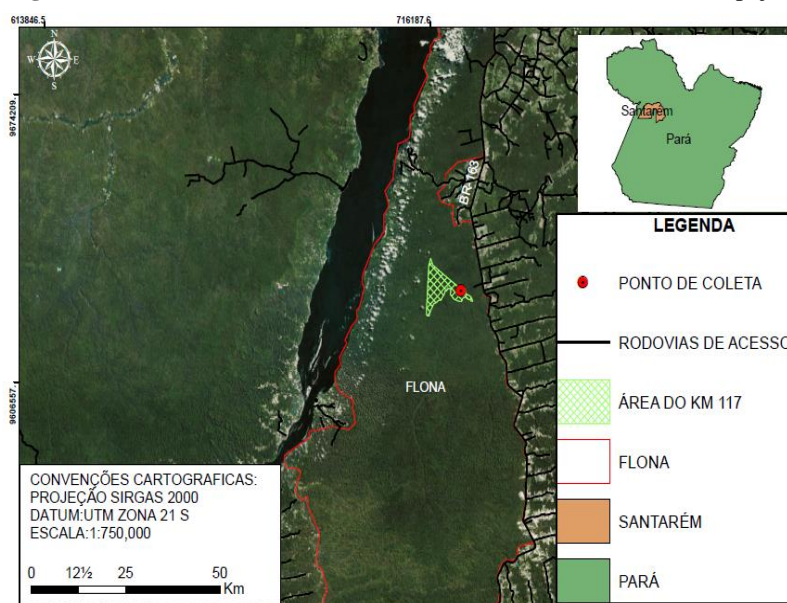
produz cerca de 50% de uma gordura branca, sem odor e sem gosto especial com a vantagem de não rancificar facilmente, rica em ácidos láuricos, mirístico e oleico (NASCIMENTO et al., 2007; LOPES et al., 2007). A semente de murumuru possui 40% do óleo em massa, sendo bastante utilizado na fabricação de produtos cosméticos (CASTRO et al., 2006), que contribuem para regular o equilíbrio hídrico e a atividade dos lipídeos da camada superficial da pele. A manteiga de Murumuru possibilita a recuperação da umidade e elasticidade natural da pele. Podendo ser usado em várias formulações cosméticas e ermocosméticas contribuindo para deixa-la macia e com suavidade (CTFA, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A coleta da óleo-resina da espécie *Copaifera reticulata* Ducke foi realizada na Floresta Nacional do Tapajós, localizada no município de Belterra - PA, no km 117 as margens da rodovia BR-163, (S 03° 21' 09,9'' e W 55° 01' 26,5''). Foram selecionadas duas UT's (Unidade de Trabalho) da UPA (Unidade de Produção Anual) 10 da área de Manejo do Projeto Ambé – FLONA do Tapajós. Sob a autorização do SISBIO, número 56937.

Figura 8 – Local da coleta – Belterra – PA, Floresta Nacional do Tapajós, km 117.



Fonte: Autora

3.2 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

A identificação botânica foi realizada pela Embrapa Amazônia Oriental, onde a exsicata foi depositada no Herbário Instituto Agrônômico do Norte (IAN), sob o registro NID: 58/2016.

3.3 COLETA DA ÓLEORRESINA DE COPAÍBA

As coletas foram realizadas em dois períodos sazonais distintos, no ano de 2016, uma no mês de abril (amostra OC), período considerado chuvoso (MORAES et al., 2005) e outra no mês de setembro (amostra OS), período considerado seco (MORAES et al. 2005).

Inicialmente a árvore foi perfurada em duas posições em direção ao centro do tronco, com aproximadamente 1 m a 1,50 m em relação ao solo, com auxílio de um trado tradicional com 2 cm de diâmetro e 45 cm de comprimento (Figura 9a). A óleorresina foi coletada com auxílio de calha metálica e armazenada em recipientes plásticos (Figura 9b). Foi utilizado um cano de PVC medindo $\frac{3}{4}$ de diâmetro e 10 cm de comprimento, em cada um dos furos feitos no tronco da árvore para evitar possíveis resíduos de madeira e auxiliar nas coletas posteriores, (Figura 9c). Após a coleta os canos foram vedados com uma tampa de PVC visando proteger a árvore contra possíveis infestações causadas por fitopatógenos e insetos, e facilitando desta forma coletas posteriores na mesma árvore. E por fim foram transferidos para frascos de vidro âmbar (Figura 9d).

Figura 9: Processo de extração e armazenamento da óleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke: a) Perfuração da árvore de *Copaifera reticulata* Ducke; b) Coleta da oleorresina de copaíba; c) Cano PVC vedado; d) Transferência para frasco âmbar.



Fonte: Autora

3.4 ANÁLISE DA ÓLEORESSINA DE *COPAIFERA RETICULATA* DUCKE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM)

3.4.1 DERIVATIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para realizar a análise das amostras dos óleos de copaíba, foi necessário derivatizar as amostras previamente. A metodologia de derivatização utilizada foi adaptada de Migowska e colaboradores (2010). Foram acrescentados 220 µL de uma solução a 10% de metanol em acetona, para a solubilização das amostras, seguida de 30 µL do reagente de derivatização trimetilsilildiazometano (TMSD). Após esse processo, as soluções foram deixadas em repouso durante 20 minutos para ocorrer a reação, em seguida, foram acrescentados 750 µL de hexano para avolumar as soluções para 1 mL.

3.4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA ÓLEORRESINA DE *Copaifera reticulata* Ducke

Os óleos de copaíba foram caracterizados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). Os constituintes foram identificados baseados em seus índices de retenção, por comparação com padrões, com a literatura (ADAMS, 2007) e com o banco de dados disponível na biblioteca Wiley 6,0. A análise por CG-EM foi realizada em cromatógrafo da Thermo Scientific, equipado com auto-amostrador TriPlus RSH, utilizando uma coluna capilar com as seguintes dimensões Tr-5 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm. As amostras foram inseridas no sistema cromatográfico (1 µL) por meio de injetor a 250 °C, com taxa de divisão 1:50 e vazão de 1 mL/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 90 °C até 160 °C (2,5 °C/min.) e de 160 °C à 290 °C (10,0 °C/min.) com uma isoterma final de 3 minutos. A análise espectrométrica também foi realizada em cromatógrafo em fase gasosa da mesma marca e modelo, utilizando o detector de espectrometria de massas. 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 40 a 600 uma.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

3.5.1 CULTIVO CELULAR

A linhagem celular VERO foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco), e antibióticos penicilina (50µg/mL) e estreptomicina (50µg/mL) (Gibco). Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

3.5.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE *in vitro*

Para a avaliação da citotoxicidade foi utilizada a linhagem VERO (ATCC[®] CCL-81[™]), adquiridas a partir da *American Type Culture Collection* (ATCC). Os ensaios foram determinados pelo método Alamar Blue de acordo com Ahmed e colaboradores (1994).

As células foram plaqueadas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços, e tratadas com a amostra vegetal nas concentrações que variaram de 200 a 25 µg/mL. As placas foram mantidas em incubadora de CO₂ por 24 horas a 5% de CO₂ a 37 °C. Após esse período adicionou-se 10 µL de resazurina 0,4% (diluída 1:20) em cada poço e esperou-se o tempo de metabolização de 2 horas do Alamar blue[®] (Sigma-Aldrich, Brasil). Em seguida a fluorescência foi monitorada em leitor de microplaca (Multimode DTX 800 Beckman Coulter, USA) com o comprimento de onda de 540 nm de emissão e 585 nm de excitação.

Para o controle positivo foi utilizado o crescimento celular; como controle negativo foi utilizado o Tween 20. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada conforme a fórmula: %Viabilidade= $F_t \times 100 / F_b$, onde F_t = (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina) e F_b = (fluorescência da célula + meio + resazurina).

3.6 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

3.6.1 ENSAIO DE DIFUSÃO EM ÁGAR – (TÉCNICA DE POÇO) *in vitro*

Para o ensaio de difusão em ágar foram utilizadas as linhagens bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 80958); *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ATCC 33591) e *Staphylococcus simulans* (ATCC 27851), que pertencem à bacterioteca da Plataforma de Bioensaios Biotecnológicos (RPT11H), do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus-AM, Brazil.

A determinação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de difusão em ágar, pela técnica do poço, segundo Grove e Randall (1955), com modificações. Todas as amostras foram solubilizadas em Tween 20 e a diluição padrão para todos os testes foi

realizada da seguinte forma: Adicionou-se 25 µL de tween 20, 100 µL de Óleo de copaíba e acrescido mais 875 µL de Brain Heart Infusion (BHI), completando um volume de 1 mL. As linhagens foram cultivadas previamente em caldo 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). Todos os ensaios foram feitos em triplicata. Utilizou-se o meio de cultura Ágar Müeller Hinton (AMH) (HIMEDIA) para o ensaio em placa. Como controle positivo foi utilizada a droga TIENAM[®] (imipenem + cilastatina sódica) na concentração de 500 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e então foi adicionada às placas uma solução corante de cloreto de trifetil tetrazólio (CTT) a 0,01% acrescido de 0,1% de ágar bacteriológico, ocorrendo uma reincubação por 30 minutos. Após a conversão de coloração na “sobrecamada” foi feita a medição dos halos de inibição.

