Brazilian Journal of Development

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

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

DOI:10.34117/bjdv6n1-043

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

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

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

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

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

Brazilian Journal of Development

RESUMO

Os óleos de copaíba (*Copaifera* sp.) são amplamente utilizados na medicina popular e pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. A ampla comercialização destas oleoresinas, e suas semelhanças físico-químicas, como a cor, densidade e viscosidade, resultam na mistura de óleos de copaíba de diferentes espécies, assim como adulterações com óleos de outras procedências. Para o controle de qualidade desses óleos, é necessário a padronização da composição química para as espécies, avaliando a variação na concentração dos constituintes mais relevantes e seus limites mínimos de detecção. Nesse artigo foi realizado a quantificação do β-cariofileno e óxido de cariofileno em 10 óleos autênticos de *C. multijuga* por cromatografia em fase gasosa (CG-EM) e a avaliação das principais características de desempenho do método desenvolvido. Foram identificados 44 constituintes, dos quais o β-cariofileno foi o principal deles, detectados em todos os óleos e em maior concentração. A linearidade dos padrões foi obtida a partir das curvas analíticas para o β-cariofileno e óxido de cariofileno, com coeficiente de correlação (R^2) de 0,9917 $mg.mL^{-1}$ para o β-cariofileno e 0,9913 $mg.mL^{-1}$ para o óxido de cariofileno. O LD e LQ para o β-cariofileno foram 0,0089 $mg.mL^{-1}$ e 0,0165 $mg.mL^{-1}$ e para o óxido de cariofileno 0,0137 $mg.mL^{-1}$ e 0,0280 $mg.mL^{-1}$ respectivamente. A concentração do β-cariofileno nos óleos analisados variou de 0,317 $mg.mL^{-1}$ a 0,886 $mg.mL^{-1}$ e para o óxido de cariofileno a variação foi de 0,004 $mg.mL^{-1}$ a 0,272 $mg.mL^{-1}$.

Palavras-chave: oleoresina; quantificação; β-cariofileno.

ABSTRACT

Copaiba oils (*Copaifera* sp.) are widely used in folk medicine and the pharmaceutical and cosmetic industries. The widespread commercialization of these oleoresins, and their physicochemical similarities, such as color, density and viscosity, result in the mixing of copaiba oils from different species, as well as adulteration with oils from other sources. For the quality control of these oils, it is necessary to standardize the chemical composition for the species, evaluating the variation in the concentration of the most relevant constituents and their minimum detection limits. In this paper we quantified β-caryophyllene and caryophyllene oxide in 10 authentic C. multijuga oils by gas chromatography (GC-MS) and evaluated the main performance characteristics of the developed method. Forty-four constituents were identified, of which β-caryophyllene was the main one, detected in all oils and in higher concentration. The linearity of the standard obtained from the analytical curves for β-caryophyllene and caryophyllene oxide, with correlation coefficient (R2) of 0.9917 $mg.mL^{-1}$ for β-caryophyllene and 0.9913 $mg.mL^{-1}$ for caryophyllene oxide. The LD and LQ for β-caryophyllene were 0.0089 $mg.mL^{-1}$ and 0.0165 $mg.mL^{-1}$ and for caryophyllene oxide 0.0137 $mg.mL^{-1}$ and 0.0280 $mg.mL^{-1}$ respectively. The concentration of β-caryophyllene in the analyzed oils ranged from 0.317 $mg.mL^{-1}$ to 0.886 $mg.mL^{-1}$ and for caryophyllene oxide the range was from 0.004 $mg.mL^{-1}$ to 0.272 $mg.mL^{-1}$.

Keywords: oleoresin; Quantification; β-caryophyllene.

Brazilian Journal of Development

1 INTRODUÇÃO

Os óleos de copaíba (*Copaifera* sp.) são amplamente conhecidos por suas propriedades medicinais. São obtidos naturalmente, por extração direta dos troncos das árvores do gênero *Copaifera* e encontram-se distribuídos no território brasileiro, com predominância nas regiões Amazônica e Centro-Oeste do Brasil. A principal utilização desses óleos está relacionada a suas propriedades anti-inflamatórias. São usados para tratar uma série de inflamações que variam desde o trato urinário ao respiratório (Veiga Junior e Pinto, 2002; Fernandes et al., 2007; Gomes et al., 2010). Estudos indicam que as propriedades anti-inflamatórias dos óleos de copaíba estão associadas a presença do β-cariofileno. Além de apresentar excelentes propriedades biológicas, o β-cariofileno é o marcador químico do gênero *Copaifera*, por fazer parte da composição de todos os óleos deste gênero, mesmo em concentrações variáveis (Veiga Junior et al., 2007; Leandro et al., 2012).

