

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Metodologias analíticas para a caracterização química de
Amostra Comercial do Óleo de Copaíba e atividade citotóxica
sobre câncer gástrico (células AGS)**

**Analytical methodologies for chemical characterization of Commercial Sample of
Copaiba Oil and cytotoxic activity on gastric cancer (AGS cells)**

Lorena Souza Lima

Dissertação de Mestrado em Química

**Vitória
2022**

Lorena Souza Lima

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química

Linha de Pesquisa: Química de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster

VITÓRIA

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

L732m Lima, Lorena Souza, 1997-
Metodologias analíticas para a caracterização química de amostra comercial do Óleo de Copaíba e atividade citotóxica sobre câncer gástrico (células AGS) / Lorena Souza Lima. - 2022.
84 f. : il.

Orientador: Ricardo Machado Kuster.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. Copaiifera. 2. Sesquiterpenos. 3. Diterpenos. 4. Atividade citotóxica. I. Kuster, Ricardo Machado. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas. III. Título.

CDU: 54

Metodologias analíticas para a caracterização química de Amostra
Comercial do Óleo de Copaíba e atividade citotóxica sobre câncer
gástrico (células AGS)

Lorena Souza Lima

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre(a) em Química.

Aprovada em 30 de setembro de 2022 por:

Prof.(a) Dr.(a) Ricardo Machado Kuster¹
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador(a)

Prof.(a) Dr.(a) Hildegardo Seibert França¹
Instituto Federal do Espírito Santo

Prof.(a) Dr.(a) Warley de Souza Borges¹
Universidade Federal do Espírito Santo

¹ O documento será assinado eletronicamente em conformidade com as normas prescritas na Portaria Normativa PRPPG/ UFES nº 08/2021.





Documentos defesa de Dissertação de Mestrado de Lorena Souza Lima

Data e Hora de Criação: 01/10/2022 às 15:44:35

Documentos que originaram esse envelope:

- Ata da defesa aprovado.docx (Documento Microsoft Word) - 1 página(s)
- Folha de assinaturas.docx (Documento Microsoft Word) - 1 página(s)
- Registro de julgamento.docx (Documento Microsoft Word) - 1 página(s)



Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: 2cc9a61f8b5b3fe6a992043bebaef0f6e62e6b15de821f87c459c4506de99449

[SHA512]: 98320dbad86c8b05579083c41218f00957f41188888dbd56e5594cac5a3c73163faec542ad77c028b726eb7c57bba03ade039910ac1c7c545b144509dae1e528

Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



ASSINADO - Ricardo Machado Kuster (ricardo.m.kuster@ufes.br)

Data/Hora: 01/10/2022 - 15:51:04, IP: 177.133.91.2, Geolocalização: [-20.336605, -40.278213]

[SHA256]: c3dfe299a06f1174ca234aac06db41e872d37e198d50e8734e1aa1b850f78f0e



ASSINADO - warley000@yahoo.com.br

Data/Hora: 01/10/2022 - 19:18:41, IP: 186.212.162.244, Geolocalização: [-20.28697, -40.297888]

[SHA256]: 016c021f06c4d20e113e995dec708f7c80e036d83001b993866159a84636f1de



ASSINADO - hildegardo.franca@ifes.edu.br

Data/Hora: 03/10/2022 - 06:56:34, IP: 200.137.75.113

[SHA256]: c2aca6eacdc3d84dc47c1c32fe6b1bb3254b0fc084402a7678326b91d15e2f8d

Histórico de eventos registrados neste envelope

- 03/10/2022 06:56:34 - Envelope finalizado por hildegardo.franca@ifes.edu.br, IP 200.137.75.113
- 03/10/2022 06:56:34 - Assinatura realizada por hildegardo.franca@ifes.edu.br, IP 200.137.75.113
- 03/10/2022 06:56:00 - Envelope visualizado por hildegardo.franca@ifes.edu.br, IP 200.137.75.113
- 01/10/2022 19:18:41 - Assinatura realizada por warley000@yahoo.com.br, IP 186.212.162.244
- 01/10/2022 19:18:32 - Envelope visualizado por warley000@yahoo.com.br, IP 186.212.162.244
- 01/10/2022 15:51:04 - Assinatura realizada por ricardo.m.kuster@ufes.br, IP 177.133.91.2
- 01/10/2022 15:50:42 - Envelope visualizado por ricardo.m.kuster@ufes.br, IP 177.133.91.2
- 01/10/2022 15:49:16 - Envelope registrado na Blockchain por ricardo.m.kuster@ufes.br, IP 177.133.91.2
- 01/10/2022 15:49:14 - Envelope encaminhado para assinaturas por ricardo.m.kuster@ufes.br, IP 177.133.91.2
- 01/10/2022 15:44:45 - Envelope criado por ricardo.m.kuster@ufes.br, IP 177.133.91.2

À Deus e as pessoas que tanto amo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem a sua graça e misericórdia, com toda certeza eu não concluiria esse curso.

Agradeço aos meus familiares, em especial à minha mãe, por desde a faculdade, mesmo não compreendendo direito o que eu fazia, sempre me apoiar e por se sacrificar para eu ter sempre o melhor. Agradeço por ouvir meus lamentos e dizer que tudo ficaria bem. E, por sua paciência com meu processo, mesmo eu não merecendo. Sinto seu amor em cada detalhe, com toda certeza!

Ao João Pedro, meu noivo, por nunca me fazer sentir só. Por sempre me ouvir. Por me incentivar a nunca desistir, me fazendo sentir capaz, cuidada e amada. Seu amor e companheirismo são as melhores coisas que já aconteceram em minha vida, e me dão forças para caminhar. Sempre por nós!

Aos meus sogros, por suas orações, amor, carinho, acolhimento e pela casa. Em especial minha sogra, a qual sempre demonstrou sua preocupação com meu bem-estar físico e mental ao longo desse mestrado. Vocês me fazem sentir filha!

Agradeço a minha irmã, pelas frases que me fizeram voltar a realidade e mesmo não demonstrando muito, sinto sua preocupação comigo.

Aos meus amigos queridos, com os quais eu consegui dividir um pouco desse percurso, o tornando menos difícil. Em especial, a Lorena, Lucas e Carolina, que me acompanham desde a faculdade. Senti muita falta de vocês por perto para dividir as dificuldades, mas, um pouco em que conversávamos por mensagens, tudo parecia voltar ao que era antes.

Aos amigos que conquistei através do Laboratório de Cromatografia. À Larissa, agradeço por cada puxão de orelha, por cada disposição que teve em me ajudar e por sempre tentar fazer com que eu visse o lado positivo das situações. Por tirar minhas dúvidas e por me ajudar nos processos do trabalho. À Jullia, que também sempre me trouxe para realidade. Obrigada por me ouvir, pelas risadas, pelas boas conversas e pelos cafés. Sua seriedade e competência me inspiram. Meninas, vocês foram os presentes que ganhei no Laboratório! Com toda certeza! Vocês foram muito companheiras para mim. E meu coração é muito grato por isso.

À Cristina, por me auxiliar no manuseio do equipamento CG-EM, na montagem da coluna e pelas palavras de carinho.

Ao Marcos, por ajudar nas eventuais dúvidas que surgiram ao longo do processo, tendo sempre bom humor para me receber.

Ao Laboratório de Massas, e aos alunos do Professor Wanderson Romão.

Ao Professor Ricardo M. Kuster, pela paciência na orientação, por sempre prontamente me auxiliar a resolver qualquer tipo de intercorrência que surgia no caminho. Agradeço também por não desistir de mim!

Agradeço ao Professor Rodrigo R. Kitagawa pela coorientação, pela disposição de aluno e seu laboratório para realizar as análises biológicas, do *campus* Maruípe. À aluna Jéssica que realizou essas análises.

Agradeço a disponibilidade dos professores da banca de defesa e pela avaliação deste trabalho.

À Labpetro por proporcionar toda a estrutura necessária para a conclusão deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Química, coordenador e ao corpo docente que contribuiu para minha formação e por todo conhecimento que adquiri.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

O seu Deus o ensina, e o instrui acerca do que há de fazer.

Isaías 28:26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore de Copaíba.....	15
Figura 2a. Estruturas dos principais sesquiterpenos encontrados no gênero <i>Copaifera</i>	17
Figura 2b. Estruturas dos principais diterpenos encontrados no gênero <i>Copaifera</i>	17
Figura 3. Estrutura do isopreno.....	18
Figura 4. rota metabólica biossintética do ácido mevalônico ou fosfato de desoxixilulose.....	19
Figura 5: Biossíntese do GPP, FPP e GGPP.....	20
Figura 7. Biossíntese do <i>ent</i> -ácido-caurenoico.....	21
Figura 8. Cromatograma CG-EM do óleo de copaíba comercial.....	22
Figura 9. Cromatograma CG-EM do óleo de copaíba comercial saponificado e metilado.....	36
Figura 10. Ésteres metílicos de diterpenos encontrados no OC-SM por CG-EM.....	43
Figura 11. Espectros de massas obtidos por GC-MS dos diterpenos labda-(8,20)-en-15-oato de metila, copalato de metila e ácido copálico.....	44
Figura 12a. Copalato de metila e ácido copálico nas frações FOC-2 da cromatografia em coluna de OC-B.....	46
Figura 12b. Copalato de metila e ácido copálico nas frações FOC-4 da cromatografia em coluna de OC-B.....	47
Figura 12c. Copalato de metila e ácido copálico nas frações FOC-5 da cromatografia em coluna de OC-B.....	48
Figura 13a. Cromatogramas das frações FOC-9 da cromatografia em coluna de OC-B.....	49
Figura 13b. Cromatogramas das frações FOC-11 da cromatografia em coluna de OC-B.....	50
Figura 14. Espectros de massas FT-ICR MS nas fontes eletronebulização (ESI) negativo e positivo.....	52
Figura 15. Fragmentações sequenciais (MS ² e MS ³) para o ácido agático.....	56