3.6.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM), as linhagens bacterianas foram cultivadas previamente em caldo BHI. 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). Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras ativas no teste de difusão em ágar foram determinados utilizando o método de microdiluição em placa de 96 poço, de acordo com CLSI (2012), com modificações. Cada orifício recebeu o inóculo bacteriano padronizado, as amostras foram avaliadas em concentrações que variaram de 113 µg/L a 0,88 µg/L. Foi adicionado 20 µL do revelador resazurina a 0,01%, totalizando um volume de 100 µL/poço.

Como controle negativo foi utilizado o (Tween 20). Para o controle positivo, foi utilizado a droga TIENAM[®] (imipenem + cilastatina sódica) na concentração de 250 µg/mL a 1.95 mg/mL. Em seguida as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A CIM foi definida como a menor concentração das amostras capaz de inibir o crescimento bacteriano, indicado pela permanência da coloração azul da resazurina.

3.7 FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA CONTENDO ÓLEORRESINA DE *C. reticulata* DUCKE

Para obter a formulação semissólida foi utilizada a manteiga extraída das sementes de Murumuru, cedida pela Amazon Oil e o tensoativo PPG-5-CETETH-20 (Procetyl® AWS) adquirido pela MAPRIC.

Para obtenção da formulação base, foi selecionado um sistema emulsionado do tipo líquido cristalino composto de 40% de manteiga de murumuru, 40% de tensoativo e 10% de água, como descrito no pedido de patente BR 1020150308884 e utilizado com autorização prévia dos seus inventores. A formulação base foi preparada por aquecimento da manteiga de murumuru e tensoativo a 45°C, seguida da adição da água à mesma temperatura. A incorporação da óleorresina de copaíba foi realizada na proporção de 10% (p/p) em relação base. Os componentes foram homogeneizados e mantidos à temperatura ambiente ($25 \pm 1,0^\circ\text{C}$) por um período de 24 horas para posterior avaliação Macroscópica (homogeneidade) e aspectos físicos (sólido, líquido opaco e translúcido).

A caracterização do sistema líquido cristalinos foi realizada por microscopia de luz polarizada (MLP). Pequena quantidade de amostra da formulação foi fixada em lâminas e observadas em um microscópio com conjunto de luz polarizada (Leica, DM750) em temperatura ambiente, a fim de identificar possíveis fases líquidas cristalina através de suas propriedades ópticas (ROSEVEAR, 1954).

Para a avaliação da atividade antimicrobiana da formulação base e da formulação incorporada, foi utilizando as mesmas condições e cepas que a avaliação antimicrobiana da óleorresina, pelas técnicas de poço e microdiluição em placas e 96 poços.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise multivariada foi realizada no Minitab® (versão gratuita 390, Minitab Inc., State College, PA, EUA), utilizando como variáveis os compostos com concentração acima de 1%. A matriz de dados foi padronizada subtraindo-se a média e dividindo-se pelo desvio padrão, para Análise de Agrupamento Hierárquico, o método de ligação completo e a distância euclidiana utilizada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ÓLEORRESINA DE *C. reticulata* DUCKE

Em relação aos dados obtidos na coleta, de apenas três árvores (1, 2, 3) foi possível coletar o material botânico para assim identificar em nível de espécie. As amostras foram coletadas em dois períodos sazonais (seco e chuvoso), totalizando seis (06) amostras de óleo-resina de copaíba, sendo identificadas como *Copaifera reticulata* Ducke.

Na Tabela 1 são apresentados os vinte e três componentes químicos identificados com base nos seus espectros de massas, comparados com os da literatura e com a biblioteca eletrônica, e em seus índices de retenção, obtidos por comparação de tempos de retenção. Observa-se que houve uma variação nos percentuais dos constituintes químicos nos períodos sazonais (seco e chuvoso), essa variação na óleo-resina de copaíba pode ocorrer em uma mesma árvore ou entre a mesma espécie.

Tabela 1. Análise da composição química da óleo-resina de *C. reticulata* da FLONA Tapajós no período seco e chuvoso.

Constituintes	TR	IR	PERÍODO SECO (%)			PERÍODO CHUVOSO (%)		
			1	2	3	1	2	3
Isoledeno	12,31	1374	0,17	0,3	0,23	0,27	0,28	0,24
β-elemeno	12,91	1389	-	2,09	-	-	2,02	-
α -gurjuneno	13,21	1409	0,12	0,16	0,26	0,15	0,16	0,48
cis- α -bergamoteno	13,83	1411	-	-	-	0,03	-	-
β-cariofileno	13,97	1417	24,48	32,18	29,76	25,05	37,32	36,57
trans-α-bergamoteno	14,62	1432	11,6	4,7	7,11	12,39	4,07	7,11
cis- β -farneseno	14,89	1440	0,12	0,25	0,07	0,09	-	-
epi- β -santaleno	15,06	1445	-	-	-	0,09	-	-
α-humuleno	15,28	1452	3,44	4,98	3,26	4,83	4,98	3,76
trans- β -farneseno	15,47	1454	0,75	-	0,57	0,8	0,26	0,56
γ -muuroleno	16,22	1478	-	0,28	0,37	0,12	0,26	0,35
Germacreno D	16,38	1480	0,08	0,17	-	0,08	0,21	-
cis- α -bisaboleno	17,34	1506	1,06	0,45	0,56	1	0,3	0,58
β-bisaboleno	17,59	1505	23,49	7,7	8,55	20,29	6,33	10,52
β -sesquifelandreno	18,17	1521	0,87	-	-	-	-	-
δ -cadineno	18,57	1522	-	0,62	0,64	1,02	0,54	0,79
trans- γ -bisaboleno	18,51	1529	-	-	-	0,06	-	-
Cariofilenol	19,94	1570	-	0,12	-	0,03	0,05	-
Óxido de cariofileno	20,47	1582	-	-	-	0,07	0,19	0,11
neo-intermedeol	23,44	1658	-	0,18	-	-	0,26	-
α -cadinol	23,8	1652	-	-	-	0,04	-	-

Éster metílico do ácido 3-metil-5 (2,2,6-trimetil-6-hidroxi-1-ciclohexil)-pentanoato de metila	30,34	-	4,71	4	-	7,06	2,11	-
caur-16-eno	33,59	-	0,45	0,41	0,37	0,39	0,45	0,3
Éster metílico do ácido eperúico	35,73	-	0,11	0,29	0,05	0,11	0,34	-
Éster metílico do ácido labda-15-oico	35,92	-	0,54	0,61	-	0,78	0,26	-
Éster metílico do ácido catívico	36,1	-	2,06	3,09	0,15	2,47	3,04	0,07
Éster metílico do ácido caurenico	36,44	-	4,85	4,78	16,05	1,2	6,65	14,15
Éster metílico do ácido cauranoico	36,62	-	9,93	9,49	-	11,62	9,19	-
Éster metílico do ácido copálico	36,57	-	-	-	2,02	-	-	1,51
Éster metílico do ácido labda-7,13-dien-15-oico (37,01)/Éster metílico do ácido daniélico (37,07)	37,07	-	3,12	5,75	19,25	2,09	7,41	15,83
Éster metílico do ácido pinifólico	38,2	-	0,87	0,75	0,51	1,5	0,61	-
Éster metílico do ácido agático	38,89	-	-	-	1,53	-	-	1,02
Total (%)			92,82%	83,35%	91,67%	93,78%	87,14%	93,95%
TR = Tempo de retenção	IR = Índice de retenção.							

De acordo com os dados obtidos, foram identificados 23 constituintes que cobrem mais de 93% da composição química da óleorresina (Tabela 1). Os percentuais dos componentes variam entre os indivíduos. Os principais compostos encontrados foram o β -cariofileno (de 24,48 a 32,18% no período seco e 25,05 a 37,32% no período chuvoso) e o ácido cauranoico (de 9,49 a 9,93% no período seco e 9,19 a 11,62% no período chuvoso), sendo o β -cariofileno considerado o marcador químico do gênero *Copaifera spp.* Outros constituintes principais foram encontrados, como o β -bisaboleno (de 7,70 a 23,49% no período seco e 6,33 a 20,29% no período chuvoso), α -humuleno (de 3,26 a 4,98% no período seco e 3,76 a 4,98% no período chuvoso), *trans*- α -Bergamoteno (de 4,70 a 11,6% no período

seco e 4,07 a 12,39 % no período chuvoso), ácido catívico (de 2,06 a 3,09% no período seco e 2,47 a 3,04% no período chuvoso), ácido caurenóico (de 4,78 a 16,05% no período seco e 6,65 a 14,15% no período chuvoso) e ácido daniélico (de 3,12 a 19,25% no período seco e 2,09 a 15,83% no período chuvoso). Esta variação distingue os óleos produzidos pela mesma espécie de copaíba, e da marcada presença do constituinte β -cariofileno em todos os indivíduos e em ambos os períodos sazonais.