As oleoresinas de *C. multijuga* apresentam uma característica diferente das demais espécies do gênero *Copaifera*. Cerca de 90% da sua composição química é constituída por sesquiterpenos, sendo o β-cariofileno o principal deles, representando 60% da composição total do óleo (Cascon e Gilbert, 2000; Sant'Anna et al., 2007; Veiga Junior et al., 2007; Barbosa et al., 2012; Barbosa et al., 2013; Trindade et al., 2018). Devido à alta concentração deste sesquiterpeno e suas propriedades medicinais, diversos estudos foram realizados com esta oleoresina, visando a obtenção de formulações com microemulsões (Neves et al., 2018) e nanoemulsões (Dias et al., 2012; Lucca et al., 2015), assim como a complexação desses óleos com ciclodextrinas para potencializar ainda mais suas propriedades terapêuticas (Pinheiro et al., 2017).

A mais antiga e atual problemática dos óleos de copaíba, consiste na diferenciação entre as espécies deste gênero e na padronização da sua composição química. Apesar de algumas características serem comuns a estes óleos, cada oleoresina apresenta características específicas, como cor, densidade, viscosidade e composição química. O grande número de espécies do gênero Copaifera, associado a demanda dos óleos e suas similaridades (botânicas e físico-químicas) têm contribuído para a mistura de óleos de copaíba de espécies diferentes e adulterações com óleos de outras procedências, dificultando a identificação correta da espécie, assim como a aplicação apropriada da oleoresina (Veiga Junior e Pinto, 2002; Tappin et al., 2004).

A utilização das oleoresinas de *C. multijuga* para fins terapêuticos ou industriais exige meios que possam contribuir para padronização da composição química e possam auxiliar no

controle de qualidade dessas oleoresinas. Relatos recentes têm mostrado o desenvolvimento e validação de métodos analíticos que promovam a quantificação de marcadores químicos em óleos de copaíba, porém, nenhum deles refere-se a quantificação do β-cariofileno e seu óxido em óleos de *C. multijuga* (Sousa et al., 2011; Souza et al., 2012; Borges et al., 2013; Da Silva et al., 2017; Xavier-Junior et al., 2017; Carneiro et al., 2018). Apenas relatos de análises qualitativas e semiquantitativas foram descritas para esta espécie por cromatografia em fase gasosa (Veiga Junior et al., 1997; Barbosa et al., 2012; Barbosa et al., 2013).

A cromatografia em fase gasosa é a técnica clássica utilizada para separação, quantificação, desenvolvimento e validação de métodos em óleos de copaíba. Por apresentar rápida separação, alta sensibilidade e confiabilidade tem sido frequentemente usada na padronização da composição química desses óleos (Veiga Junior et al., 1997; Cascon e Gilbert, 2000; Tappin et al., 2004; Veiga Junior e Pinto, 2005; Veiga Junior et al., 2007; Sousa et al., 2011; Barbosa et al., 2012). Nesse viés, este artigo descreve um método para a padronização química dos óleos de óleos de copaíba por cromatografia em fase gasosa com detector de massas (CG-EM), para a quantificação do β - cariofileno e do óxido de cariofileno em óleos autênticos de *C. multijuga.*

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. COLETA DAS OLEORESINAS

As oleoresinas de *C. multijuga* foram coletadas nos meses de junho, julho e agosto, do ano de 2012, na Reserva Florestal Adolpho Ducke, no município de Manaus, estado do Amazonas, Brasil (28º 57’ 43’’ S, 59º 55’ 38’’ W). Os óleos foram coletados adequadamente pela Dra. Raquel Medeiros, por extração direta das árvores, através de incisões no tronco com broca manual de metal. Após a coleta, as oleoresinas foram devidamente armazenadas em frascos de vidro âmbar, protegidos da luz e do calor. O estudo foi realizado com oleoresinas de 10 (dez) espécimes de *C. multijuga* com o objetivo de avaliar o perfil químico e a variação na composição química dos constituintes numa mesma espécie.

2.2. DERIVATIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os oleoresinas de *C. multijuga* foram derivatizadas por uma reação *in situ*, usando o reagente de esterificação trimetilsilildiazometano (TMSD), convertendo os ácidos diterpênicos em ésteres de ácidos graxos. Os óleos de copaíba foram esterificados de acordo a metodologia descrita por Migowska e colaboradores (2010) com pequenas modificações.

Adicionou-se 220 µL de uma solução de metanol a 10% em acetona, em 1 mg da oleoresina de *C. multijuga*. Agitou-se por 30 segundos em vórtex (Prolab) para solubilização das amostras, e em seguida, adicionou-se 30 µL do reagente de esterificação trimetilsilildiazometano (TMSD). As soluções ficaram em repouso por 20 minutos, em seguida as amostras foram avolumadas para 1 mL e injetadas no Cromatógrafo em fase gasosa.