Figura 16. Fragmentações sequenciais (MS ² e MS ³) para o ácido 3-hidroxipálico.....	57
Figura 17. Fragmentações sequenciais (MS ² e MS ³) para o ácido 3-acetoxicopálico.....	58
Figura 18. Espectro de massas do íon [M-H] ⁻ 315,00 mostrando o fragmento intenso <i>m/z</i> 271,00 pela perda de CO ₂	60
Figura 19. Espectro de massas do íon [M-H] ⁻ 313,00 mostrando o fragmento intenso <i>m/z</i> 269 pela perda de CO ₂	60
Figura 20. Fragmentações sequenciais (MS ² e MS ³) para diferenciar o ácido poliáltico do ácido hardwickiico.....	62
Figura 21. Efeito de <i>Copaifera sp.</i> e cisplatina na cultura de células AGS. Resultados expressos em percentagem de células viáveis. *p < 0,001 em relação ao controle de crescimento.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química determinada por CG-EM do óleo bruto de copaíba.....	37
Tabela 2. Composição química determinada por CG-EM do óleo bruto saponificado e metilado.....	42
Tabela 3. Estruturas propostas para sesquiterpenos oxigenados, ácidos diterpênicos, ácidos graxos e diterpenos ionizados com ESI (-) e (+) como íons [M-H] ⁻ , [M-H] ⁺ e [M+Na] ⁺	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGS –Adenocarcinoma Gástrico

ANVISA –Agência Brasileira de Vigilância Sanitária

APCI –Ionização Química a Pressão Atmosférica (*Atmospheric-pressure Chemical ionization*)

CG-EM –Cromatografia Gasosa acoplado à espectrometria de massas

DBE –Número de insaturações (*Double bonds equivalent*)

DMAPP –difosfato de dimetilalila

DMEM –*Dulbecco's modified Eagle's medium*

ESI –Ionização por eletronebulização (*Electrospray Ionization*)

ESI FT-ICR MS –Espectrometria de Massas com Ionização por eletronebulização e Ressonância Ciclôtrônica de Íons por Transformada de Fourier (*Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*)

FT-ICR MS –Espectrometria de massas de Ressonância Ciclôtrônica de Íons por Transformada de Fourier

FOC – Fração do Óleo de Copaíba

FDA - Food and Drug Administration

FPP - difosfato de farnesila

GGP - difosfato de geranila

GGPP - difosfato de geranilgeranila

HRMS - espectrometria de massas de alta resolução

IC₅₀ –Concentração inibitória média

INCA –Instituto Nacional do Câncer

IPP –Pirofosfato de Isopentila

IL-6 –Interleucina 6

MS –Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry*)

m/z –Razão massa-sobre-carga

MTT-tetrazólio –*Thiazolyl Blue Tetrazolium bromide*

NIST –Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia

Ppm –Partes por milhão

OC-B – Óleo de Copaiba Bruto

OC-SM – Óleo de Copaiba saponificado e metilado

OPP - difosfato

LISTA DE SÍMBOLOS

bar -barômetro

cm –centímetros

eV –eletron-volts

g –grama

hex -hexano

Hz –Hertz

kV -kilovolts

M –Molar

MeOH - Metanol

µg/mL –micrograma por mililitro

mg –miligrama

mL –mililitros

nd –não determinado

V –volts

Seg - Segundos

RESUMO

A *Copaifera* é um gênero de planta amplamente empregado na medicina popular brasileira, dentre suas diversas utilizações está o tratamento de gastrites e úlceras estomacais. Normalmente plantas, como esse gênero, que são utilizadas comercialmente como fitoterápicos, são quimicamente bem caracterizadas. Esse gênero se destaca pela presença de compostos como sesquiterpenos e diterpenos. Neste trabalho, será demonstrada a utilização de técnicas para identificação desses compostos. Os sesquiterpenos, sendo voláteis, são identificados por CG-EM. Assim como foi possível observar, a presença dos principais sesquiterpenos já descritos, como o principal sesquiterpeno β -cariofileno (49,42%), e outros sesquiterpenos como *trans*- α -bergamoteno (16,22%), α -Copaeno (4,28%), γ -elemeno (2,18%), e óxido de cariofileno (0,41%). Como não é possível observar por CG-EM os diterpenos deste gênero, por serem ácidos carboxílicos, necessitando de derivatização química para tal análise, esse trabalho também demonstra como uma metodologia rápida, baseada na análise direta da amostra por Espectrometria de Massa de Alta Resolução e Fragmentação de Massa em Múltiplos Estágios (MSⁿ), leva à caracterização dos principais diterpenos, como ácido agático, copálico ácido 3-hidroxicopálico, ácido 3-acetoxicopálico, ácido 3-hidroxiabdan-8(17)-en-15-óico, ácido hardwickiico e ácido 7-acetoxihardwickiico, além de permitir mostrar a existência de substâncias ainda não isoladas por métodos analíticos utilizados na análise de produtos naturais. A amostra analisada também apresentou atividade citotóxica significativa em células cancerígenas gástricas (células AGS, IC₅₀ = 43,01 ± 0,67 µg/mL).

Palavras-chave: *Copaifera*. Sesquiterpenos. Diterpenos. Atividade citotóxica.

ABSTRACT

Copaifera is a genus of plant widely used in Brazilian folk medicine, among its many is the treatment of gastritis and stomach consultations. Typically, like this genus, which are used commercially as herbal medicines, they are chemically well peaked. This genus stands out for the presence of compounds such as sesquiterpenes and diterpenes. In this work, the use of techniques to identify these compounds will be demonstrated. Sesquiterpenes, being volatile, are easily identified by GC-MS. As it was possible to observe, the presence of the main sesquiterpenes already described, such as the main sesquiterpene β -caryophyllene (49.42%), and other sesquiterpenes such as trans- α -bergamotene (16.22%), α -Copaene (4, 28%), γ -elemene (2.18%), and caryophyllene oxide (0.41%). As the sampled diterraneans of this genus are not observed by GC-MS, as they are also easy to demonstrate as a high chemical resolution for such analysis, this work is a fast methodology, based on the direct analysis of Mass Mass Spectrometry and Mass Fragmentation. in Multiple Stages (MSn), leads to the characterization of the main diterpenes, such as agatic acid, 3-hydroxycopalic acid, 3-acetoxycopalic acid, 3-hydroxyabdan-8(17)-en-15-oic acid, hardwickiic acid and chemical acid 7-acetoxyhardwicki allows to show the existence of substances not yet isolated by analitics methods of natural products. One sample also showed significant cytotoxic activity on gastric cancer cells (AGS cells, IC50 = 43.01 \pm 0.7 μ g/mL).

Keyword: *Copaifera*. Sesquiterpenes. Diterpenes. Cytotoxic activity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>Copaifera sp.</i> - Classificação botânica e aspectos gerais.....	15
1.1.1 Aspectos químicos: <i>Copaifera sp.</i>	15
1.1.2 Metabolismo secundário: sesquiterpenos e diterpenos	18
1.1.3. Relevancia na Medicina: <i>Copaifera sp.</i>	26
1.2 Técnicas analíticas aplicadas a produtos naturais.....	26
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo Geral.....	29
2.2. Objetivos Específicos.....	29
3. METODOLOGIA	30
3.1 Amostra em análise.....	30
3.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) – Parte 1.....	30
3.3 Derivatização do óleo de copaíba comercial.....	31
3.4 Fracionamento do óleo de copaíba comercial por cromatografia em coluna de fase estacionária sílica-gel.....	31
3.5 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) - Parte 2.....	32
3.6 Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier com fonte de ionização por eletrospray (\pm ESI-FT-ICR MS).....	33
3.7 Espectrometria de massas em “linear ion trap mass spectrometer (ESI- (-) - LTQ MS)”.....	33
3.8 Avaliação da citotoxicidade in vitro do óleo de copaíba comercial sobre células de adenocarcinoma gástrico (AGS).....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Perfil Químico do Óleo de Copaíba Bruto.....	35
4.2 Perfil químico do Óleo de Copaíba derivatizado.....	39
4.3 Fracionamento do óleo em coluna de sílica gel para identificação dos compostos minoritários.....	45
4.4. Perfil químico do óleo de copaíba bruto por FT-ICR-MS e ESI (-) LTQ MS.....	51
4.5 Atividade Citotóxica.....	62
5. CONCLUSÃO	64
6. REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Copaifera sp.* – CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E ASPECTOS GERAIS

O gênero *Copaifera*, pertencente à família *Fabaceae*, possui 72 espécies descritas, sendo 16 delas encontradas apenas no Brasil. É comum se deparar com árvores de copaíba (copaibeiras) na América Latina e na África ocidental. No Brasil, essa árvore, representada na Figura 1, pode ser vista nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Amazônica, e é conhecida como “copaíba”, “copaibeira”, “pau-de-óleo”^{1,2,3,4}.

Essas árvores podem chegar a 40 metros de altura e 4 metros de diâmetro, podendo viver cerca de 400 anos. São árvores que contêm cascas aromáticas, folhagens densas, flores pequenas e frutos secos. O óleo-resina, que é extraído através da perfuração dos troncos da árvore durante a estação chuvosa, possui coloração do amarelo ouro a marrom, de acordo com a espécie da planta. Esse é comumente empregado na medicina tradicional popular, e é usado como panaceia pela população indígena para diversas finalidades, tais como: analgésica e cicatrizante. Além disso, é um importante produto natural amazônico, comercializado tanto localmente quanto no exterior^{1,2,3,4}.



Figura 1. Árvore de Copaíba. Adaptado de PIERI *et al.*, 2009.