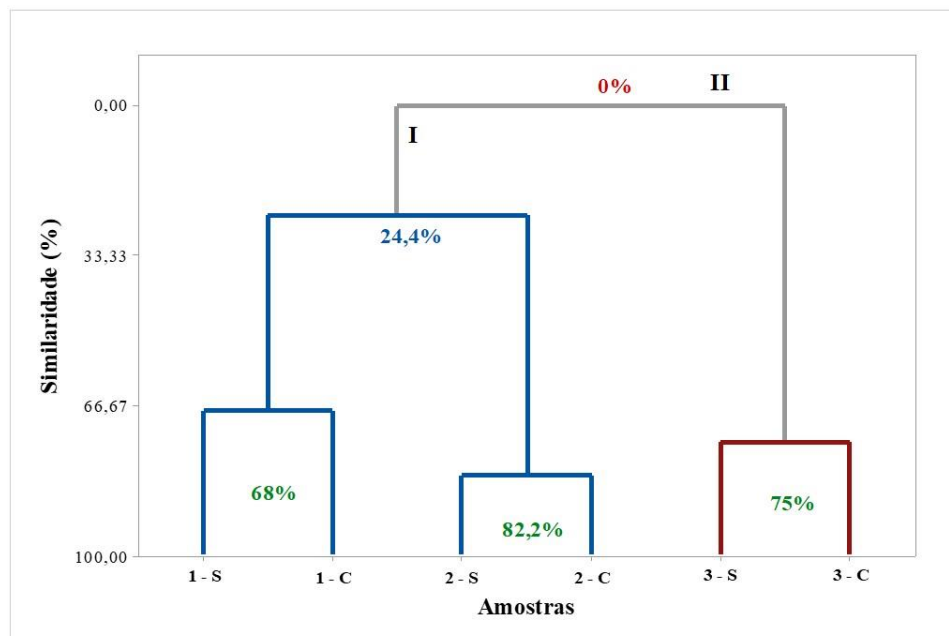
O indivíduo da amostra 1 foi a que obteve maior relevância no período seco cobrindo 92,82% dos constituintes da amostra total, seguida do indivíduo da amostra 2 com 91,67% e o indivíduo da amostra 3 com o menor valor 83,35%. Já no período chuvoso foi o indivíduo da amostra 2 cobriu 93,95% dos constituintes e o indivíduo da amostra 1 cobriu 93,78% e o indivíduo da amostra 3 cobriu 87,14%. Demonstrando assim que as espécies variaram pouco em relação ao período sazonal, mas que houve uma diferença significativa em relação à variação dos constituintes entre os indivíduos das amostras estudadas, evidenciando a diferença entre as amostras, apesar de pertencerem à mesma espécie.

Os resultados descritos para o estudo sazonal são compatíveis com a classificação obtida nas análises de PCA (Análise de componentes principais) e HCA (Hierarquia dos componentes), que estão apresentados nos Gráficos 1 e 2. Os dois primeiros componentes (PC1 = 62,3% e PC2 = 32,6%) do Gráfico 2, com um total de 94,9% da variância, apresentaram os principais componentes responsáveis pelo agrupamento das amostras de óleos. A análise de agrupamento confirma a formação dos grupos de árvores de constituintes primários, que não foram distintos nos períodos seco e chuvoso, mas sim de uma árvore para outra, conforme observado no respectivo dendrograma (Gráfico 1). Observa-se que os óleos das três árvores, em ambos os períodos sazonais, possuem níveis de similaridade de 68% (indivíduo da amostra 1), 82,2% (indivíduo da amostra 2) e 75% (indivíduo da amostra 3), dessa forma, devido ao alto percentual de similaridade, pode-se dizer que esses óleos não possuem diferença significativa em sua composição química, pois não houve a formação de grupos em relação ao período de coleta.

O mesmo não foi observado quando se analisa o óleo das três árvores, onde foi verificada a formação de dois grupos. O grupo I (indivíduos das amostras 1 e 2), resultante do agrupamento de óleos coletados nos períodos seco e chuvoso, caracterizado por maior porcentagem de trans- α -bergamoteno, β -bisaboleno, cis- α -bisaboleno, pentanoato de metila, Éster metílico do ácido caurenóico, Éster metílico do ácido catívico, α -humuleno e β -elemeno. O grupo II (indivíduos da amostra 3), resultante do agrupamento dos óleos coletados dessa árvore nos períodos seco e chuvoso, foi caracterizado por um maior teor de β -

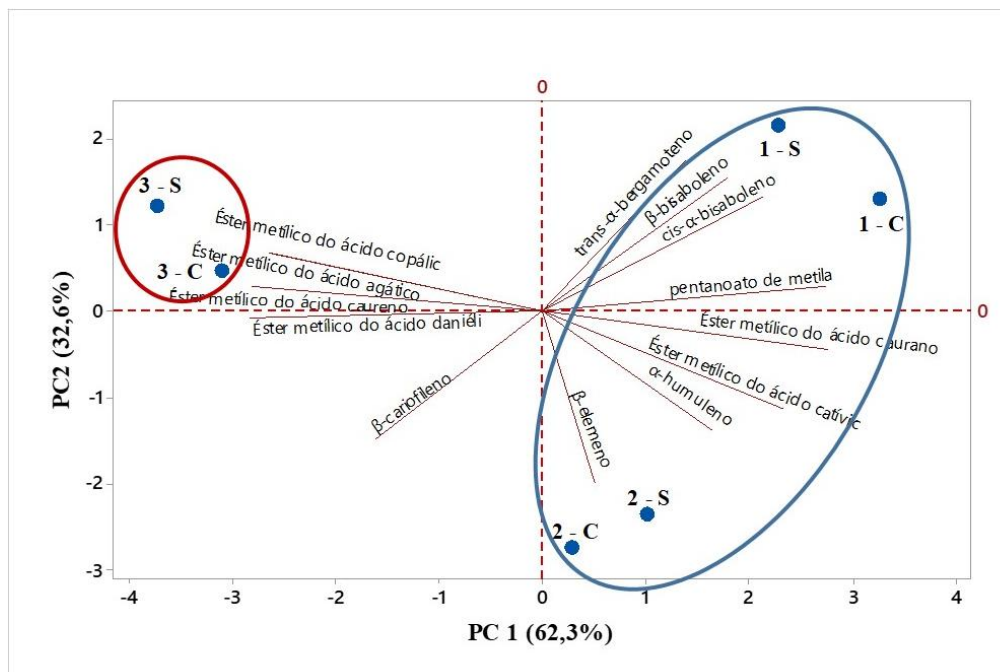
Cariofileno, Éster metílico do ácido copálico, Éster metílico do ácido agático, Éster metílico do ácido caurenóico e Éster metílico do ácido daniélico. Essa diferenciação em grupos mostrada pela análise multivariada confirma que a sazonalidade não foi um fator determinante na composição química da óleoresina de *Copaifera reticulata* Ducke durante o ano de 2016, mas a árvore de procedência do óleo acarretou variância na composição, indicando que o local de coleta, possivelmente outros fatores ecológicos, pode ser o motivo da diferenciação da composição química dos óleos.

Gráfico 1. Dendrograma de HCA (Análise de Agrupamento Hierárquico) representando a relação de similaridade da composição dos óleos de *Copaifera reticulata* Ducke, em relação à sazonalidade árvores de procedência.



Fonte: Autora

Gráfico 2. Análise dos componentes principais (HCA) dos óleos de *Copaifera reticulata* Ducke no estudo sazonal.



Fonte: Autora

Estes resultados corroboram com a maior parte dos trabalhos descritos na literatura para as espécies do gênero *Copaifera* (PIERI, 2009; LEANDRO, 2012; LUCCA, 2013).

A literatura reporta que a variabilidade tanto na composição química, quanto na produção da óleo-resina estão relacionadas a fatores como genética, nutrição, luminosidade e sazonalidade, mas principalmente a fatores bióticos, pois sua produção é resultado da desintoxicação do organismo vegetal, servindo como defesa contra a ação de fungos, insetos, bactérias e outros agentes lesivos (GARCIA & YAMAGUCHI, 2012; LUCCA, 2013).

Em outros exemplos, no entanto, variações populacionais quanto à composição química do óleo podem ocorrer entre indivíduos de um mesmo habitat, compartilhando as mesmas condições de clima e solo, em um mesmo período de coleta, o que indica a base genética da variação (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Zoghbi e colaboradores (2009), em estudo acerca da variabilidade da composição química de *C. reticulata* Ducke em diferentes municípios, observaram que o óleo coletado em Almeirim/ Pará possui como componentes majoritários o β -cariofileno (13%), α -bergamoteno (29,2%) e β -bisaboleno (28,5%); o óleo coletado em Belterra/ Pará apresentou como constituintes majoritários em amostras de duas árvores o β -cariofileno (5,1%, 11,3%), α -bergamoteno (11,8%, 25,9%) e β -bisaboleno (36,9%, 18,4%); o óleo coletado em Curionópolis/ Pará apresentou o β -cariofileno (19%), α -bergamoteno (8,1%), α -selineno

(8,2%), β -selineno (5,4%), β -bisaboleno (18,2) e óxido de cariofileno (15,2%), demonstrando a variabilidade quanto o teor dos constituintes corroborando com os resultados apresentados neste trabalho. Desse modo, a composição do óleo de *Copaifera* varia entre os indivíduos da mesma espécie, dependendo de seu potencial genético e fatores ambientais aos quais os indivíduos estão sujeitos.

No trabalho realizado por Ziech e colaboradores (2013), foram identificado o β -cariofileno, α -bergamoteno, α -selineno, α -humuleno, α -selineno e β -bisaboleno como os componentes majoritários em óleorresina de *C. reticulata* Ducke coletado em maio de 2011 na FLONA do Tapajós. Que possuem comprovada ação anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica (PIERI et al., 2009).

Segundo Lucca (2013), os compostos β -cariofileno e o β -bisaboleno apresentam importância significativa por suas propriedades farmacológicas anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiedêmica e analgésica. Outros constituintes como α -humuleno e β -selineno apresentam aromas marcantes, sendo utilizados principalmente pela indústria de perfumes (VEIGA JUNIOR E PINTO, 2002).

O β -cariofileno é considerado um marcador químico da fração de sesquiterpenos de copaíba por ser o único encontrado em todas as óleorresinas já analisadas, considera-se ainda este composto como o principal constituinte para a espécie *C. reticulata* Ducke (BARBOSA et al., 2012).