2.3.ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A análise dos óleos de copaíba foi realizada em Cromatógrafo da Thermo Scientific, acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM), equipado com auto-amostrador TriPlus RSH, equipado com coluna capilar (Tr-5; 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm). As amostras foram inseridas no sistema cromatográfico (1 µL) por meio de injetor a 250 ºC, com taxa de divisão 1:50 e vazão de 1 mL/min, utilizando hélio ultrapuro como gás de arraste e detector a 250 ºC. As condições de temperatura do forno foram baseadas numa rampa que inicia em 90 ºC até 160 ºC (2,5 ºC/min.) e de 160 ºC à 290 ºC (10,0 ºC/min.) com uma isoterma final de 3 minutos. As amostras foram ionizadas por impacto de elétrons com energia de 70 eV, sendo em seguida fragmentada e separada em sistema quadrupolo com varredura de 40 a 600 uma.

2.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS OLEORESINAS DE *C. MULTIJUGA*

Os constituintes químicos das oleoresinas foram identificados baseado em seus índices de retenção (IR), por comparação com padrões autênticos, com a literatura (ADAMS, 2007) e com o banco de dados disponível na espectroteca.

2.5 LINEARIDADE

A linearidade do método desenvolvido para a quantificação dos 2 sesquiterpenos nas 10 oleoresinas de *C. multijuga* foi avaliada pelo desenvolvimento das curvas analíticas para cada padrão, em diferentes concentrações. As concentrações foram selecionadas conforme a sensibilidade de cada padrão às condições cromatográficas e as relações lineares foram baseadas na resposta analítica em função da concentração de cada analito. As curvas analíticas para o β-cariofileno e óxido de cariofileno foram preparadas a partir da diluição dos padrões de 1 mg/mL em diclorometano. Foram preparadas cinco soluções de cada padrão, variando a concentração entre 0,130 mg/mL e 0,619 mg/mL para o β-cariofileno e 0,031 mg/mL e 0,216

mg/mL para o óxido de cariofileno. Para obtenção da curva analítica, cada solução padrão foi analisada em duplicata nas condições experimentais estabelecidas.

2.6 REPETIBILIDADE

As análises foram realizadas em duplicata com intervalo de 24 horas dos 5 pontos da curva analítica sendo o procedimento realizado pelo mesmo equipamento alternando apenas o dia. Os resultados foram expressos pelo coeficiente de variância e exatidão para determinar a precisão da análise e avaliar o nível de confiabilidade do método. A equação utilizada para o cálculo deste parâmetro encontra-se na equação 1.

$$\text{Exatidão} = \frac{Média\ da\ concentração\ experimental}{concentração\ teórica}\ x\ 100 \qquad (1)$$

2.7 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram determinados após a obtenção da curva analítica para cada padrão para avaliar a linearidade. Esses parâmetros foram calculados a partir das equações sugeridas pelo DOQ-CGCRE-008 e encontram-se nas equações 2 e 3.

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

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

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

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

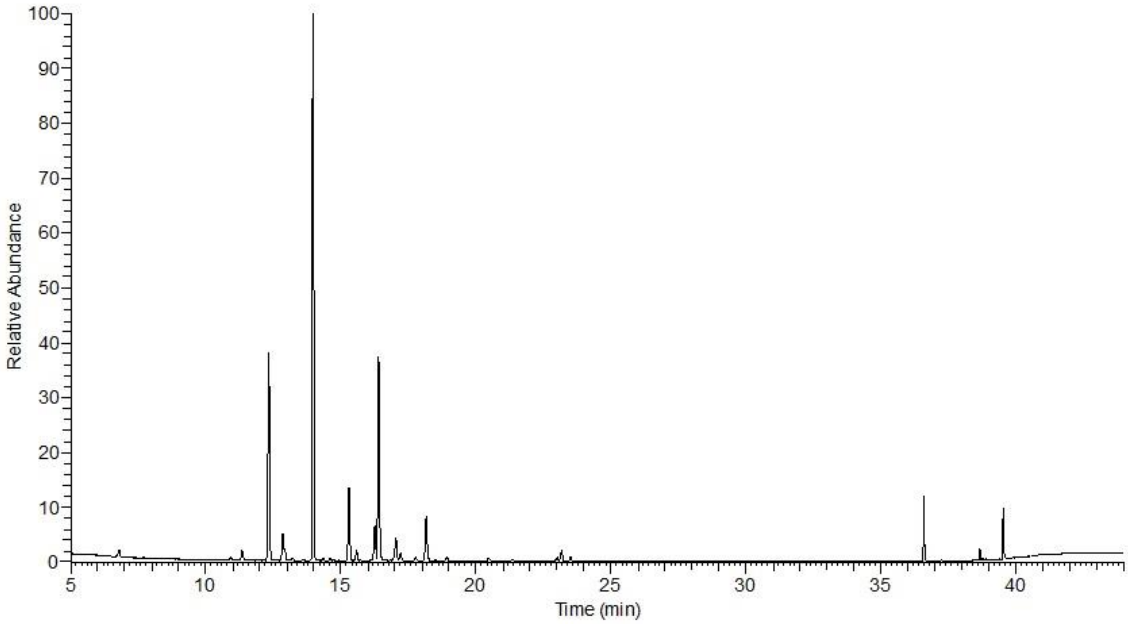
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS DE *COPAIFERA MULTIJUGA*