1.1.1. Aspectos químicos: *Copaifera sp.*

Em 1829, Schweitzer descreveu pela primeira vez a solidificação do óleo de copaíba, que se manteve em um longo período de repouso, como ácido

copaívico. A partir dessa descoberta, outras substâncias (ou misturas delas) foram sendo descritas, como o ácido oxycopaívico (em 1841, pelo Fehling), ácido metacopaívico (em 1865, por Strauss), ácido paracopaívico e o homocopaívico. O ácido paracopaívico - classificado anteriormente – possui a estrutura similar a um diterpeno, isso foi possível observar através do advento das técnicas espectroscópicas ⁵.

Em suma, a óleorresina é formado por uma parte sólida, não volátil, composta por ácidos diterpênicos. Essa parte sólida é diluída em outra, denominada óleo essencial, que é formado por substâncias que são mais voláteis, os sesquiterpenos, os quais subdividem-se em sesquiterpenos oxigenados (álcoois) e hidrocarbonetos sesquiterpênicos ¹.

Na composição química das óleorresinas de copaíba incluem-se sesquiterpenos e diterpenos, os quais são metabólitos vegetais, que possuem atividades biológicas. Entre as duas classes supracitadas, a principal é a de sesquiterpenos, pois representa de 58% a 98% do peso total da amostra, isso, a depender de alguns parâmetros, tais como: a espécie analisada, a área em que a planta foi cultivada, a época da colheita ⁶.

Dentro do gênero *Copaifera* existem diversas espécies e os sesquiterpenos não sofrem variações severas entre espécies ¹. A saber, os principais sesquiterpenos encontrados na óleorresina e no óleo essencial da copaíba são: o β -cariofileno, o β -bisaboleno, o α -humuleno, o β -selineno, o α -bisabolol, o β -elemeno, o γ -cadineno, o cadinol, o Germacreno D (Figura 2a) ⁷. Na fração resinosa do óleo é possível se encontrar diterpenos como: o ácido hardwíckico, o ácido copaiférico ou o copaífero, o ácido copaiferólico, o ácido patagônico, o ácido copálico (Figura 2b) ^{6,7}.

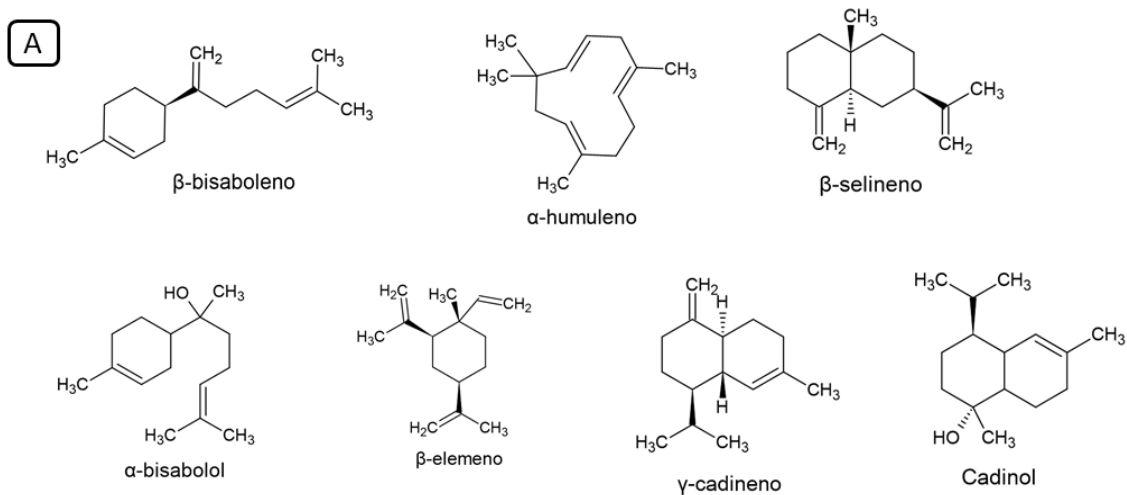


Figura 2a. Estruturas dos principais sesquiterpenos encontrados no gênero *Copaifera*. Elaborado pelo autor (2022).

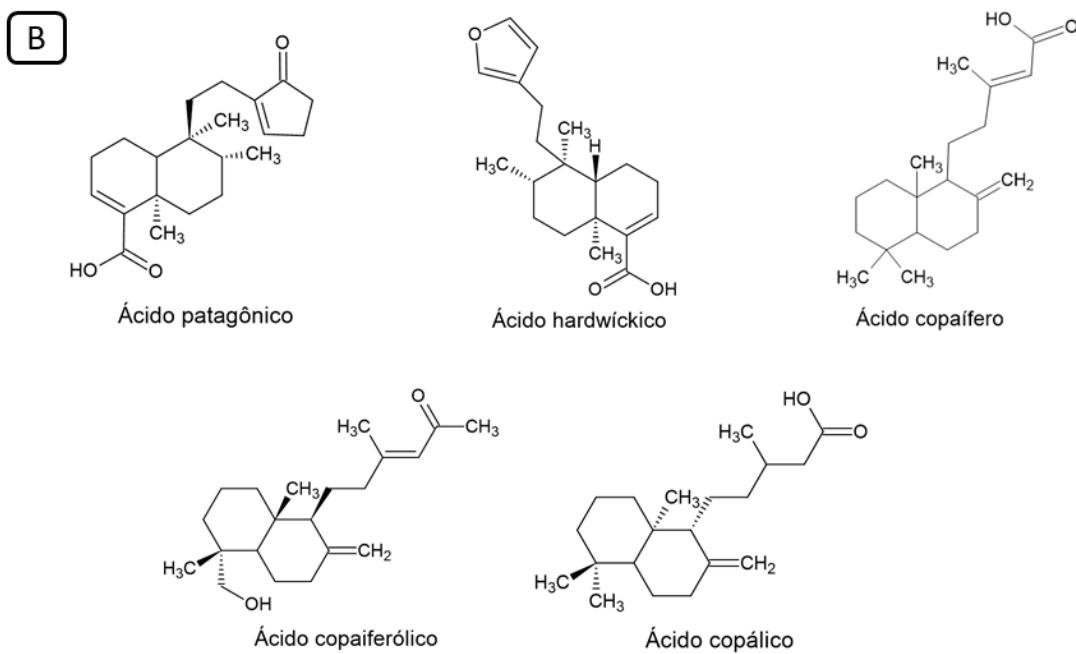


Figura 2b. Estruturas dos principais diterpenos encontrados no gênero *Copaifera*. Elaborado pelo autor (2022).

Dentre os compostos apresentados, as substâncias β -cariofileno ou β -bisaboleno demonstraram ser, por diversas vezes, os principais constituintes químicos presentes no gênero *Copaifera* ⁶. No entanto, é ao diterpeno ácido copálico, que se atribuí a função de principal marcador dos óleos de copaíba, pois esse componente foi o único detectado em todos os óleos que foram analisados por cromatografia gasosa ⁵.

Ademais, os sesquiterpenos β -cariofileno e β -bisaboleno não se encontram apenas no gênero *Copaifera*, estando presentes também em outros gêneros, como em *Abies* (Pinaceae) e em *Eugenia* (Myrtaceae), mesmo o β -cariofileno se mostrando o mais abundante sesquiterpeno. Assim, as pesquisas sobre compostos puros e isolados das oleorresinas de copaíba tem o foco em diterpenos específicos, tais como: o *ent*-ácido-copalico, o *ent*-ácido-agathico, o *ent*-ácido-caurenoico, o *ent*-ácido-polyalthico e o ácido *ent*-hardwickiico ^{1,4,6,8}.

1.1.2. Metabolismo secundário: sesquiterpenos e diterpenos

Os terpenóides, sesquiterpenos e diterpenos, são produtos naturais derivados de unidades de isopreno (C₅) (Figura 3). Suas estruturas são originadas a partir do metabólito secundário pirofosfato de isopentenila (IPP), da rota metabólica biossintética do ácido mevalônico ou fosfato de desoxixilulose (Figura 4) ⁹.

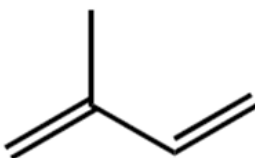


Figura 3. Estrutura do isopreno. Adaptado de DEWICK, 2002.

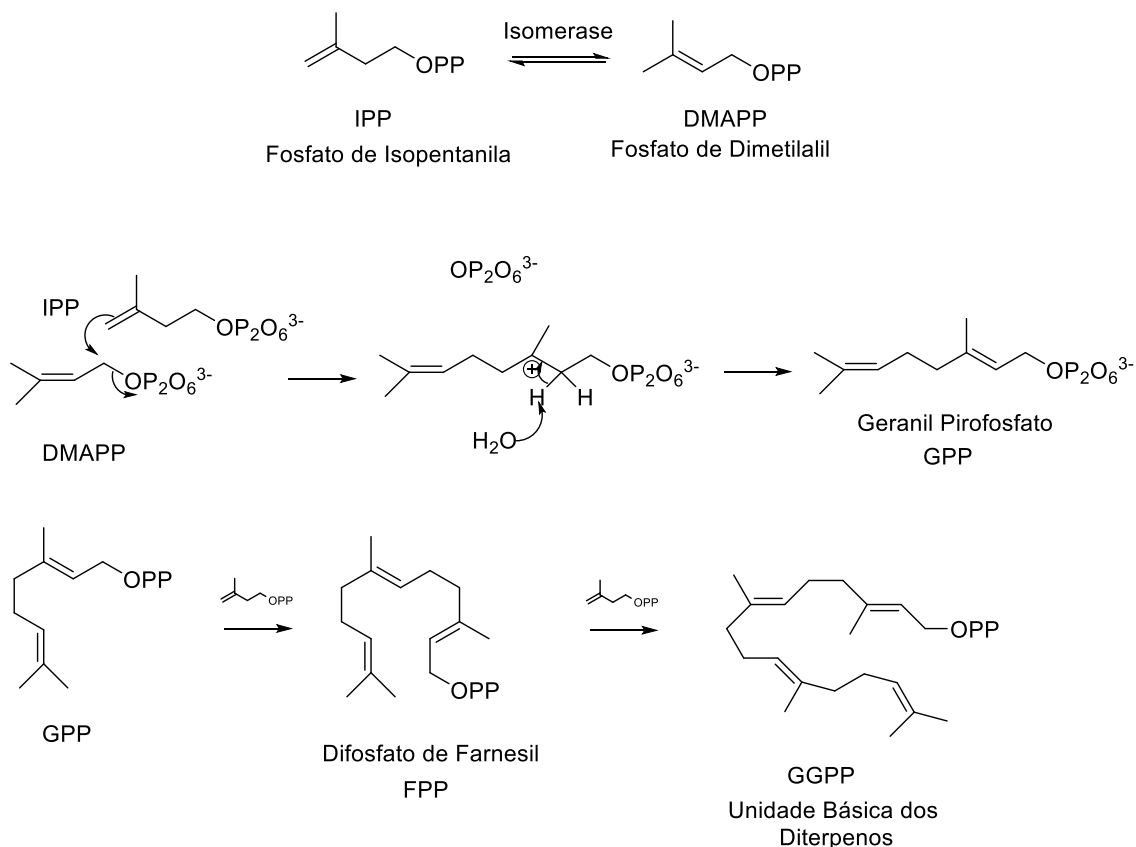


Figura 5: Biossíntese do GPP, FPP e GGPP. Adaptado de DEWICK, 2002.