Na revisão bibliográfica realizada por Salgueiro e colaboradores (2016) sobre os compostos encontrados na fração resinosa de óleorresinas de *Copaifera spp.* verificou-se que os diterpenos mais encontrados foram o ácido hardwíckico, colavenol, ácido copáferico, ácido copálico, entre outros, que corroboram com os diterpenos encontrados neste trabalho.

No estudo desenvolvido por Veiga Júnior & Pinto (2002), estes observaram que o ácido copálico foi o único composto a ser detectado em todos os óleos estudados por eles indicando que este, poderia ser utilizado como biomarcador para o gênero *Copaifera*. O que vai de encontro com os resultados encontrados neste trabalho, pois o ácido copálico só foi detectado em apenas uma amostra.

Avaliando o fracionamento cromatográfico de óleos de *Copaifera langsdorffii* Maciel e colaboradores (2002), mostrou que os diterpenos colavenol e o ácido hardwickico apresentaram potente atividade antitumoral, sem, contudo, apresentarem toxicidade.

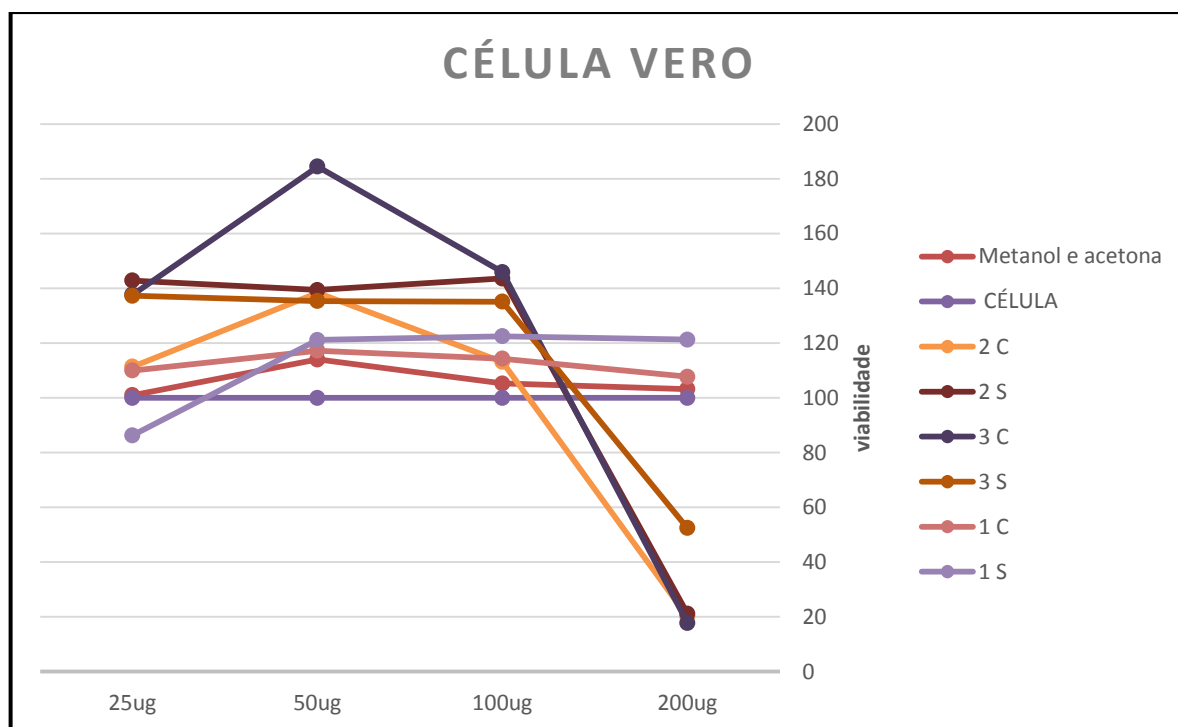
Entre os diterpenos, o ácido caurenóico é o mais estudado, tendo sido descrito como sendo um agente tripanossomicida (ALVES et al., 1995), apresentando CI50 de 0,5 mg/mL (1,66 mM) em ensaios *in vitro* contra a forma tripomastigota de *T. cruzi*; bactericida

(MACIEL et al., 2002); larvicida contra *Aedes aegypti* (SLIMESTAD et al., 1995); estimulador de contração uterina (PAGE, et al., 1992); antinociceptivo (BLOCK et al., 1998).

4.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA

Os resultados obtidos pela atividade citotóxica são mostrados no Gráfico 3. De acordo com as concentrações utilizadas, os indivíduos das amostras 2 C, 2 S, 3 C e 3 S apresentaram citotoxicidade apenas na concentração de 200 µg/mL, e o indivíduo da amostra 1 C e 1 S não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações utilizadas. Demonstrando assim, que o potencial de citotoxicidade das amostras é baixo frente à célula testada.

Gráfico 3: Análise da citotoxicidade da óleorresina em células da linhagem vero.



Fonte: Autora

Silva e colaboradores (2018) avaliaram a citotoxicidade em extratos de *Jatropha gossypifolia* L. pelo método de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]), no qual foram utilizados macrófagos da linhagem J774, em concentrações parecidas com as deste trabalho. Mas evidenciou moderada e severa citotoxicidade, para folhas na menor concentração de 62,4 µg/mL (51,00%), e nos extratos dos galhos, na concentração de 62,5 µg/mL.

Nos resultados encontrados em condição semelhantes aos da presente pesquisa e o de Santos e colaboradores (2008) sobre citotoxicidade da óleorresina de *Copaifera reticulata*, que demonstrou possuir baixa citotoxicidade para a linhagem de macrófagos J774G8, além de ser mais tóxico para células promastigotas e amastigotas, o que lhe atribui alta seletividade.

Acredita-se que os sesquiterpenos e diterpenos, presentes na óleorresina, como o α -copaeno, ácido copálico, ácido caurenóico, trans- α -bergamoteno e β -cariofileno, que são os componentes majoritários do gênero *Copaifera*, possuam baixa toxicidade (LIMA et al. 2003). O que pode estar influenciando na baixa citotoxicidade encontrada nos resultados dessa pesquisa.

4.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

4.2.1 DIFUSÃO EM ÁGAR – (TÉCNICA EM POÇO)

Em relação à atividade antibacteriana, todas as amostras apresentaram ação antibacteriana, frente às cepas testadas (Tabela 2). Com variação das médias dos halos de inibição de 8,66 a $19,33 \pm 2,51$ mm. A bactéria *S. aureus* metilicina resistente obteve um maior halo frente à maioria das amostras em ambos os períodos sazonais, exceto pelas amostras 3 S e 1 C que obteve halo superior para a cepa *S. simulans*. Com estes resultados foram realizados os testes de concentração inibitória mínima (CIM).

Tabela 2: Análise da atividade antibacteriana da óleorresina de *C. reticulata* de ambos os períodos sazonais, frente às bactérias MRSA, *S. aureus* e *S. simulans*.

Bactérias Gram-positivas				
Espécie	Amostras	MRSA	<i>S. aureus</i>	<i>S. simulans</i>
<i>Copaifera reticulata</i> Ducke	1C	8,66 \pm 0,57 mm	8,66 \pm 0,57 mm	13 \pm 1 mm
	1S	11 \pm 1,73 mm	10 \pm 1,73 mm	11,33 \pm 1,52 mm
	2S	16,66 \pm 1,52 mm	10,66 \pm 0,57 mm	12,66 \pm 2,88 mm
	2C	13,33 \pm 1,52 mm	12,33 \pm 0,57 mm	11,66 \pm 1,15 mm
	3C	13,33 \pm 1,52 mm	12,33 \pm 0,57 mm	12,66 \pm 0,57 mm
	3S	14,66 \pm 0,57 mm	12,66 \pm 1,15 mm	16,66 \pm 0,57 mm

TIENAM [®]	39,33 ± 057 mm	41±0,81 mm	32,3 ± 0,57 mm
---------------------	-------------------	------------	----------------

*Média e desvio padrão das amostras de óleos, frente às cepas de bactérias gram-positivas.

4.2.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

De acordo com os resultados obtidos, os indivíduos amostras 2 S e 1 C apresentaram atividades frente a MRSA na concentração de 56,5 µg/L. Também foi possível observar atividade no indivíduo da amostra 1 C frente a *S. aureus*. Os demais indivíduos das amostras analisadas não apresentaram CIM, nas concentrações utilizadas.

Aligianis e colaboradores (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como: forte inibição - CIM até 500 µg/mL; inibição moderada – CIM entre 600 e 1.500 µg/mL e como fraca inibição - CIM acima de 1.600 µg/mL. Desta forma, pode-se considerar como forte a ação da óleo-resina dos indivíduos das amostras 2 S e 1 C frente à bactéria MRSA, com valores de 56,6 µg/mL. O indivíduo da amostra 1 C ainda inibiu fortemente o crescimento do microrganismo *S. aureus*, na concentração de 56,6 µg/mL. Todos os demais indivíduos das amostras analisadas não apresentaram CIM satisfatória nas concentrações utilizadas (Tabela 3).

Tabela 3: CIM por microdiluição em placas da óleo-resina de *C. reticulata* frente às cepas de MRSA, *S. aureus* e *S. simulans*.

Bactérias Gram-positivas				
Espécie	Amostras	MRSA	<i>S. aureus</i>	<i>S. simulans</i>
<i>Copaifera reticulata</i> Ducke	1C	56,5 µg/mL	56,5 µg/mL	-
	2C	56,5 µg/mL	-	-
	TIENAM [®]	1.95 µg/mL	1.95 µg/mL	1.95 µg/mL

*Média e desvio padrão das amostras de óleos, frente as cepas de bactérias gram-positivas.