Os perfis cromatográficos obtidos para os óleos de *C. multijuga* apresentam características de oleoresinas autênticas. A maior parte da composição química dos óleos desta espécie é constituída pelos sesquiterpenos, com predominância do β - cariofileno, e em menor proporção pelos ácidos diterpênicos (Fig. 1A). Diferenças qualitativas e quantitativas são observadas entre as oleoresinas analisadas. Apesar das variações observadas, é possível definir um padrão para a composição química dos óleos de *C. multijuga*. O número de constituintes

detectados nas regiões sesquiterpênica e diterpênica é uma das principais características desta espécie, além da especificidade da composição dos ácidos diterpênicos. A obtenção do perfil químico desta espécie permite a detecção de possíveis adulterações pela simples obtenção do perfil cromatográfico destas oleoresinas por CG. As variações qualitativas e quantitativas são mais pronunciadas entre os sesquiterpenos, influenciando diretamente na qualidade do aroma da fração volátil da oleoresina (Fig. 1B).

Foram identificados um total de 44 constituintes distintos em diferentes concentrações nas 10 oleoresinas analisadas (Tabela 1). Dentre as substâncias detectadas**,** o α-copaeno (1), o β-cariofileno (2), α-humuleno (3), amorfa - 4,7(11) - dieno (4), óxido de cariofileno (5), os ácidos copálico e 11-acetóxi-copálico foram observados em todos os óleos, sendo o β-cariofileno, o constituinte majoritário em 9 das 10 amostras analisadas. O β-cariofileno é um dos principais constituintes detectados nos óleos de *C. multijuga* por suas inúmeras propriedades biológicas, por suas diversas aplicações nas indústrias de perfumes e cosméticos e por sua elevada concentração nos óleos desta espécies (24,87 a 70,67%). Além do β-cariofileno contribuir de forma singular para as propriedades biológicas dos óleos de copaíba ele também contribui acentuadamente para o aroma amadeirado desta oleoresina, influenciando no aroma da fração volátil.



Brazilian Journal of Development

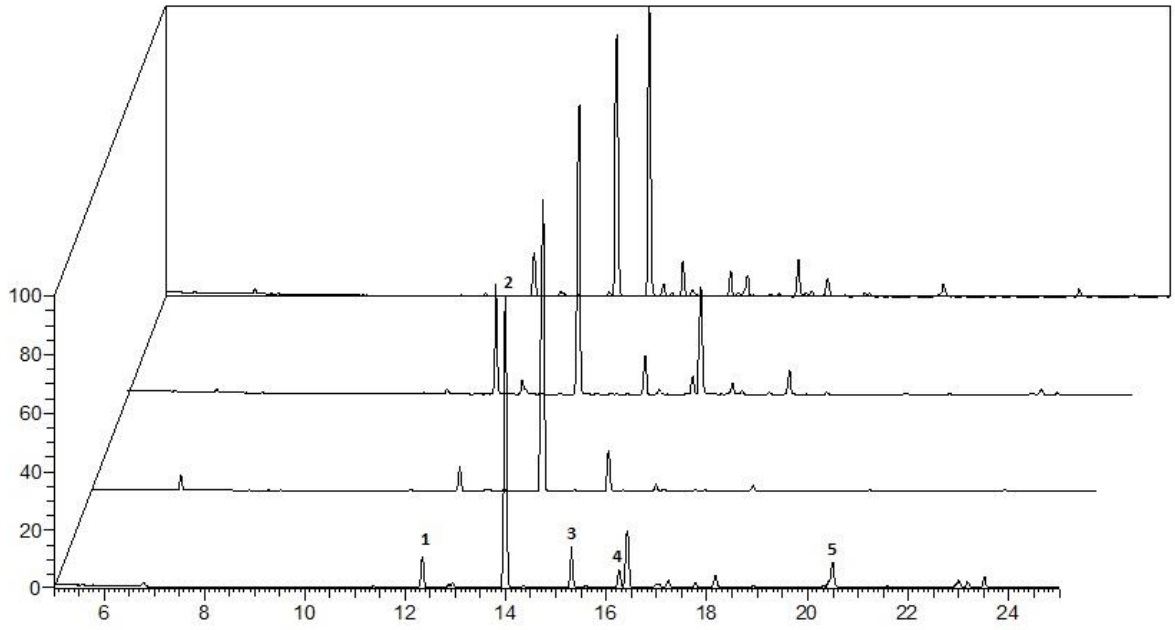


Figura 1. Perfil cromatográfico dos óleos de *C. multijuga* por cromatografia em fase gasosa (A). Cromatograma ampliado da região de eluição dos sesquiterpenos (B). Principais sesquiterpenos: α-copaeno (1); β-cariofileno (2); α-humuleno (3); amorfa-4,7(11)-dieno (4); Óxido de cariofileno (5).