Um dos terpenos mais importantes e abundantes encontrados nas espécies de plantas do gênero *Copaifera* é o β -cariofileno ¹, sua biossíntese está representada na Figura 6. Essa ocorre por meio da formação de um carbocátion *E,E*- farnesila após a perda de um grupo de saída, o difosfato (OPP). Trata-se de uma reação padrão que pode levar a explicação racional da maioria dos esqueletos estruturais comuns encontrados. Isso, permite o rearranjo estrutural, ditado pela enzima envolvida na reação e na ciclização da molécula por ataque nucleofílico da dupla ligação ao carbocátion formado. O anel de 11 carbonos com o carbocátion humulila pode ser modificado, gerando o cátion cariofilila que contém nove membros com anel fundido a um anel de quatro membros, β -cariofileno ⁹.

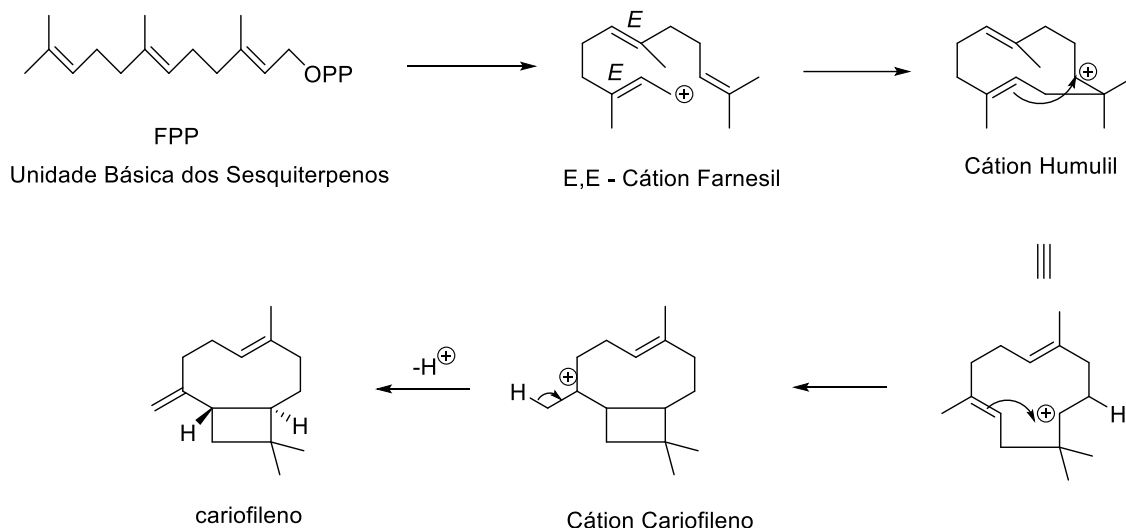


Figura 6. Biossíntese do β -cariofileno. Adaptado de DEWICK, 2002.

A biossíntese do *ent*-ácido-caurenoico, diterpeno presente no óleo de copaíba, inicia-se através do difosfato de geranylgeranila (GGPP) (Figura 7). A protonação do GGPP pode iniciar uma sequência de ciclização concertada, terminando com a perda de um próton de um metil, produzindo o copalil PP. Em seguida, ocorre a perda do difosfato, gerando a ciclização do alceno e a formação de um carbocátion secundário. Por sua vez, o carbocátion é convertido em um carbocátion terciário pela migração 1,2 alquil. A perda de um próton forma o alceno e oxidações sequenciais transformam o grupamento metil em carboxila, dando origem ao ácido. Na pesquisa de Tincusi e colaboradores (2002), houve o isolamento de 12 diterpenos da oleorresina de uma espécie de *Copaifera*, a *C. paupera*, dentre eles estava presente o ácido diterpenóide *ent*-ácido-caurenoico ¹⁰.

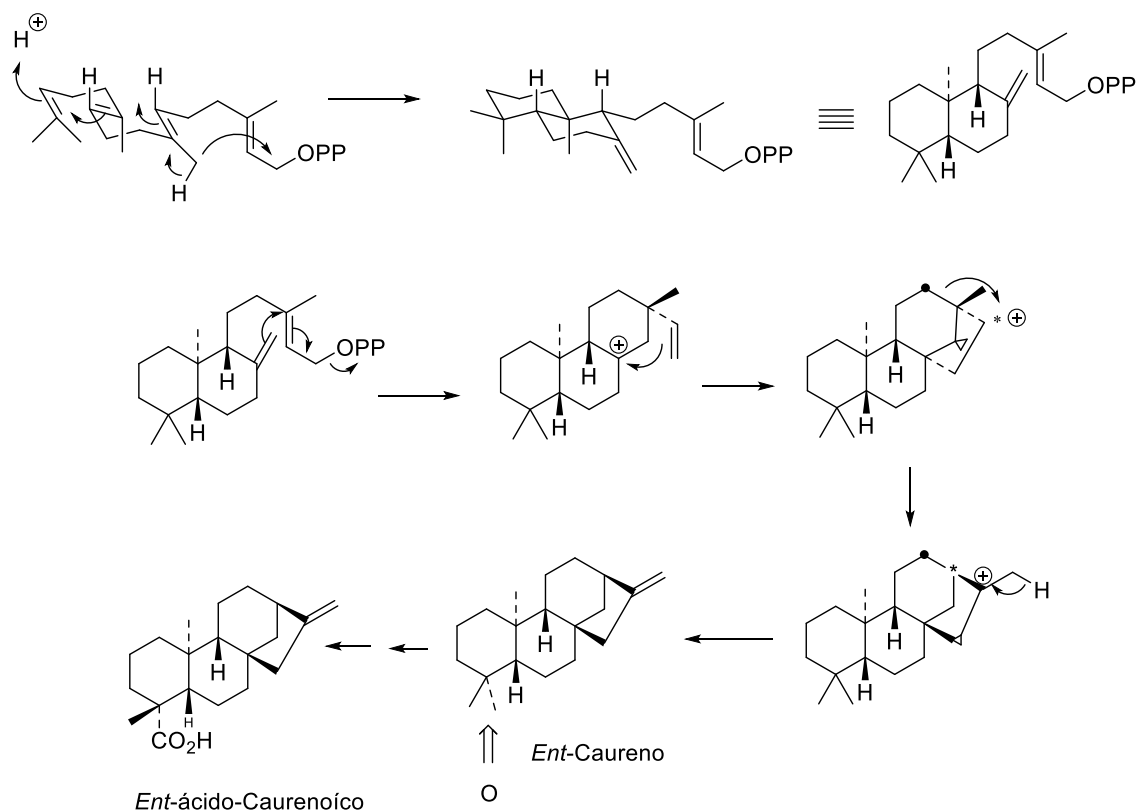


Figura 7. Biossíntese do *ent*-ácido-caurenoico. DEWICK, 2002, adaptado.

1.1.3. Relevância para Medicina: *Copaifera sp.*

Quando se fala de tratamentos para o Câncer, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) menciona tais ações podem ser feitas por meio de cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou também por meio do transplante de medula óssea. Estes tratamentos por diversas vezes podem se fazer necessário a combinação entre eles. Dentre estes se destaca a quimioterapia que se utiliza de medicamentos para tratamento do câncer. Esses medicamentos se distribuem por todas as partes do corpo ao se misturarem com o sangue do paciente, eliminando as células doentes que formaram o tumor maligno, podendo impedir a invasão deste tumor a outros órgãos (metástase), mas, além das células cancerosas, esses medicamentos podem atingir as células saudáveis ¹⁴.

Devido a esse fato, a medicina avança para que os dados causados as células boas sejam cada vez menores, e mais eficientes. Com isso, a importância e a relevância dos estudos dos produtos naturais aumentam, e os estudos envolvendo o óleo de copaíba se destaca, pois as propriedades de cunho medicinal e a vasta utilização pela população do óleo de copaíba estão

inteiramente relacionadas às diversas substâncias químicas encontradas nesse substrato. Mas, antes mesmo de que se fossem comprovadas cientificamente as aplicações relacionadas aos tais compostos, o óleo já era utilizado e conhecido pelos indígenas latino-americanos. Eles faziam o uso do óleo extraído das copaibeiras para curar as feridas dos guerreiros acidentados nas batalhas e para a cicatrização do umbigo dos recém-nascidos. Supõe-se que o uso indígena tenha se inspirado na observação de animais feridos que atritavam suas feridas nos troncos das copaibeiras para que ocorresse a cicatrização ⁵.

Então, ao notar a importância do óleo para a medicina tradicional popular, a ciência se direcionou rumo a estudos científicos que provassem a atividade do óleo em diversos ensaios *in vitro* e *in vivo*. Esses testes envolvem aplicações medicinais acerca da cicatrização de feridas, do tratamento de infecções da pele e do trato urinário, de doenças respiratórias ⁶.