Estudo realizado por Ziech e colaboradores (2013) sobre a atividade antimicrobiana da óleo-resina de copaíba frente a *Staphylococcus* coagulase-positiva multirresistentes

evidenciou em seus resultados ação antimicrobiana através da CMI e CMB, demonstrada sua eficácia em concentrações inferiores a 2,62mg/mL.

Outro estudo que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho é o apresentado por Santos e colaboradores (2008) que confirma a atividade bactericida da óleorresina de *C. reticulata* Ducke frente a cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. aureus* meticilina resistente (MRSA), onde foi verificado a resistência de Gram-negativas *K. pneumoniae* (ATCC 13883) (ATCC 25933), *E. coli* (ATCC 25922), *S. flexneri* (ATCC 12022) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853), utilizando a técnica de microdiluição em caldo, e apontam uma CMI de 62,5µg/mL. Já Pacheco e colaboradores (2006) utilizando essas mesmas condições testaram onze óleos de copaíba, sendo cinco *C. multijuga* Hayne e seis *Copaifera* sp., e não observaram inibição de *E. coli* e *P. aeruginosa*.

É importante ressaltar que os distintos resultados entre os trabalhos podem estar relacionados às diferenças nas concentrações dos metabólitos na composição química dos óleos dentro da própria espécie. Nascimento e colaboradores (2007) demonstram em seu trabalho a atividade antimicrobiana do β -bisaboleno frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e que a sinergia com o β -lactâmicos pode ser eficaz frente a cepas β -lactamase positivas.

Os sesquiterpenos β -elemeno, cariofileno e α -cadineno são agentes anticarcinogênicos sendo este último também bactericida (CMI 800 mg/ml) (MACIEL et al., 2002).

Huang e colaboradores (2012), descreve o potencial do β -cariofileno na inibição do crescimento bacteriano. Pichette e colaboradores (2006) relatam que embora não existam registros sobre a atividade do α -bergamoteno na sua forma isolada, a literatura apresenta evidências de que este composto também contribui para a atividade antibacteriana detectada. Existem também outros compostos da óleorresina de copaíba presentes em menor quantidade, que podem desempenhar função na atividade antibacteriana como é o caso do α -humuleno.

Em relação à atividade antimicrobiana, não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições superiores (DUARTE, 2006).

4.4 FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA CONTENDO ÓLEORRESINA DE *C. reticulata* DUCKE

4.4.1 MACROSCÓPIA DA FORMULAÇÃO

Na análise macroscópica da formulação líquido cristalina contendo a óleo-resina de *C. reticulata*, foi verificado que a amostra se apresentou estável, com aspecto de gel, de cor amarelo claro e odor amadeirado (Figura 10), sem a ocorrência de fases conforme apresentada pela amostra mantida a temperatura ambiente ($22\pm 25^{\circ}\text{C}$).

Figura 10: Formulação semissólida contendo óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke.

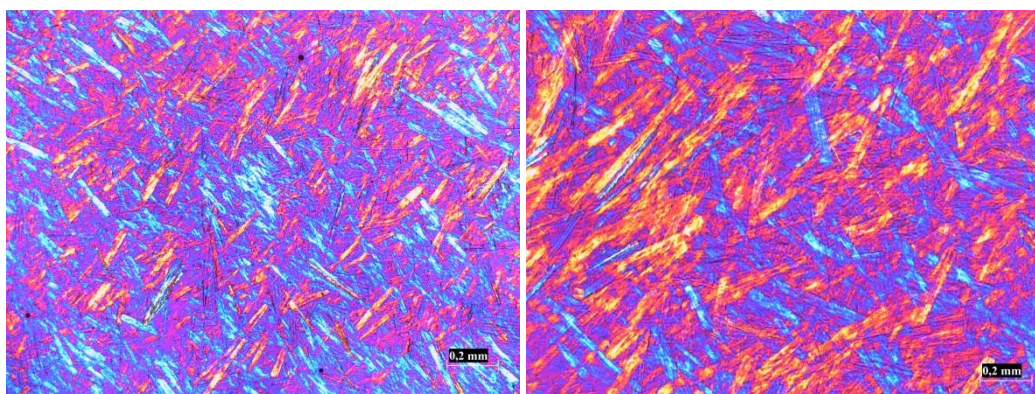


Fonte: Autora

4.4.2 MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

Após 24 horas do preparo, quando submetidas à microscopia de luz polarizada as formulações líquido cristalinas com e sem óleo-resina de *C. reticulata* apresentaram anisotropia e birrefringência, com textura em forma de estrias, característico de fase hexagonal (Figura 11).

Figura 11: Fotomicrografias da formulação semissólida, utilizando as objetivas de 5x e 10x, respectivamente.



Fonte: Autora

Em alguns trabalhos que relacionam a fotomicrografia em formulação sob um plano de luz polarizada, relatam que a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. E que mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas, enquanto as cúbicas são isotrópicas (GONG et al., 2011). Corroborando com os resultados encontrados nessa pesquisa.

A fase lamelar é apresentada como líquido viscoso e a fase hexagonal tem a viscosidade semelhante à de um gel (GABBOUN et al., 2001; HYDE, 2001), o que se assemelha com os dados obtidos na formulação desse trabalho.

Estudos realizados por Rissi (2013) corroboram com este trabalho, que observou que houve um desvio sob o plano de luz polarizada (anisotropia), proporcionando o aparecimento de “cruzes de malta”, característica de arranjo líquido cristalino de fase lamelar, sendo revelada através da anisotropia das amostras uma mistura de fases, visualizando-se estruturas de fase lamelar e estruturas parecidas com “estrias”, característica do arranjo líquido cristalino de fase hexagonal.

A fase hexagonal vem sendo empregada em alguns estudos para liberação sustentada de Fármacos. Estas fases formadas por lipídeos podem resistir à diluição dos fluidos corporais, o que aumenta o tempo de retenção da formulação no sítio de aplicação e possibilita uma liberação sustentada de fármacos (LIBSTER et al., 2007; PHELPS et al., 2011; BÁEZ-SANTOS et al., 2016; CALIXTO et al., 2016).

4.4.3. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA FORMULAÇÃO

Em relação à atividade bacteriana da formulação semissólida, foram utilizadas as mesmas cepas ATCCs analisadas apenas com a óleorresina. Utilizando a base como controle negativo e o TIENAM[®] como controle positivo.

A tabela 4 mostra os valores dos halos de inibição (média \pm desvio padrão) da formulação semissólida incorporada com a óleorresina de copaíba, que demonstrou ser potencialmente ativa, em todos os microrganismos testados. Com halos de inibição de 24,66 \pm 0,57 mm para a cepa *S. aureus*; 20,66 \pm 1,15 mm para *S. simulans* e 19,33 \pm 2,51 mm para MRSA.

Tabela 4: Análise antibacteriana da formulação e da base frente às bactérias MRSA, *S. aureus* e *S. simulans*

Tipo	Amostras	MRSA	<i>S.aureus</i>	<i>S.simulans</i>
Sistema Líquido Cristalino-	Base	13,00 \pm 0,00	11,66 \pm 1,15	14,44 \pm 0,57 mm
	Formulação	mm	mm	
		19,33 \pm 2,51	24,66 \pm 0,57	20,66 \pm 1,15 mm

Emulsionado		mm	mm	
	TIENAM [®]	42,33±0,57	44,66±0,57	43,66±0,57 mm
		mm	mm	

*Média e desvio padrão das amostras de óleos, frente às cepas de bactérias gram-positivas.

A tabela 5 mostra os valores dos halos de inibição (média ± desvio padrão) da óleo-resina, da base e da formulação semissólida incorporada com a óleo-resina de copaíba, para análise comparativa entre as amostras. A partir dessa análise, foi possível observar que a formulação incorporada com a óleo-resina apresentou maior halo de inibição, ou seja, potencialmente mais ativa do que quando analisados isoladamente (óleo-resina, base e formulação contendo óleo-resina).

Tabela 5: Análise antibacteriana da óleo-resina, da base e da formulação frente às bactérias MRSA, *S. aureus* e *S. simulans*.

Amostras	MRSA	<i>S. aureus</i>	<i>S. simulans</i>
Óleo-resina	8,66 mm	8,66 mm	13,0 mm
Base (manteiga de murumuru + tensoativo)	11,66 mm	14,44 mm	13,0 mm
Formulação incorporada	19,33 mm	24,66 mm	20,66 mm
	13,2±5,50	15,92±8,10	15,55±4,42

*Média e desvio padrão das amostras de óleos, frente às cepas de bactérias gram-positivas.

Estudo realizados por Sousa e colaboradores (2014) demonstraram que a atividade antimicrobiana do sistema líquido cristalino para tratamento de doença periodontal, apresentaram difusão do fármaco para o meio de cultura com consequente inibição do crescimento microbiano frente a *Streptococcus mutans* e *C. albicans*.

O sistema emulsionado pode favorecer o processo de incorporação de fármacos com baixa solubilidade em água ou compostos lipofílicos de origem vegetal a exemplo de óleos essenciais e fixos (SOUSA, 2014), o que pode estar atribuindo uma maior atividade microbiológica a formulação semissólida incorporada.