O teor de sesquiterpenos detectados nessas oleoresinas variou entre 86,21% e 96,26% e entre 0,34% a 6,27% para os ácidos diterpênicos, corroborando os dados disponíveis na literatura (Veiga Junior e Pinto, 1997; Veiga Junior et al., 2007; Barbosa et al., 2012; Barbosa et al., 2013). O total de constituintes identificados para cada óleo foi dado como satisfatório, uma vez que o teor das substâncias identificadas variou de 88,85% a 98,55% entre as amostras.

Tabela 1. Composição química das 10 oleoresinas de *Copaifera multijuga* analisadas.

Constituintes	**IR**	**Teor** (%)									
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
α-cubebeno	1348	0,68	0,57	0,38	0,24	1,01	0,42	0,41	0,22	0,55	0,42
α-ylangeno	1373	-	-	0,26	-	-	-	-	-	-	-
α-copaeno	1374	15,59	10,39	9,81	0,24	21,47	7,74	5,13	5,22	12,89	9,6
β-cubebeno	1387	1,27	0,39	-	0,18		0,59	-	0,39	-	0,12
β-elemeno	1389	0,16	0,25	5,12	0,45	2,99	0,35	-	0,05	2,84	1,21
Cipereno	1398	0,1	0,18	0,29	-	-	-	-	-	-	0,4

Brazilian Journal of Development

β-cariofileno	**1417**	**44,14**	**32,73**	**33,32**	**55,73**	**27,45**	**46,41**	**70,67**	**32,41**	**34,83**	**24,87**
β-copaeno	1430	-	0,31	-	0,41	-	-	-	-	-	-
α-trans-bergamoteno	1432	-	2,52	-	-	-	0,38	-	37,64	11,98	-
γ-elemeno	1434	-	-	8,26	-	5,43	-	-	-	1,41	0,75
β-humuleno	1436	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	0,28
(Z)-β-farneseno	1440	-	-	-	-	-	-	-	1,33	-	-
α-humuleno	1452	5,81	4,43	4,47	7,14	3,62	6,67	9,68	4,49	4,83	3,67
(E)-β-farneseno	1454	-	-		-	-	-	-	0,45	-	-
Allo-aromadendreno	1458	0,69	0,55	0,34	-	0,95	0,36	-	-	-	0,44
Amorpha-4,7(11)-dieno	1479	2,49	3,66	1,63	3,07	1,54	2,23	1,64	3,02	2,15	0,89
Germacreno D	1480	16,33	14,38	12,55	10,54	11,76	18,38	0,44	-	4,52	3,7
δ-Selineno	1492	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,26
γ-Amorpheno	1495	-	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-
Biciclogermacreno	1500	1,39	0,18	-	-	-	2,62	0,35	-	-	-
α-muuroleno	1500	0,47	1,21	0,66	1,11	0,71	0,71	0,26	-	0,95	0,32
β-bisaboleno	1505	-	-	-	-	-	-	-	4,49	1,37	-
γ-cadineno	1513	0,31	1,07	0,62	0,76	0,72	0,59	-	-	1,01	0,32
(Z)-γ-bisaboleno	1514	-	-	-	-	-	-	-	0,38	-	-
δ-cadineno	1522	-	6,74	3,48	2,83	7,01	3,33	1,43	2,47	3,83	2,66
Zonareno	1528	-	-	0,37	-	0,64	-	-	-	-	-
α-cadineno	1537	-	0,19	-	0,1	-	-	-	-	-	-
Germacreno B	1559	-	-	10,04	-	6,69	-	-	-	3,82	0,9
Álcool cariofilenil	1570	-	0,65	-	-	-	-	-	-	-	0,58
Espatulenol	1577	-	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-
Óxido de cariofileno	**1582**	**0,16**	**0,13**	**1,06**	**5,21**	**0,08**	**1,11**	**0,25**	**1,93**	**4,66**	**0,2**
Ledol	1596	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rosifoliol	1600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Junenol	1618	-	10,96	-	-	-	-	-	-	-	23,55

Brazilian Journal of Development

1-epi-cubenol	1627	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
epi-α-muurolol	1640	0,32	2,11	0,89	1,6	1,08	0,78	-	-	1,12	0,63
(Torreyol) α-muurolol	1644	0,82	1,11	0,53	1,15	0,43	0,99	0,47	1,01	0,55	-
α-cadinol	1652	0,22	1,04	1	1,86	-	0,78	-	-	1,3	-
Selin-11-en-4-α-ol	1658	-	-	-	-	0,95	-	-	-	-	1,43
Eudesm-7(11)-en-4-ol	1700	-	-	-	-	0,33	-	-	-	-	9,01
ácido copálico		2,05	0,85	0,35	0,19	1,67	1,7	4,13	0,6	1,53	0,96
ácido 11-hidróxi-copálico		-	0,09	-	-	-	-	-	-	-	0,32
ácido agático		0,37	0,17	0,04	0,11	0,07	0,33	0,7	0,23	-	0,37
ácido 11-acetóxi-copálico		1,72	0,2	0,74	0,04	1,21	1,91	1,44	0,4	0,92	0,99
TOTAL		**95,26**	**97,57**	**96,21**	**92,96**	**97,81**	**98,55**	**97**	**96,73**	**97,06**	**88,85**