No ano de 1972, o Food and Drug Administration (FDA), a agência federal do departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, e um dos departamentos executivos federais norte-americanos, que tem a finalidade de assegurar (LEITE, 2022) e proteger a saúde pública, realizou testes em 25 voluntários utilizando óleo de copaíba, com o objetivo de conhecer os riscos de sensibilização e irritação para o ser humano quanto a ingestão oral ¹¹. O resultado do teste foi aprovado para ingestão, pois o grau de toxicidade registrada do óleo foi baixa ⁵.

Após as evidências de baixa toxicidade, em 1998, Paiva demonstrou resultados claros quanto às propriedades gastroprotetoras utilizando a óleorresina de cascas do caule da espécie *Copaifera langsdorffii* em ratos machos. A óleorresina foi aplicada em doses de 100, 200 e 400 mg kg⁻¹ de peso corporal em uma suspensão aquosa fazendo uso do veículo (2% v v⁻¹ Tween 80 em água destilada) ¹². Essas doses foram utilizadas após a seleção baseada em experimentos preliminares que exibiram uma significativa proteção contra danos gástricos induzidos pelo etanol. As drogas de teste foram administradas de dois modos, através da via oral e/ou intraduodenal em volume de 10 mL kg⁻¹. Nos

testes também foram utilizados animais para controle, que receberam o mesmo volume de veículo. Os animais receberam três tipos de amostras, o veículo (controle), às óleorresinas com três dosagens diferentes ou cimetidina, por via oral. Isso, 1 hora antes da indução do dano na mucosa gástrica, as quais foram induzidas experimentalmente por etanol, indometacina e estresse de contenção hipotérmico. Esses modelos descrevem usualmente a avaliação da atividade antiúlcera em ratos. Quanto à óleorresina, que é o foco deste trabalho, deu-se como resultado com um agente gastroprotetor eficaz, e obteve melhores resultados quanto às inibições induzidas por etanol e estresse. A cimetidina diminuiu o volume de suco gástrico e a acidez total estomacal e a óleorresina aumentou o suco gástrico, mas diminuiu de maneira considerável a acidez, apresentando assim um mecanismo diferente de ação da cimetidina. Pelos levantamentos de estudos, observa-se que a inibição da secreção ácida no estômago é um fator muito importante e relevante para a cicatrização de úlceras gástricas ¹².

Conforme já mencionado, o óleo de copaíba é muito utilizado na cicatrização, bem como para doenças no estômago, pois atua na diminuição da acidez estomacal. O que já se sabe é que a gastrite crônica tipo B está intimamente relacionada com o câncer gástrico, sendo um de seus precursores, no que se tratar da evolução dessa patologia. Além disso, a bactéria *Helicobacter Pylori* e questões alimentares e nutricionais também estão entre os fatores que aumentam o risco ¹³. O tipo adenocarcinoma é responsável por cerca de 95% dos casos de tumor do estômago, segundo estimativas INCA (2022), outros tumores como linfomas e sarcomas preenchem os 5% restantes. Em sua maioria, o adenocarcinoma de estômago atinge homens entre 60-70 anos. E, no Brasil, os dados mostram que esse é o terceiro tipo de tumor que frequentemente mais atinge homens e, em quinto lugar, mulheres ¹⁴.

Então, analisando esses dados, ao se falar em tratamentos, o INCA também diz que os meios para combater o avanço do câncer pode ser feito por meio de cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou também por meio do transplante de medula óssea. Estes tratamentos por diversas vezes podem se fazer necessário a combinação entre eles. Dentre estes se destaca a quimioterapia que se utiliza

de medicamentos para eliminar o câncer. Esses medicamentos se distribuem por todas as partes do corpo ao se misturarem com o sangue do paciente, eliminando as células doentes que formaram o tumor maligno, podendo impedir a invasão deste tumor a outros órgãos (metástase) ¹⁴.

Mas, além da quimioterapia ter o intuito da eliminação de células cancerosas, com a alta toxicidade dos medicamentos atribuídos ao tratamento (exemplo da Cisplatina) faz com que também células saudáveis sejam atingidas. Por isso, é o avanço dos estudos dos fármacos utilizados no tratamento do câncer se faz necessário ⁴⁶. Em razão disso, estudos farmacológicos com produtos comerciais devem ser realizados com amostras de excelência, ou seja, que foram extraídas de suas fontes vegetais sem terem sofrido contaminação ou adulteração. E, os óleos de copaíba são conhecidos pela adulteração com óleos comestíveis, que os torna enriquecidos com ácidos graxo ³⁹.

Até o presente momento, estudos relacionando o óleo de copaíba ao câncer gástrico, não foram abordados na literatura, mas há estudos que abordam assuntos sobre atividades citotóxicas utilizando linhagens celulares de outros tipos, como é o caso da pesquisa de Tincusi e colaboradores (2002), na qual houve o isolamento de 12 diterpenos e 3 sesquiterpenos da óleo-resina de uma espécie de *Copaifera*, a *C. paupera*. Os compostos isolados ácido (-)-copálico, (-)-metil copalato, (-)-ácido poliáltico, ácido (-)-pinifólico, ácido (-)-caurênico, ácido 16- β -cauran-19-óico foram testados para atividades citotóxicas e inibidores da aldose redutase ¹⁰. A atividade citotóxica foi determinada contra linhagens celulares de P-388 (neoplasma linfóide de um camundongo DBA/2), A-549 (carcinoma de pulmão humano), HT-29 (carcinoma de cólon humano) e MEL-28 (melanoma humano). Dentre esses compostos, o (-)-metil copalato exibiu atividade moderada nas quatro linhagens celulares testadas, com IC₅₀ valores de 2,5, 5, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ contra as linhas celulares P-388, A-549, HT-29 e MEL-28, respectivamente. Nessa pesquisa, os autores realizaram também testes antimicrobianos com os compostos isolados do óleo de copaíba a fim de determinar a concentração inibitória mínima contra bactérias *gram*-positivas e *gram*-negativas e foram encontradas atividades antimicrobianas dos compostos *ent* ácido-copálico e *ent* ácido-caurenóico comparado à cefotaxima

utilizada para controle ¹⁰.

Em 2015, Dahham e colaboradores realizaram o isolamento bioguiado do β -cariofileno, que é um dos compostos majoritários do óleo de copaíba, e analisaram seus efeitos em um ensaio antitumoral *in vitro* utilizando células de câncer de cólon. O β -cariofileno demonstrou efeitos antioxidantes e efeitos antiproliferativos seletivos sobre células de câncer colorretal (IC₅₀ 19 μ M) ¹⁵.

Nos estudos de Lemos e colaboradores, em 2015, no qual foi feito a investigação das propriedades gastroprotetoras de uma das espécies do gênero *Copaifera*, a *Copaifera langsdorffii* Desf. foi realizada a identificação dos compostos através da técnica de CG-MS; nas amostras apolares revelaram a presença de compostos sesquiterpenicos como: α -copaeno, α -bergamoteno, β -cariofileno, α -humuleno, óxido de cariofileno, biciclogermacreno, germacreno D, germacreno B, δ -cadineno e α -cadinol. e o ácido caurenóico, que foi o principal diterpeno isolado das folhas de *C. langsdorffii*. Esse trabalho também utilizou extratos hidroalcoólicos, que foi aplicado a um modelo de úlcera induzida por solução etanol/HCl em camundongos. Os resultados fazendo uso do tratamento oral com extrato de *C. langsdorffii* foi a de uma redução significativa da lesão gástrica quando comparado ao grupo de controle ($p < 0,05$). Quando se trata da proporção curativa, a mínima dose que era de 50 mg kg⁻¹ apresentou índice curativo de 71,4%, superior ao omeprazol (62,5%) a 30 mg kg⁻¹, que é um medicamento de uso comum para problemas gástricos na sociedade.

Esses resultados levam a crer que os extratos dessa planta possuem efeito gastroprotetor, e isso está relacionado à atividade citoprotetora do extrato, no qual se teve a redução da gravidade das lesões que foram induzidas pelo etanol. Os principais compostos encontrados nos extratos isolados foram também avaliados usando o modelo de úlcera induzida por etanol/HCl. O ácido caurenóico, a quercitrina e a afzelina apresentaram atividade gastroprotetora, reduzindo lesões gástricas em 51,45, 60,48 e 60,83%, respectivamente. Os compostos que tiveram maiores atividades gastroprotetoras com percentuais de 76,20, 76,57 e 70,17% foram α -humuleno, β -cariofileno e óxido de cariofileno ¹⁶.

1.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A PRODUTOS NATURAIS

Nas análises de produtos naturais é muito comum a utilização de técnicas que sejam seletivas e sensíveis para a detecção dos metabólitos e para o fornecimento das informações estruturais das moléculas obtidas. Em suma, combinações de técnicas laboratoriais analíticas são utilizadas para a caracterização do produto natural, denominadas “técnicas hifenadas”, as quais utilizam combinações de duas ou mais técnicas para realização de análises. De costume, as técnicas empregadas são a cromatográfica e espectroscópica ou espectrométrica ^{17,18}.

Para que haja os dados sobre as estruturas dos produtos naturais estudados, incluindo as estruturas mais complexas, faz-se necessária a utilização tanto da cromatografia gasosa (CG), quanto da cromatografia líquida (CL), em geral, acopladas a técnicas espectroscópicas, como a espectrometria de massas (EM ou MS do inglês, Mass spectrometry) ¹⁹.

A saber, a cromatografia tem por objetivo a realização da separação e/ou purificação de mistura. Essa técnica se baseia na distribuição dos compostos entre uma fase estacionária e uma móvel. A cromatografia gasosa é largamente utilizada e tem o foco na separação de compostos que são voláteis ou volatilizáveis. Quando essa técnica é utilizada com o acoplamento a outro instrumento, como o EM, fornece informações sobre estrutura química dos compostos analisados ^{18,19}.