Estudos realizados por Gabboun e colaboradores (2001) a cerca das interações fármaco-sistema demonstraram seu importante papel no controle da liberação de fármacos. E que a liberação de fármacos incorporados em sistemas líquido cristalinos dependerá da estrutura da mesofase assim como das características físico-químicas do fármaco. Essas propriedades tornam possível a utilização de cristais líquidos como veículos transportadores

de fármacos, os quais podem ser capazes de controlar a liberação das substâncias neles incorporados.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na análise química demonstram que os percentuais dos componentes variaram entre os indivíduos. E na análise de agrupamento foi identificada a formação dos grupos de árvores de constituintes primários, que não foram distintos nos períodos seco e chuvoso, mas sim de uma árvore para outra. Dessa forma, a sazonalidade não foi um fator determinante na composição química da óleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke durante o ano de 2016, mas houve uma variação no percentual dos constituintes químicos de uma árvore para outra;

A óleorresina da espécie estudada apresentou baixa citotoxicidade para as linhagens de células testadas, viabilizando o prosseguimento dos estudos com essa espécie do gênero *Copaifera*;

Foi verificada a ação antibacteriana da óleorresina e da formulação, frente às cepas testadas, com variação das médias dos halos de inibição. A bactéria *S. aureus* metilicina resistente obteve maior halo frente à maioria das amostras em ambos os períodos sazonais;

À formulação semissólida mostrou-se potencialmente mais ativa após a incorporação da óleorresina na base, apresentou-se estável, com aspecto de gel, de cor amarelo claro e odor amadeirado, sem a ocorrência de fases.

Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho reforçam ainda mais a importância da óleorresina de copaíba proveniente da região Amazônica como fitoterápico com potencial antibacteriano, sendo desta forma, uma fonte promissora para a elaboração de novos fármacos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P., Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, **Allured Publishing**, Carol Stream, IL, 4 ed., 2007.
- AHMED, S. A., GOGAL-JÚNIOR, R. M., WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. 1994. **J. Immunol. Methods**. 170, 211-224.
- 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): 79-82, 1982.
- ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 49: 4168-4170, 2001.
- ALVES, T. M. A.; CHAVES, P. P. G.; SANTOS, L. M. S. T.; NAGEM, T. J.; MURTA, S. M. F.; CERAVOLO, I. P.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L.; **Planta Med.** 1995, 61, 85.
- ARAÚJO JÚNIOR, F. A. et al. Efeito do óleo de copaíba nas aminos transferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.20, n.1, p.93-9, 2005.
- ASSIS, M. A.; MORELLI-AMARAL, V. F.; PIMENTA, F. P. Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol. 9(1): 1-72, Jan-Mar 2015.
- AZANI, N.; BABINEAU, M.; BAILEY, C.; BANKS, H.; BARBOSA, A. R.; PINTO, R. B.; BOATWRIGHT, J. S. The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **TAXON** 66 (1). February 2017: 44–77. <https://doi.org/10.12705/661.3>.
- BADKE, M. R.; SOMAVILLA, C. A.; HEISLER, E. V.; ANDRADE, A. de; BUDÓ, M. de L. D.; GARLET, T. M. B. Saber Popular: Uso De Plantas Mediciniais Como Forma Terapêutica No Cuidado à Saúde: **Revista de Enfermagem** da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p. 225-234, Abr./Jun. 2016.
- BÁEZ-SANTOS, Y. M. et al. Formulation and characterization of a liquid crystalline hexagonal mesophase region of phosphatidylcholine, sorbitan monooleate, and tocopherol acetate for sustained delivery of leuprolide acetate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 514, n. 1, p. 314-321, 11/30/ 2016.
- BARBER, M. Staphylococcal infection due to penicillin-resistant strain. **British Medical Journal**, v. 2, p. 863-865, 1947.
- BARBOSA, K. S.; SCUDELLER, V. V.; ROSA, A. L. Potencial de produção de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne nos dois períodos climáticos amazônicos na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé. In: SANTOS-SILVA, Edinaldo Nelson dos (Org.)

Biotupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central. Manaus: INPA, p. 169-180, 2009.

BARBOSA, P. C. S.; MEDEIROS, R. S.; SAMPAIO, P. T. B.; VIEIRA, G.; WIEDEMANN, L. S. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): soil composition, seasonality and diameter at breast height. **Jornal Sociedade Brasileira de Química** 23 (10): 1823 – 1833, 2012.

BARLÉU, G. Historia dos feitos recentemente praticados durante oito anos no Brasil (Coleção reconquista do Brasil, v.15). Belo Horizonte: **Ed. Itatiaia**, 1974. 141p.

BECKER, K.; HU, Y.; BILLER-ADORNO, N. Infectious diseases – a global challenge. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 179-185, 2006.

BIO: Biotechnology Industry Organization: Guide to Biotechnology. 2007.

BLOCK, L. C.; SANTOS, A. R. S.; SOUZA, M. M.; SCHEIDT, L.; YUNES, R. A.; SANTOS, M. A.; DELE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. J. **Ethnopharmacol.** 61, 85, 1998.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.408-420, 2006.

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. 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.

CALIXTO, G. Design and Characterization of a Novel p1025 Peptide-Loaded Liquid Crystalline System for the Treatment of Dental Caries. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 158, 2016. ISSN 1420-3049.

CARVALHO, J. C. T.; SILVA, M. F. C.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; NUNES, D. S.; LIMA, R. M. L.; BASTOS, J. K.; SARTI, S. J. **Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies.** *Planta Med*, 1996.

CARVALHO, J. C. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research** 19 (11): 946-50, 2005.

CARVALHO, L. O.; MILKE, L. T. Importância terapêutica do óleo-resina de copaíba: enfoque para ação antiinflamatória e cicatrizante. **Revista eletrônica de farmácia**, REF–ISSN1808-0804 Vol.XI (2),25–36, 2014.

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

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

CASTRO, J. C; FIGLIUOLO, R; NUNOMURA, S. M; SILVA, L. P; MENDES, N. B; COSTA, M. S. T; BARRETO, A. C; CUNHA, T. M. F; KOOLEN, H. H. F. Produção sustentável de biodiesel a partir de oleaginosas amazônicas em comunidades isoladas. CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1 **Resumo...** v.2, p. 285-289, Brasília, 2006.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. v. 1, n. 13, p. 520-529, 2011.

CLEFF, M. B. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 43-49, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility. Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard – Ninth edition. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2012.

COLOMBO, M. L.; ASSIM, F.; PUPPA, T. D.; MORO, P.; SESANA, F. M.; BISSOLI, M.; BORGHINI, R.; PEREGO, S.; GALASSO, G.; BANFI, E.; DAVANZO, F. Most commonly plant exposures and intoxications from outdoor toxic plants. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.2, n.7, p.417-25, 2010.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais**: do cultivo à terapêutica. 6. ed. Petrópolis: Vozes, 2003.

COSMETIC, TOILETRY, AND FRAGRANCE ASSOCIATION – CTFA. **Internacional Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook**, 5282p. 4 Ed, Washington, D.C, 2008.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico & perspectivas. **Quim. Nova**, Fortaleza, Vol. 32, No. 3, 703-716, 2009.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p.564-582. 1999.

DEL FIOLE, F. S.; LOPES, L. C.; TOLEDO, M. I.; BARBERATO-FILHO, S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 43, n. 1, p. 68-72, 2010.

DRUMOND, M. R. S.; CASTRO, R. D.; ALMEIDA, R. V. D.; PEREIRA, M. S. V.; PADILHA, W. W. N. Estudo comparativo in vitro da atividade antibacteriana de produtos

fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v. 4, p. 33-8, 2004.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Ver. **MultiCiência**, 2006.

EHLERT, P. A. D. Influência do horário de colheita sobre o rendimento e composição do óleo essencial de erva-cidreira brasileira [*Lippia alba*(Mill.) N. E. Br. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 72-77, 2013.

FARIAS, R. A. F.; RAO, V. S. N.; VIANA, G. S. B.; SILVEIRA, E. R.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Hypoglycemic effect of trans ehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Med.** 1997.

FERREIRA, L. A. **Potencial de extração e comercialização do óleo-resina de copaíba** (*Copaifera* spp.): um estudo de caso na Floresta Estadual do Antimary, Acre. 1999. 54f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Manejo de Recursos Naturais). Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 1999.

FREIRE, C. E. T. **Biotechnologia no Brasil: uma atividade econômica baseada em empresa, academia e Estado**. 2014. Tese (Doutor em Sociologia) 2014 f – Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Orientação do Prof. Dr. Glauco A. T. Arbix.

GABBOUN, N. H.; NAJIB, N. M.; IBRAHIM, H. G.; ASSAF, S. Release of salicylic acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.212, p.73-80, 2001.

GARCIA, R. F.; YAMAGUCHI, M. H. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, p. 137-146, jan./abr. 2012.

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

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive activity of amazonian copaiba oils. **J Ethnopharmacol.** 109: 486-492, 2007.

GONG, M. J. MOGHADDAM, S. M. SAGNELLA. “Lyotropic liquid crystalline self-assembly material behavior and nanoparticulate dispersions of a phytanyl pro-drug analogue of capecitabine—a chemotherapy agent,” **ACS Applied Materials & Interfaces**, vol. 3, no. 5, pp. 1552–1561, 2011.

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

HEIKENS, E.; FLEER, A.; PAAUW, A.; FLORIJN, A.; FLUIT, A. C. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, 43:2286- 2290, 2005.

HUANG, M. M., SANCHEZ-MOREIRAS, A. M. A. M., ABEL C. C., SOHRABI, R. R.; LEE S.S.; GERSHENZON, J. J.; THOLL, D. D. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)-b-caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. **New Phyt.** 193(4):997-1008. 2012.