3.2 LINEARIDADE

As concentrações dos padrões para o desenvolvimento das curvas analíticas foram determinadas a partir de análises prévias da variação do β-cariofileno e óxido de cariofileno nos óleos de *C. multijuga*. As curvas do β-cariofileno e óxido de cariofileno demonstraram um comportamento linear com coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9917 e 0,9913 respectivamente (Fig.2). A faixa linear para o β-cariofileno foi de 0,13 mg.mL^{-1} a 0,62 mg.mL^{-1}, enquanto para o óxido de cariofileno a faixa linear variou de 0,03 mg.mL^{-1} a 0,22 mg.mL^{-1}.

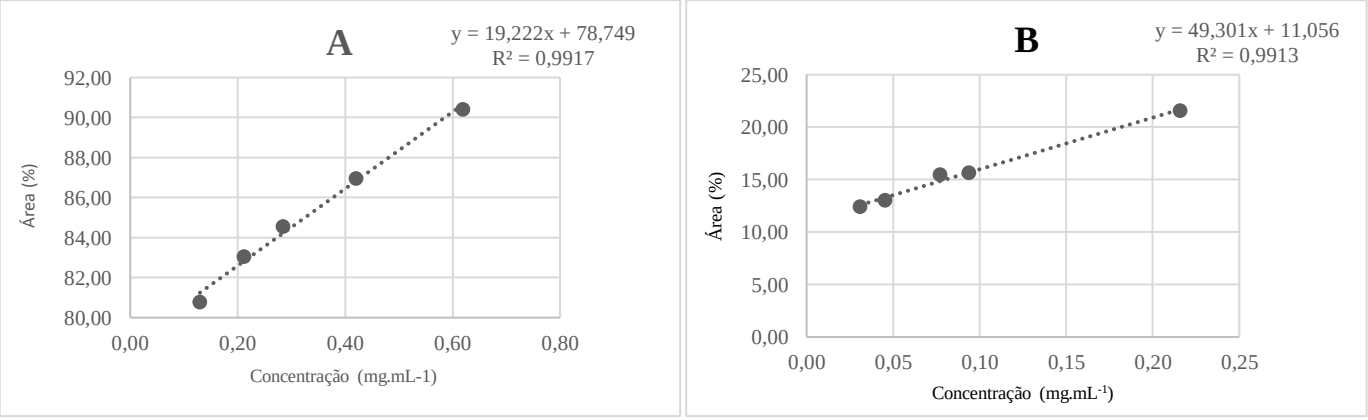


Figura 2. Curva analítica para o b-cariofileno (A) e curva analítica para o óxido de cariofileno (B).

3.3 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com base na curva analítica, para avaliar a linearidade a partir das equações estabelecidas pela ANVISA. O LD e LQ obtidos foram de 0,0089 mg.mL^{-1} e 0,0165 mg.mL^{-1}, para o β-cariofileno e de 0,0137 mg.mL^{-1} e 0,0280 mg.mL^{-1} para o óxido de cariofileno, respectivamente. Os valores de LD e LQ obtidos para ambos os padrões sesquiterpênicos foram excelentes, enaltecendo o mérito do método, corroborando com os dados disponíveis na literatura, para a quantificação desses sesquiterpenos. Xavier-Junior e colaboradores (2017) propuseram a quantificação desses dois marcadores químicos em 01 oleoresina de *C. langsdorffii*, também por CG-EM, e obtiveram valores de LD de 0,01195 mg.mL^{-1} e LQ 0,03985 mg.mL^{-1} para o β-cariofileno e de 0,00822 mg.mL^{-1} e LQ com e 0,02740 mg.mL^{-1} para o óxido de cariofileno, respectivamente.

3.4 REPETIBILIDADE

A repetibilidade foi obtida baseada nos coeficientes de variação (CV) do β-cariofileno para três concentrações diferentes (baixa, média e alta), realizados em duplicata. O CV obtido está dentro dos critérios sugeridos pela ANVISA, uma vez que o mesmo está abaixo de 5% com exatidão de ± 15%, sugerindo uma boa repetibilidade para o experimento (tabela 2).

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

Conc. Teórica	Média Conc. exp.	Média área (%)	D.P	C.V	E (%)
0,13	0,10	80,77	2,45	3,03	81,06
0,28	0,30	84,55	3,88	4,58	106,08
0,62	0,61	90,41	3,81	4,22	98,07

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE B-CARIOFILENO E ÓXIDO DE CARIOFILENO NOS ÓLEOS DE *C. MULTIJUGA.*

A quantificação dos marcadores químicos foi feita em 10 amostras de óleos de *C. multijuga*. Na tabela 3 são apresentados os resultados obtidos da quantificação do β-cariofileno e do seu óxido, realizados em triplicata e calculados a partir das porcentagens da área de cada pico. As concentrações de β-cariofileno variaram entre 0,317 mg.mL^{-1} e 0,886 mg.mL^{-1},

apresentando CV abaixo de 5% para todas as amostras, mostrando pequena variação entre as réplicas sugerindo maior confiabilidade no preparo das amostras e realização das análises.