A exemplo, tem-se Lima Neto, Gramosa e Silveira (2011) que analisaram óleos essenciais de folhas, casca de raiz, casca de fruto, casca de tronco, madeira de tronco, madeira de raiz e frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. e bálsamo de copaíba através da técnica CG - EM e obtiveram resultados que permitiram a identificação de 40 compostos diferentes. Os compostos majoritários dentre as amostras foram os sesquiterpenos: β -cariofileno, γ -muurolene, óxido de cariofileno, 4- α -copaenol, caureno, γ -muurolene, β -bisabolol, caurenal ²⁰.

Em consenso a identificação de compostos há também a espectrometria de massas. Essa se fundamenta na ionização das moléculas que se deseja analisar

e na separação dos íons moleculares e seus fragmentos, com base em suas diferentes razões massa/carga, para que se tenha informações sobre a massa molar e características estruturais de substâncias presentes na amostra de interesse ^{21, 22}. Esta técnica é sensível e possibilita obter dados inerentes a análise de moléculas como seu peso molecular e informações sobre sua estrutura constituinte. A EM oferece uma boa resposta para a separação das massas e, conseqüentemente, seletividade em suas análises. Há várias aplicações a partir de fontes de ionização (FI) e analisadores de massas ²¹.

As FI's determinam os tipos de analitos que podem ser potencialmente analisados por técnicas analíticas utilizadas na investigação de produtos naturais. Dentro do sistema da espectrometria de massas, a função das FI's é a criação de íons em fase gasosa. Cada uma delas possuem um mecanismo específico de ionização que torna a técnica seletiva a um determinado grupo de moléculas. Assim, torna-se a escolha da FI intimamente ligada ao analito que se deseja analisar. Para além disso, também existem técnicas de ionização as quais ocasionam uma vasta fragmentação da amostra, por serem muito energéticas, enquanto outras são mais amenas que a fragmentação, as amostras são mínimas e formam apenas íons das espécies moleculares ²³.

Para que uma produção de íons seja satisfatória, na ionização por elétrons (EI), uma alta energia incidente na amostra, proveniente de um feixe de elétrons, é necessária, mas, no processo de ionização, apenas uma parte dessa energia é utilizada. Assim, o que se sobra dessa energia é liberada por meio de fragmentações. Há outra ionização que é menos energética que a EI, que é a ionização química (CI). Essa energia é doada ao analito por intermédio de um gás reagente. As duas técnicas são do tipo energéticas. Nota-se, perante o exposto, que as técnicas ditas "suaves" como ionização por eletronebulização (ESI), Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) e suas derivações, entre outras, foram uma revolução quando se trata de análises de moléculas ou de estruturas complexas. Pois, por não haver grande quantidade de fragmentações, esse método produz um espectro mais limpo, sendo útil para análise de analitos termoestáveis e com alto peso molecular, possibilitando a utilização da técnica de MS de maneira multidisciplinar ²³.

Tendo como foco deste trabalho a utilização do ESI, esse método viabiliza uma alta sensibilidade e se destaca por sua capacidade de formar íons gasosos a partir do analito em solução, porque muitos analitos de interesse não tem volatilidade o suficiente e não são estáveis para que haja uma volatilização prévia ²⁴.

O ESI envolve a ionização por pressão atmosférica das amostras que envolve a atomização de uma solução carregada (protonada e desprotonada), solução que é formada pela amostra e por solvente prótico (Ex.: CH₃COOH) ou por base (Ex.: NH₄OH), que facilitam a ionização. Dessa forma, a solução carregada é levada por um capilar metálico sob um potencial gerado por um campo elétrico de 3 a 5 kV, que sucede ao resultado de uma dupla camada elétrica na interface capilar/solução. Assim, há a formação de gotículas carregadas, quando o solvente se seca. Depois, elas vão aumentando a densidade até que haja a explosão coulômbica, que leva a formação das microgotas, que depois da secagem do solvente, liberam íons [M + H]⁺ ou [M + H]⁻ que são analisados nos analisados pelo analisador de massas ²⁴.

Oliveira e colaboradores encontraram nos extratos polares das folhas, galhos e cascas de *Copaifera multijuga hayne* o íon m/z 333 [M-H]⁻ que é a forma deprotonada do diterpeno ácido ent-agático (MM: 334) utilizando a técnica de análise ESI (-). Um importante composto que se destaca nas atividades antileishmanial e anti-trypanosoma. Esse diterpeno ácido ent-agático além dessa espécie, faz parte da composição química do óleo-resina de outras como *C. langsdorffii*, *paupera*, *reticulata* ²⁵. Por tanto, é notável que essas técnicas são importantes instrumentos de análises de compostos presentes em produtos naturais e para que seja levado a evolução na área medicinal.

Embora já existam diversos artigos referentes aos isolamentos de alguns diterpenos utilizando a cromatografia e, sendo identificados por técnicas espectroscópicas, este trabalho propôs a caracterização dos diterpenos de amostra comercial por espectrometria de massas de alta resolução nas fontes eletronebulização negativa e positiva (ESI±FT-ICR MS) para a determinação da fórmula molecular exata; e, por espectrometria de massas por armadilha de íon

linear (LTQ XL™ Linear Ion Trap Mass Spectrometer) para a determinação estrutural das moléculas por monitoramento de reação consecutiva.

A escolha destas técnicas se deve ao fato da observação de outros trabalhos, - inclusive feito neste mesmo documento – no qual consta-se que outras técnicas são procedimentos trabalhosos, tendo o consumo de grande tempo dos analistas, além de elevados custos financeiros. Outro ponto a ser abordado neste documento é baseado nos levantamentos literários, que, ao se tratar da gastroproteção o óleo de copaíba aponta uma promissora alternativa frente a medicamentos já usuais na sociedade. Também é possível observar a descrição na literatura que proporciona atividade citotóxica para alguns exemplos de cânceres.

Por fim, por esses motivos, este trabalho incentiva o contínuo estudo dessa planta, dando importância a exploração de seu perfil químico, a fim de correlacionar esses resultados com a possível ação citotóxica de células de câncer gástrico (AGS), uma vez que na literatura – até o momento da confecção deste trabalho - não foi estudado para este fim; levando a investigação e o amadurecimento na evolução científica no caminho da área medicinal, tendo em vista o uso do óleo de copaíba para este propósito.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

A presente pesquisa teve por finalidade a investigação do perfil químico do óleo comercial de copaíba, realizada por técnicas analíticas e avaliar a atividade citotóxica do óleo frente as células de câncer gástrico (AGS).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fracionar o óleo bruto comercial por Cromatografia em Coluna de sílica gel;

- Determinar qualitativamente por ionização em ESI (+) e (-) a composição química do óleo de copaíba bruto e frações;
- Fracionar os diterpenos presentes no óleo bruto de copaíba;
- Identificar quimicamente o óleo bruto, derivatizado e de todas as frações obtidas por GC-MS daqueles voláteis;
- Caracterizar os diterpenos ácidos por espectrometria de massas de alta resolução nas fontes eletronebulização negativa e positiva (ESI \pm FT-ICR MS);
- Determinar a estrutura através da espectrometria de massas por armadilha de íon linear (LTQ XL™ Linear Ion Trap Mass Spectrometer);
- Avaliar a atividade citotóxica frente a células de câncer gástrico (células AGS);

3. METODOLOGIA

3.1 Amostra em análise

O óleo de copaíba comercial foi adquirido no primeiro trimestre de 2021 por comércio eletrônico da empresa “*Copaíba da Amazônia*” na qual está inscrita sob o CNPJ 14.236.614/0001-81. Segundo o site da empresa (<https://www.copaibadaamazonia.com.br/oleo-de-copaiba.html>, consultado em 20/01/2022), o óleo provém da extração da *Copaifera reticulata* Ducke, planta que representa 70% da extração comercial ⁵. A empresa em questão alega a pureza e qualidade dos óleos segundo relatórios de certificações emitidos pelo laboratório Icare – MedLab.

3.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) – Parte 1

Uma primeira amostra (OC-B) de 12,2 mg do óleo de copaíba comercial foi pesada e ela foi diluída em aproximadamente 4 mL de diclorometano, a fim de se obter uma diluição de 3000 ppm para ser analisado em GC-EM. Assim, com a amostra diluída, foi injetado 1 μ l com a amostra OC-B para ser analisada no equipamento GC-MS, conforme os seguintes parâmetros cromatográficos: A análise foi realizada usando um detector Shimadzu qp-2010 e Shimadzu qp-

2010 ultra Mass, com uma coluna capilar HP 5MS (30m x 0.25 μ m x 0,35mm). O sistema CG foi usado no modo dividido (split 5:1), tendo o gás hélio usado como gás de arraste. A vazão foi ajustada para o modo constante (1.09 mL/ min). As condições de temperatura da coluna para identificação dos compostos metilados foram as seguintes: temperatura do injetor de 270 °C, temperatura inicial da coluna de 110 °C (temperatura inicial, 2 minutos), aumentando para 130 °C em 3 minutos, aumentando para 310 em 8.50 min e, finalizando o tempo total da corrida de 29.84 minutos. A detecção do MS prosseguiu no modo de impacto de elétrons. A faixa de varredura m/z foi de 50 a 700 unidades de massa atômica, que foram iniciados no tempo de 2 min. Os picos e o índice de retenção foram identificados usando o banco de dados NIST ⁸, metodologia adaptada .