HUANG, S. Y.; TANG, R. B.; CHEN, S. J.; CHUNG, R. L. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia in critically ill children: risk factors and antimicrobial susceptibility. **The Journal of Microbiology, Immunology and Infection** 36:51-55, 2003.

HYDE, S. T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOLMBERG, K., ed. Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry. New York: **John Wiley & Sons**, cap.16, p.299-332, 2001.

JEVONS, M. P. "Celbenin"-resistant Staphylococci. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5219, p. 124-125, 1961.

LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K. O.; SILVA, J. A.; VEIGA JUNIOR, V. F. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. **Molecules**, 17: 3886-3889, 2012.

LEITE, A. Recomendações para o manejo sustentável do óleo de copaíba. Rio Branco: Universidade Federal do Acre, 2001. 38 p.

LIBSTER, D. An HII liquid crystal-based delivery system for cyclosporin A: Physical characterization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 308, n. 2, p. 514-524, 4/15/2007. ISSN 0021-9797.

LIMA, C. S. **Estudo da toxicidade não clínico em ratos submetidos ao tratamento com óleoresina de *Copaifera duckei* dwyer (subcrônico e reprodutivo)**. Tese (Doutorado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Amapá, 2014.

LIMA, S. R. M.; VEIGA JUNIOR, V. F.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. In vivo and in vitro Studies on the Anticancer Activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its Fractions. **Phytotherapy Research**. v.17, p. 1048–1053, 2003.

LOPES, J. P. N.; CORRÊA, N. C. F.; FRANÇA, L. F. **Transesterificação de Óleo de Murumuru (*Astrocaryum murumuru*) para a produção de Biodiesel**, 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Univeridade Federal do Pará, Bélem, 2007.

LOURENÇO, A. C. S.; MIGUEL, L. K.; GUARIDO, K. L.; SENSIATE, L. A.; SALLES, M. J. S. Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos e no desenvolvimento embriofetal. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.11, n.4, p.407-413, 2009.

LUCCA, L. G. **Avaliação da permeação cutânea de nanoemulsão contendo óleo de copaíba incorporada a hidrogéis**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

LUZ, J. M. Q. Produção de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. em diferentes épocas, sistemas de cultivo e adubações. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 3, p. 552-560, 2014.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; CARVALHO, J. C. T.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; FARIAS, R. A. F.; LUNA COSTA, A. M.; Rao, V. S. N.; XV **Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, Águas de Lindóia, Brasil, 1998.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; CÓLUS, I. M. S.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; FARIAS, R. A. F.; LUNA COSTA, A. M.; RAO, V. S. N.; Mutagenicity and antimutagenicity of Croton cajucara. **J. Ethnopharmacol.** 2000.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, Vol. 25, No. 3, 429-438, 2002.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, p. 316-320, 2005.

MIGOWSKA, N.; STEPNOWSKI, P.; PASZKIEWICZ, M.; GOŁĘBIOWSKI, M. Trimethylsilyldiazomethane (TMSD) as a new derivatization reagent for trace analysis of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by gas chromatography methods. **Anal Bioanal Chem** (2010) 397:3029–3034 DOI 10.1007/s00216-010-3853-y

MORAES, B. C. Variação espacial e temporal da precipitação no Estado do Pará. **Acta Amaz.**, 35 (2): 207-214, 2005.

MUNIZ, J. W. C.; BOZZA, P. T.; NASCIMENTO J. L.; REIS, P. A. Atividade anti-inflamatória do óleo-resina da copaífera reticulata em modelo inflamatório de edema de pata. **Rev Para Med**, 2009.

NASCIMENTO, I. B.; INNECO, R.; MATOS, S. H. BORGES, N. S. S.; MARCO, C. A.; **Rev. Caatinga.**, 19, 123, 2006.

NASCIMENTO, A. M. A.; BRANDÃO, M. G. L.; OLIVEIRA, G. B.; FORTES, I. C. P.; CHARTONE-SOUZA, E. Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or b-bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. **Antonie van Leeuwenhoek** 92(1):95-100. 2007.

NASCIMENTO, J. F.; FERREIRA, E. J. L.; CARVALHO, A. L.; REGIANE, A. M. Potencial da palmeira de murumuru nativa do Acre. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 90-92, jul. 2007.

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

NGWOKE, K. G.; ODIMEGWU, D. C.; CHARLES, O.; ESIMONE, C. C. Antimicrobial natural products. In: Science against microbial pathogens: communicating current research

and technological advances. A. Méndez-Vilas (Ed.). **FORMATEX. Microbiology Series** N° 3. v. 2, n. 3, p.1011-1026, 2011.

OECD A Framework for Biotechnology Statistics. Paris: OCDE, 2005.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; POLTRONIERI, L. S. Avaliação do óleo de copaíba (*Copaifera* spp) na inibição do crescimento micelial in vitro de fitopatógenos. **Revista Ciências Agrárias**, n.45, jan/jun., 2006.

PACHECO, T. A. R. C. Antimicrobial activity of copaíba (*Copaifera* spp) balsams. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.123-4, 2006.

PAGE, J. E.; BALZA, F.; NISHIDA, T.; TOWERS, G. H. N.; **Phytochemistry**,31, 3437-124. 1992.

PHELPS, J.; BENTLEY, M. V. L.; LOPES, L. B. In situ gelling hexagonal phases for sustained release of an anti-addiction drug. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 391-398, 2011. ISSN 0927-7765.

PICHETTE, A.; LAROUCHE, P. L.; LEBRUN, M.; LEGAULT, J. Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. **Phytother. Res.** 20:371-373. 2006.

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

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

PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Cultivo e processamento de plantas medicianis. Lavras: UFLA, 2002. p.47.

PIRIZ, M. A.; LIMA, C. A. B.; JARDIM, V. M. R.; MESQUITA, M. K.; SOUZA, A. D. Z.; HECK, R. M. Medicinal plants in the wound healing process: a literature review. **Rev. Bras. Plantas**, ed. vol.16 no. 3 Botucatu, jul./set. 2014.

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

RAHMAN, A.; KANG, S. Inhibition of foodborne pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (walt.) b.s.p. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 29, n. 2, p. 176-189, May 2009.

RAMOS, M. F. S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

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.

RIBEIRO, A. Q.; MOURA, C. S. Informações sobre plantas medicinais e fitoterápicos no contexto da farmacoterapia. In: **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**, 328 p. 2009.

RIGAMONTE AZEVEDO, O. C. Potencial de produção de oleoresina de copaíba (*Copaifera sp.*) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. **Revista Árvore**, v.30, n.4, p.583-91, 2006.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C. **Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina**. Rio Branco: EMBRAPA, MAPA, 2004. 28p.

RISSI, N. C. **Correlação entre estrutura e propriedades de sistemas líquidos cristalinos para a liberação prolongada de fármacos**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) 125 f – Faculdade de Ciências Farmacêuticas “Júlio de Mesquita Filho”. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013. Orientação de Leila Aparecida Chivacci.

ROCHA, C. B. R. Morfometria das fibras das folhas de *Astrocaryum murumuru* var. *murumuru* Mart. (Arecaceae). **Acta Amazonica**, 37 (4): 511–516, Potiguara. 2007.

ROSEVEAR, F. B. The microscopy of the liquid crystalline neat and middle phases of soaps and synthetic detergents. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 31, n. 12, p. 628-739, 1954.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. **Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma**. Ed. Atheneu. São Paulo, 2005.

SALGUEIRO, M. B. S.; TYIO, R. Óleo de copaíba: aspectos gerais e suas aplicações. **Revista uningá review**. Maringá-Paraná. V.27,n.2,p .42-47 jul/set. 2016

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

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008.

SILVA, E. S. **Análise dos aspectos socioeconômicos, fito-demográficos, genéticos e físico-químicos da extração do óleo-resina de *Copaifera reticulata* em duas comunidades da FLONA do Tapajós, Pará** (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2011.

SILVA, C. K. **Potencial produtivo e de manejo de dois produtos florestais não madeireiros no contexto Amazônico – o cipó titica (*Heteropsis spp.*) e o óleo de Copaíba (*Copaifera spp.*)**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz

de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014. Orientação de Edson José Vidal da Silva.

SILVA, M. T. da. **Caracterização Físico-química dos Óleos-resinas de *Copaifera multijuga* Hayne e Avaliação da Variabilidade Química de sua Fração Volátil.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade De Farmácia, Universidade Federal De Goiás, 2016. Orientação de José Realino de Paula.

SILVA, P. S. G. da; LOPES, R. F.; SILVA, J.C. da; SANTOS, W. B.dos; VERÍSSIMO, R. C. S. S.; BASTOS, M. L. de A. Atividade citotóxica, antimicrobiana e cicatrizante do extrato da *Jatropha Gossypifolia* l. **Rev enferm UFPE online.**, Recife, 12(2):465-74, fev., 2018. ISSN: 1981-8963 <https://doi.org/10.5205/1981-8963-v12i2a234689p465-474-2018>.

SILVEIRA, E. Evolução recente da biotecnologia no Brasil. Texto para discussão n. 114. Fev. 2004, Campinas: IE/UNICAMP n.114, fevereiro de 2004.

SLIMESTAD, R.; MARSTON, A.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K.; **Planta Med.**, 61, 562. 1995.

SOUZA, C. Mucoadhesive System Formed by Liquid Crystals for Buccal Administration of Poly(Hexamethylene Biguanide) Hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 12, p. 3914-3923, 2014.