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

Amostras	Concentração média b-cariofileno (mg.mL^{-1})	Desvio padrão (%)	CV	Concentração média óxido de cariofileno (mg.mL^{-1})	Desvio padrão (%)	CV
1	0,535	0,024	4,557	0,008	0,021	12,122
2	0,401	0,017	4,294	0,007	0,015	5,238
3	0,415	0,010	2,301	0,051	0,042	3,808
4	0,674	0,024	3,616	0,272	0,040	6,889
5	0,345	0,009	2,626	0,004	0,007	8,319
6	0,584	0,013	2,224	0,057	0,018	14,314
7	0,886	0,027	3,015	0,016	0,021	19,516
8	0,403	0,010	2,370	0,124	0,010	18,051
9	0,441	0,005	1,084	0,196	0,062	14,561
10	0,317	0,001	0,448	0,009	0,010	5,000

A variação da concentração do óxido de cariofileno nos óleos de *C. multijuga* foi de 0,004 mg.mL^{-1} a 0,272 mg.mL^{-1}. Apesar de estar presente em todos os óleos analisados, apresentou uma concentração relativamente baixa, o que é comumente esperado para os óleos desta espécie. Muitos autores relacionam a concentração do óxido de cariofileno com o estado de conservação do óleo, que muitas vezes são submetidos a reações fotoquímicas e à exposição excessiva ao calor, porém trabalhos anteriores sugerem que o óxido de cariofileno seja fruto do metabolismo da própria planta, como mecanismo de defesa (Cascon e Gilbert, 2000; Barbosa et al., 2013).

Os maiores teores do óxido de cariofileno observados para as amostras 4, 8 e 9 podem estar relacionados com a diminuição da concentração e consequentemente da oxidação do β-cariofileno. A robustez da metodologia utilizada pode ser avaliada pelo fato de que os valores não foram tão distantes do sugerido pela ANVISA (Rumel, 2003), como linearidade, LD e LQ apresentando CV e exatidão com valores dentro do padrão estabelecido.

Brazilian Journal of Development

4 CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido por cromatografia em fase gasosa (CG-EM) permitiu a detecção e quantificação do β-cariofileno e do seu óxido em 10 óleos autênticos de *Copaifera multijuga*. O método desenvolvido mostrou-se adequado para a quantificação desses marcadores químicos, com limites de detecção e quantificação de 0,0089 $mg.mL^{-1}$ e 0,0165 $mg.mL^{-1}$para o cariofileno e 0,0137 $mg.mL^{-1}$ e 0,0280 $mg.mL^{-1}$ para o óxido de cariofileno, respectivamente. A concentração do β-cariofileno nos óleos analisados variou de 0,317 $mg.mL^{-1}$ a 0,886 $mg.mL^{-1}$ e a do óxido de cariofileno de 0,004 $mg.mL^{-1}$ a 0,272 $mg.mL^{-1}$. O método proposto pode ser considerado uma ferramenta eficaz para o controle de qualidade das oleorresinas de *Copaifera multijuga*, uma vez que este é o primeiro relato da quantificação desses marcadores químicos nos óleos desta espécie. Além disso, possibilitou a padronização da composição química desses óleos através da variação da concentração desses marcadores químicos.

Trabalho realizado no Programa de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

REFERÊNCIAS

Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. **Allured publishing**, ed. 4.1. 2007.

Barbosa, P., Medeiros, R. S., Sampaio, P. T., Vieira, G., Wiedemann, L. S., & Veiga-Junior, V. F. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): soil composition, seasonality and diameter at breast height. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1823-1833, 2012.

Barbosa, P.C.S., Wiedemann, L.S.M., da Silva Medeiros, R., de Tarso Barbosa Sampaio, P., Vieira, G., & Florêncio da Veiga-Junior, V. Phytochemical fingerprints of copaiba oils (Copaifera multijuga Hayne) determined by multivariate analysis. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 7, p. 1350-1360, 2013.

Borges, V. R. A., Ribeiro, A. F., de Souza Anselmo, C., Cabral, L. M., & de Sousa, V. P. Development of a high performance liquid chromatography method for quantification of

isomers β-caryophyllene and α-humulene in copaiba oleoresin using the Box-Behnken design. **Journal of Chromatography B**, v. 940, p. 35-41, 2013.

Carneiro, L. J., Bianchi, T. C., da Silva, J. J., Oliveira, L. C., Borges, C. H., Lemes, D. C., ... & Ambrósio, S. R. Development and Validation of a Rapid and Reliable RP-HPLC-PDA Method for the Quantification of Six Diterpenes in Copaifera duckei, Copaifera reticulata and Copaifera multijuga Oleoresins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 4, p. 729-737, 2018.