3.3 Derivatização do óleo de copaíba comercial

A derivatização do óleo de copaíba comercial foi feita a partir das reações de saponificação e metilação, realizadas conforme descrito por Souza (2019) ⁸. Para a reação de saponificação, 0,1 g do óleo de copaíba comercial foi solubilizada em 5 mL de hidróxido de potássio em metanol (KOH/MeOH) 0,5M e deixado em refluxo a 40°C, por 10 minutos. Após resfriada, foi adicionado 5 mL de trifluoreto de boro em metanol (BF₃/MeOH) à solução, que novamente foi submetida a refluxo, por mais 10 minutos. A solução resultado foi resfriada e transferida para um funil de separação, juntamente com 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), sob agitação constante. Por fim, foi extraído com 20 mL de hexano por três vezes. O produto derivatizado (OC-SM), solúvel na fase hexânica, foi filtrado e concentrado, e - com auxílio de uma seringa própria para injeção manual - utilizou-se 1 μ l com a amostra para análises em CG-EM, em equipamento detector *Agilent* (condições no tópico 3.5, a seguir).

3.4 Fracionamento do óleo de copaíba comercial por cromatografia em coluna de fase estacionária sílica-gel

Um pouco do óleo de copaíba (1,0223 g) foi pesado, dissolvido em 50 mL de diclorometano P.A e transferido para um balão de fundo redondo, onde adicionou-se 100 mg de sílica-gel 70-230 mesh e 200 mL de diclorometano P.A. A mistura foi evaporada em evaporador rotativo, sob vácuo, até que, com a evaporação do solvente, se formasse uma solução sólida, comumente denominada pastilha, em cromatografia. A pastilha foi aplicada na parte superior de uma coluna de vidro (20 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro) preenchida com fase estacionária sílica-gel (10,04237 g; 70-230 Mesh) em hexano. A eluição da amostra, contida na pastilha, foi realizada com misturas de hexano, diclorometano e metanol, em quinze frações, de acordo com o gradiente de concentração estabelecido, todas com 250 mL de solvente cada uma, com exceção da 1ª que utilizou-se 500 mL do solvente, as frações foram coletadas como segue: FOC-1 com 100% n-hexano, FOC-2 (n-hex: CH₂Cl₂/9:1), FOC-3 (n-hex: CH₂Cl₂/8:2), FOC-4 (n-hex: CH₂Cl₂/7:3), FOC-5 (n-hex: CH₂Cl₂/6:4), FOC-6 (n-hex: CH₂Cl₂/5:5), FOC-7 (n-hex: CH₂Cl₂/4:6), FOC-8 (n-hex: CH₂Cl₂/3:7), FOC-9 (n-hex: CH₂Cl₂/2:8), FOC-10 (n-hex: CH₂Cl₂/1:9), FOC-11 com 100% CH₂Cl₂, FOC-12 (CH₂Cl₂: MeOH/9:1), FOC-13 (CH₂Cl₂: MeOH/8:2), FOC-14 (CH₂Cl₂: MeOH/7:3) e FOC-15 com 100% MeOH ⁹. Todas as frações (denominadas de FOC-1 a FOC-15) eluídas foram concentradas em rotaevaporador, solubilizadas em diclorometano (3000 ppm) e injetadas (1 µl de amostra de cada) para análise CG-EM e FT-ICR-ESI MS, com exceção da FOC-15 que foi analisada apenas em FT-ICR-ESI MS, nas fontes negativa (-) e positiva (+) (1 mg/mL) ²⁶.

3.5 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) - Parte 2

As amostras (1 µl de cada amostra) (OC-SM, FOC-1 à FOC-14) foram analisadas usando um detector Agilent 7890B (Agilent, Califórnia, EUA) e Agilent 5977A MSD Mass, com uma coluna capilar HP 5MS (30m x 250µm x 0,25µm). O sistema CG foi usado no modo dividido (split 40:1), tendo o gás hélio usado

como gás de arraste. A vazão foi ajustada para o modo constante (1 mL/min). As condições de temperatura da coluna para identificação dos sesquiterpenos foram as seguintes: temperatura inicial de 40 °C aumentada a 5 °C/min até alcançar a temperatura de 240 °C, que foi aumentada a 10 °C/min até atingir 310 °C, que finalmente permaneceu nesta temperatura por mais 10 minutos, finalizando o tempo total da corrida de 57 minutos. A detecção do EM prosseguiu no modo de impacto de elétrons, utilizando uma energia de ionização de 70 eV. A faixa de varredura m/z foi de 50 a 500 unidades de massa atômica. Os picos e o índice de retenção foram identificados usando o banco de dados NIST⁸. Esta metodologia foi adaptada de PEREIRA³⁶.

Após a análise nos respectivos detectores CG-EM das amostras do OC-B e OC-SM, foi realizado o cálculo do Índice de Kovats no site Pherobase e Nist (livro de química na Web) utilizando um padrão de n-alcenos de C₅ a C₄₀ sob as mesmas condições de análises da amostra, para a confirmação química das moléculas analisadas.

3.6 Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier com fonte de ionização por eletrospray (\pm ESI-FT-ICR MS)

A amostra OC-B foi analisada por FT-ICR-ESI MS, nos modos ESI (\pm), conforme os seguintes parâmetros de análise: A amostra (4 mg) foi dissolvida em 1 mL de acetonitrila e analisadas por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS). O espectrômetro de massa utilizado foi o Solarix 9,4 T (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As análises foram realizadas na fonte de eletronebulização e no modo de íons negativos e positivos, ESI (\pm), em uma faixa de massa de m/z 150–1500. As condições da fonte ESI foram as seguintes: pressão do gás nebulizador de 1,5 bar, tensão capilar de 3,0-3,5 kV e temperatura de transferência capilar de 250 °C. A acumulação de tempo de íões foi de 0,001-0,003 seg. O tempo de voo foi de 0,001 seg. Os espectros de massa ESI (\pm) FT-ICR foram adquiridos acumulando 16 varreduras de sinais transitórios no domínio do tempo em conjuntos de dados no domínio do tempo de 4 megapontos. Todos os espectros de massa foram calibrados externamente

usando Arginina (m/z de 150 a 1500). As composições elementares dos compostos foram determinadas medindo os valores de m/z e levando em conta o grau de insaturação (DBE) que para cada molécula foi determinado a partir do seu valor de DBE (Double Bond Equivalent) da equação $DBE=C H/2 + N/2 + 1$, onde C, H e N são os números de átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio. Os espectros de massa foram adquiridos e processados utilizando o pacote de software Compass Data Analysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) ²⁶.

3.7 Espectrometria de massas em “linear ion trap mass spectrometer (ESI-(-)-LTQ MS)”

Para realização das análises de fragmentação do íon pai e íons filhos (MS^n) utilizou-se (também aproximadamente 4 mg da amostra) o espectrômetro de massa LTQ XL™ (Thermo Fisher Scientific, EUA), onde as amostras foram injetadas diretamente na fonte de ESI configurada para operar no modo negativo de ionização, sob uma faixa dinâmica de aquisição de íons no analisador de m/z 180-700. Os demais parâmetros da fonte ESI foram: i) voltagem da fonte = 5 kV, ii) temperatura da fonte de 60 °C; iii) taxa do fluxo de entrada = 10 $\mu\text{L min}^{-1}$; iv) fluxo de gás auxiliar = 2; v) taxa de fluxo de gás de varredura = 0,01; vi) voltagem do capilar = -48 V; vii) temperatura capilar de entrada = 275 °C e viii) voltagem das lentes = -158 V. A calibração do equipamento foi realizada usando uma solução de CalMix LTQ Positivo sob uma faixa de massas de m/z 150-200, tempo de acumulação de íons de 0,005 s e voltagem do capilar de 4,0 kV. Os espectros de massa obtidos foram processados usando o programa Xcalibur, versão 2.2 (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) ²⁷.

3.8 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* do óleo de copaíba comercial sobre células de adenocarcinoma gástrico (AGS)

As células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) (ATCC CRL -1739) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) (Vitrocell cod. 02037, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (v/v) e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5 % de CO_2 em diferentes períodos até atingirem confluência de aproximadamente 70-90%. Após, as

células foram removidas com o auxílio de uma solução de tripsina (AGS) e contadas em câmara de Neubauer para obtenção dos valores de concentração celular. O procedimento do ensaio biológico ocorreu como segue: 200 µL de DMEM suplementado com aproximadamente 6×10^4 células/mL (AGS) foram distribuídos em microplacas de 96 orifícios para cultura de tecido e incubados a 37°C/5% CO₂ por 2h no caso dos macrófagos e 24h para células AGS. Após esse período, o meio foi removido e as células aderidas foram tratadas com diferentes concentrações das substâncias (6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL de amostra) em DMEM suplementado e incubadas por 48h a 37°C/5 % CO₂. Após incubação, as placas foram preparadas para o teste do MTT-tetrazólio (MOSMANN, 1983) ²⁸. Cisplatina foi o padrão citotóxico. Os testes foram acompanhados de crescimento controle (sem tratamento), realizados em triplicata e repetidos no mínimo 3 vezes. O resultado foi expresso em concentração inibitória média (CI₅₀) em µg/mL.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como média dos ensaios realizados com seus respectivos desvios padrão. A interpretação dos resultados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de duas vias com teste post hoc de Bonferroni, onde o nível de significância estabelecido foi de $p \leq 0,05$. A curva dose efeito (concentração x absorbância) para determinação do IC₅₀ e CE₅₀, concentração que reduz em 50% a absorbância espectrofotométrica, foi obtida a partir da análise de regressão linear e não linear. Para realização de análise de dados, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5 (versão 5,01 CA, USA, 2000) ²⁸.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil Químico do Óleo de Copaíba Bruto

O óleo de copaíba comercial foi inicialmente analisado por CG-EM, sem derivação química, visando identificar a composição volátil (sesquiterpenos) característica do gênero *Copaifera*. Conforme mostrado na Figura 8, para a amostra OC-B, é possível observar um comportamento diferente dos picos no cromatograma, verificando-se a presença de picos intensos entre os tempos de retenção 8.685 min e 12.637 min, sendo característicos de sesquiterpenos

(Tabela 1) ²⁹. A presença destes compostos foi confirmada mediante ao cálculo do Índice de Kovats (Tabela 1), utilizando uma amostra padrão de n-alcenos (C₅-C₄₀) para comparação, que se deu por meio do banco de dados do Pherobase e na Nist.