STRATTON, C. W. Nuances in antimicrobial susceptibility testing for resistant gram-positive organisms. **Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter**, v. 18, p. 57-64, 2000.

TACCONELLI, E.; DE ANGELIS, G.; CATALDO, M. A.; MANTENGOLI, E.; SPANU, T.; PAN, A.; CORTI, G.; RADICE, A.; STOLZUOLI, L.; ANTINORI, S.; PARADISI, F.; CAROSI, G.; BERNABEI, R.; ANTONELLI, M.; FADDA, G.; ROSSOLINI, G.M.; CAUDA, R. Antibiotic Usage and Risk of Colonization and Infection with Antibiotic-Resistant Bacteria: a Hospital Population-Based Study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4264 – 4265, 2009.

TADEG, H.; MOHAMMED, E. A.; GEBRE-MARIAN, T. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in treatment of skin disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 168-175, 2005.

TINCUSI, B. M.; BAZZOCCHI, I. L.; MOUJIR, L. M.; MAMANI, Z. A.; BARROSO, J. P.; RAVELO, A. G.; HERNÁNDEZ, B. V. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. **Planta Med.**, 68: 808-812, 2002.

TOVAR, R. T.; PETZEL, R. M. Herbal toxicity. **Disease-a-month**, v.55, n.10, p.592–641, 2009.

TROMBETTA, D. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova** 25 (2): 273_286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: cura segura?. **Química nova**, 28 (3): 519-528, 2005.

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

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa. **Rev Bras Farmacogn**, Porto Alegre, n. 15, p. 361-372, 2005.

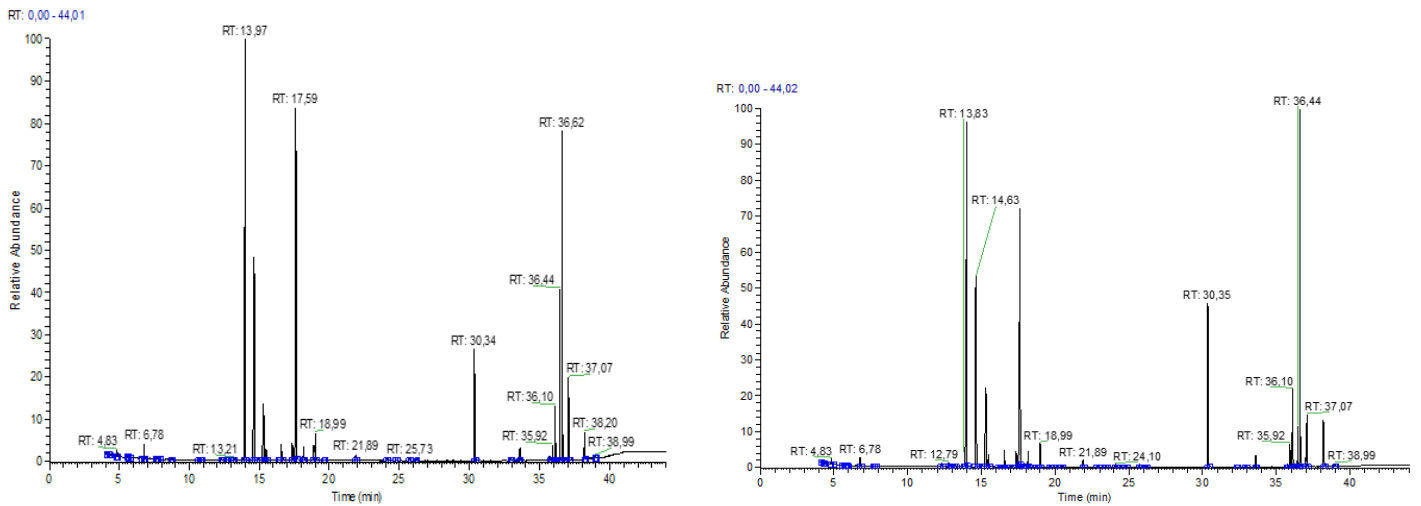
ZIECH, R. E. Atividade antimicrobiana do oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata*) frente a *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de casos de otite em cães. **Pesq. Vet. Bras.**, 33 (7): 909-913, 2013.

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

ANEXOS

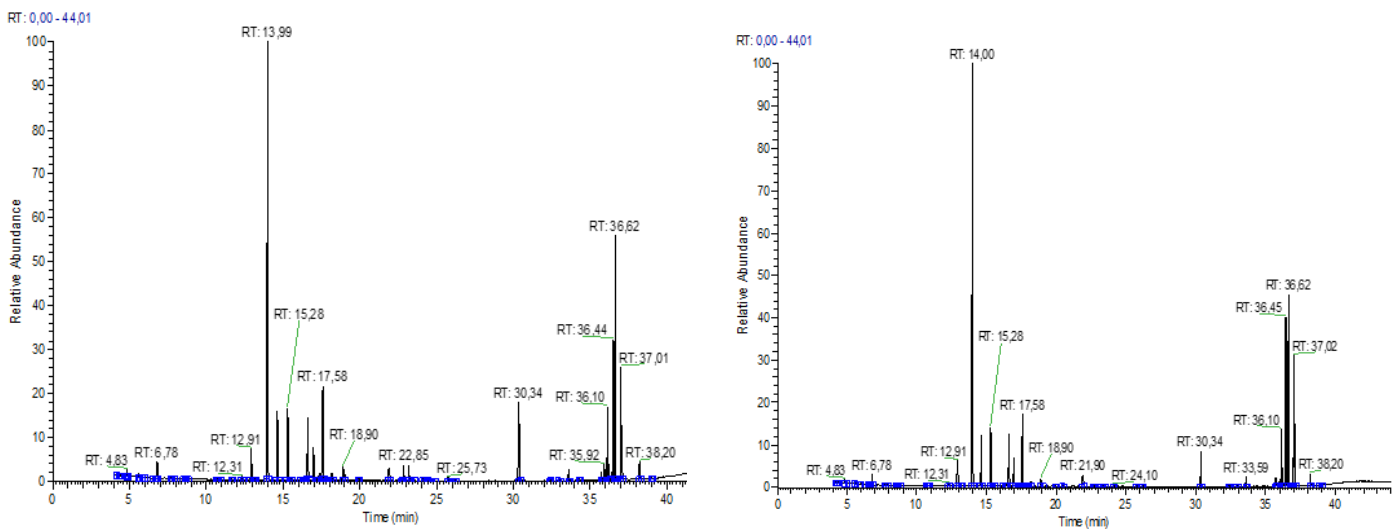
4.5 CROMATOGRÁMA DA ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Figura 12: Cromatograma da análise química da amostra 1 S (seco) e 1 C (chuvoso), respectivamente.



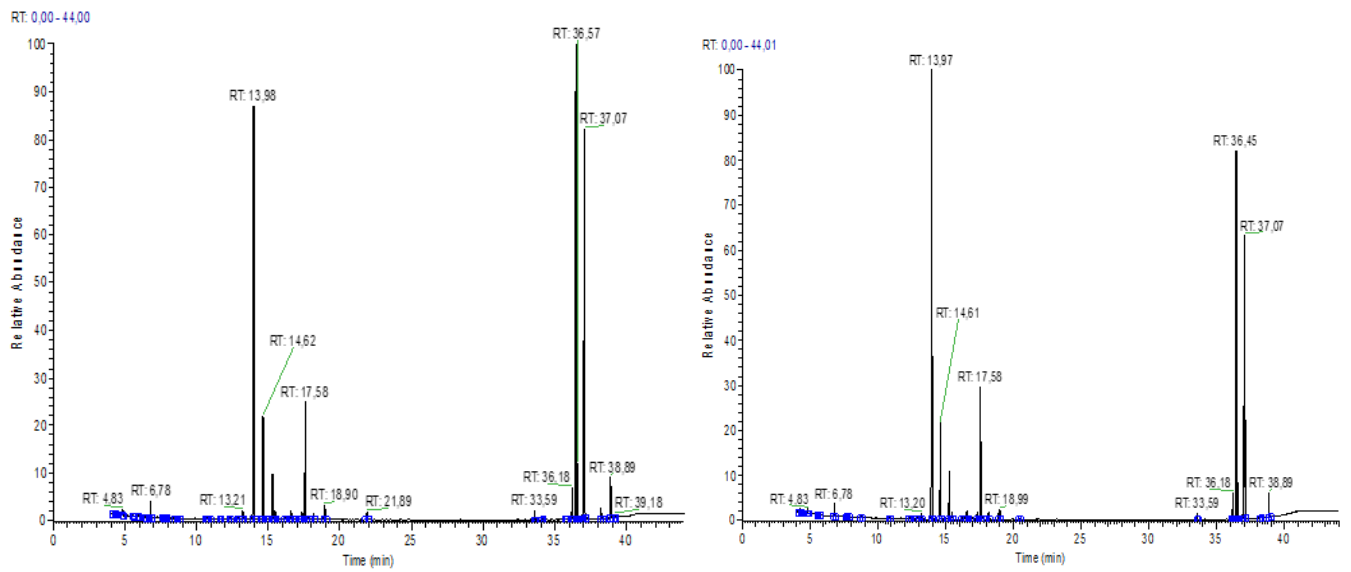
Fonte: Autora

Figura 13: Cromatograma da análise química da amostra 2 S (seco) e 2 C (chuvoso), respectivamente.



Fonte: Autora

Figura 14: Cromatograma da análise química da amostra 3 S (seco) e 3 C (chuvoso), respectivamente.



Fonte: Autora