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

Da Silva, J. J. M., Crevelin, E. J., Carneiro, L. J., Rogez, H., Veneziani, R. C. S., Ambrósio, S. R., ... & Bastos, J. K. Development of a validated ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of acid diterpenes in Copaifera oleoresins. **Journal of Chromatography A**, v. 1515, p. 81-90, 2017.

De Acreditação, C. G. DOQ-CGCRE-008. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**, Revisão 07, 2018.

Dias, D. O., Colombo, M., Kelmann, R. G., Souza, T. P., Bassani, V. L., Texeira, H. F., Veiga Jr, V. F., Limberger, L. P., Koester, L. S. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β-caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (Copaifera multijuga Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 721, p. 79-84, 2012.

Fernandes, E. S., Passos, G. F., Medeiros, R., da Cunha, F. M., Ferreira, J., Campos, M. M., ... & Calixto, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (−)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of Cordia verbenacea. **European journal of pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.

Gomes, N. M, de Rezende, C. M., Fontes, S. P., Matheus, M. E., da Cunha Pinto, A., & Fernandes, P. D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from Copaifera multijuga Hayne. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 177-183, 2010.

Leandro, L. M., de Sousa Vargas, F., Barbosa, P. C. S., Neves, J. K. O., Da Silva, J. A., Veiga-Junior, D., & Florêncio, V. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (Copaifera spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3866-3889, 2012.

Lucca, L. G., de Matos, S. P., Borille, B. T., Dias, D. D. O., Teixeira, H. F., Veiga Jr, V. F., ... & Koester, L. S. Determination of β-caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (Copaifera multijuga Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 104, p. 144-148, 2015.

Migowska, N., Stepnowski, P., Paszkiewicz, M., Gołębiowski, M., & Kumirska, J. Trimethylsilyldiazomethane (TMSD) as a new derivatization reagent for trace analysis of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by gas chromatography methods. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 397, n. 7, p. 3029-3034, 2010.

Neves, J. K. O., Apolinário, A. C., Saraiva, K. L. A., da Silva, D. T. C., Reis, M. Y. D. F. A., de Lima Damasceno, B. P. G., ... & da Silva, J. A. Microemulsions containing Copaifera multijuga Hayne oil-resin: Challenges to achieve an efficient system for β-caryophyllene delivery. **Industrial crops and products**, v. 111, p. 185-192, 2018.

Pinheiro, J., Tavares, E., Silva, S., Félix Silva, J., Carvalho, Y., Ferreira, M., ... & Azevedo, E. Inclusion Complexes of Copaiba (Copaifera multijuga Hayne) Oleoresin and Cyclodextrins: Physicochemical Characterization and Anti-Inflammatory Activity. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 11, p. 2388, 2017.

Sant'Anna, B. M., Fontes, S. P., Pinto, A. C., & Rezende, C. M. Characterization of woody odorant contributors in copaiba oil (Copaifera multijuga Hayne). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n. 5, p. 984-989, 2007.

Sousa, J. P. B., Brancalion, A. P., Souza, A. B., Turatti, I. C., Ambrósio, S. R., Furtado, N. A., ... & Bastos, J. K. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 4, p. 653-659, 2011.

Souza, A. B., Moreira, M. R., Borges, C. H. G., Simão, M. R., Bastos, J. K., de Sousa, J. P. B., ... & Veneziani, R. C. S. Development and validation of a rapid RP-HPLC method for

analysis of (-)-copalic acid in Copaiba oleoresin. **Planta Medica**, v. 78, n. 11, p. 280-283, 2012.

Tappin, M. R., Pereira, J. F., Lima, L. A., Siani, A. C., Mazzei, J. L., & Ramos, M. F. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 236-240, 2004.

Trindade, R., Da Silva, J. K., & Setzer, W. N. Copaifera of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1511, 2018..

Veiga, V. F., Rosas, E. C., Carvalho, M. V. D., Henriques, M. D. G. M. D. O., & Pinto, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from Copaifera cearensis Huber ex Ducke, Copaifera reticulata Ducke and Copaifera multijuga Hayne—a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, n. 2, p. 248-254, 2007.

Veiga Jr, V. F., & Pinto, A. C. Utilização do Monitoramento Seletivo de Íons como Ferramenta para a Detecção de Adulterações em Óleos de Copaíba. **Revista Fitos**, v. 1, n. 1, p. 52-56, 2013.

Veiga Jr., V. F.; Pinto, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

Veiga Jr, V. F., Patitucci, M. L., & Pinto, A. C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 612-615, 1997.

Xavier-Junior, F. H., Maciuk, A., Rochelle do Vale Morais, A., Alencar, E. D. N., Garcia, V. L., Tabosa do Egito, E. S., & Vauthier, C. Development of a gas chromatography method for the analysis of copaiba oil. **Journal of chromatographic science**, v. 55, n. 10, p. 969-978, 2017.