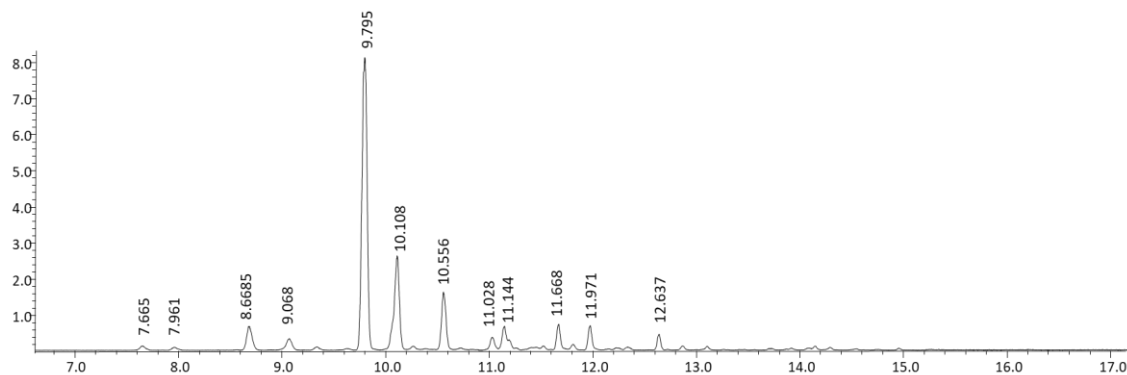


Figura 8. Cromatograma CG-EM do óleo de copaíba comercial.

Tabela 1. Composição química determinada por CG-EM do óleo bruto de copaíba.

No.	RT ^a	Compostos	RI _{Teo} ^b	RI _{Exp} ^c	% ^d
1	7.655	3-Isopropenyl-1-isopropyl-4-methyl-4-vinyl-1-cyclohexene	1337	1338	0.70
2	7.961	α -Cubebene	1351	1350	0.47
3	8.685	Copaene	1379	1379	4.28
4	9.068	β -elemene	1395	1394	2.18
5	9.335	α -Gurgujene	1418	1405	0.55
6	9.630	β -cedrene	1418	1418	0.22
7	9.795	Caryophyllene	1426	1426	49.42
8	10.108	α -trans-bergamotene	1434	1439	16.22
9	10.261	ND	ND	1446	0.46
10	10.556	ND	ND	1459	8.30
11	10.724	alloaromadendrene	1465	1466	0.20
12	11.028	α -amorphene	1485	1480	1.66
13	11.144	germacrene D	1485	1485	3.78
14	11.518	α -Muurolene	1505	1502	0.36
15	11.668	ND	ND	1510	3.09
16	11.806	Naphthalene,1,2,4a,5,8,8 α -hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-,[1S-(1 α ,4 $\alpha\beta$,8 $\alpha\alpha$)]	1518	1517	0.62
17	11.971	β -bisabolene	1509	1526	3.07

18	12.227	γ -muurolene	1502	1540	0.34
19	12.336	β -Cadinene	1520	1546	0.39
20	12.637	germacrene B	1560	1562	1.74
21	12.865	caryophyllene alcohol	1572	1574	0.51
22	13.105	caryophyllene oxide	1581	1587	0.41
23	13.921	ND	ND	1635	0.12
24	14.147	γ -Cadinol	1646	1649	0.26
25	14.289	α -cadinol	1653	1658	0.25
26	14.958	Eudesm-7(11)-en-4-ol	1700	1700	0.19
27	22.361	ND	ND	2319	0.21

O β -cariofileno (Tr 9. 795 min) foi o principal pico para a amostra OC-B, sendo que este sesquiterpeno é considerado um dos principais marcadores químicos do óleo extraído das plantas do gênero *Copaifera* ²⁹. Com este resultado é plausível observar esta similaridade a da família *Copaifera*, dado que Veiga Junior e colaboradores ⁵ o encontraram como substância majoritária em três espécies diferentes de *Copaifera*. Esse componente se destaca no quesito medicinal, posto que, como exemplo de estudos pré-clínicos têm mostrado que o β -cariofileno (com presença de 49,42% na amostra) como um modulador do sistema nervoso, sendo considerado um fitocanabinoide seletivo (CB2-R), exercendo efeitos benéficos sobre numerosas patologias neurodegenerativas e inflamatórias ⁵. Além disso, ele é capaz de atuar sobre fígado e ossos e ter propriedades antibióticas e anticancerígenas ³⁰.

O terceiro composto majoritário identificado e determinado na amostra, o α -*Copaene* (4.28%), já apresentou capacidade antioxidante de células *in vitro* e não causou o aumento do estresse oxidativo em culturas de células de sangue humanas (especificamente, linfócitos) ³¹. É interessante salientar que o resultado também exhibe a presença o *trans*- α -bergamoteno, γ -elemeno e óxido de cariofileno, também largamente presentes no gênero ⁵, com 16.22, 2.18, 0.41 %, respectivamente na amostra; assim como o β -bisaboleno dentre os compostos na amostra do óleo de copaiba, o que corroboram com os resultados obtidos feitos por Pereira ²², que detectou a presença destes compostos nos primeiros minutos de corrida, tendo em vista a baixa polaridade destes compostos, que pertencem a classe dos sesquiterpenos.

4.2 Perfil químico do Óleo de Copaíba derivatizado

A fim de aumentar a volatilidade de moléculas como os diterpenos, que possuem grupamentos ácidos, tendo em vista que o óleo de copaíba os contém, - e, que também é descrito na literatura como sendo rico em mistura de sesquiterpenos, diterpenos e ácidos graxos ²⁶ - foi realizada a derivatização por metilação (esterificação) com BF_3/MeOH ²⁹, essa reação aumenta a volatilidade da molécula por meio da substituição de um grupamento. Com o objetivo de

obter a hidrólise de possíveis ésteres (triacilgliceróis), quanto a formação de carboxilatos que são mais reativos à metilação, quando comparados aos ácidos carboxílicos, realizou-se a prévia saponificação e, com este resultado, o produto obtido desta reação foi analisado por CG-EM. A Figura 9 mostra este cromatograma obtido por CG-EM.

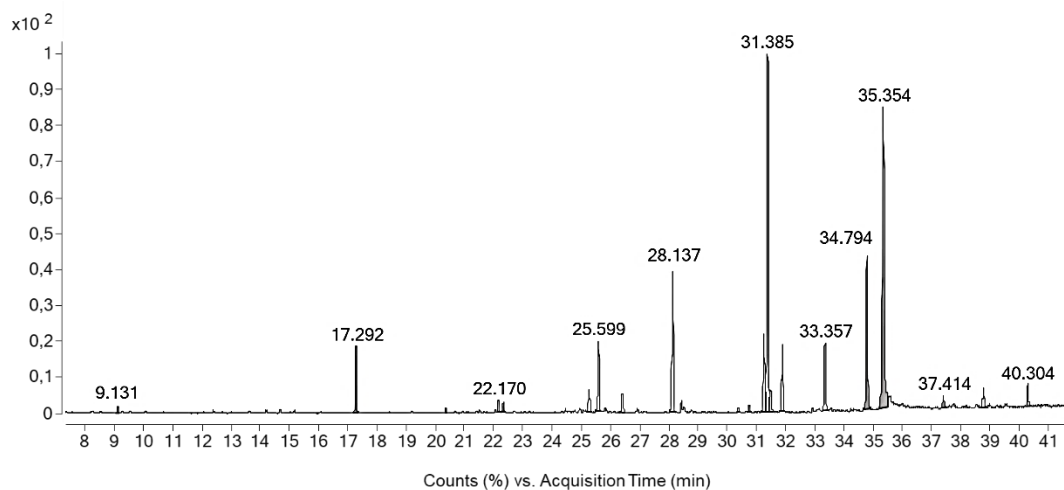


Figura 9. Cromatograma CG-EM do óleo de copaíba comercial saponificado e metilado

Já cientes e conhecendo a possibilidade de que a reação de saponificação e metilação levaria a gerar ésteres diterpênicos, cada estrutura resultante no cromatograma foi comparado com a biblioteca Nist pertencente ao equipamento que possui seu espectro de massas e a realização do índice de Kovats para comparação com moléculas que já foram isoladas na literatura, conforme a Tabela 2. É interessante destacar a presença de ácidos diterpênicos e seus ésteres metílicos (Figura 9), nos tempos de retenção acima de 30 min, com destaques para o éster metílico do ácido labda-(8,20)-en-15-óico em 33,35 min, o éster metílico do ácido copálico (copalato de metila) em 34,79 min e o ácido copálico em 35,35 min, pois, na qual, para a comprovação da existência da ligação dupla exocíclica nos carbonos 8,20, diferenciando das estruturas isoméricas com dupla endocíclica (C-7-C-8) ¹ foi realizada a observação através dos seus espectros de massas gerados pelo acoplamento ao GC (Figura 10).

Outro ponto importante a ser destacado é o fato de que o processo de metilação com BF₃/MeOH não foi completo para a amostra utilizada com o óleo

de copaíba comercial, visto que o sinal do ácido copálico foi mais intenso que o do copalato de metila. Seus espectros de massas são bem característicos, também conforme mostra a Figura 11. Dessa forma, para OC-SM foi observado a presença de ésteres metílicos de ácidos graxos e de diterpenos e para o OC-B, os majoritários foram os sesquiterpenos.

Tabela 2. Composição química determinada por CG-EM do óleo bruto saponificado e metilado.

No.	RT ^a	Constituintes	RI _{Teo} ^b	RI _{Exp} ^c	% ^d
1	9.131	Octanoic acid, methyl ester	1126	1108	0.32
2	17.292	Nonanoic acid, 9-oxo-, methyl ester	1436	1417	3.65
3	22.170	Torreyol	1618	1621	0.65
4	22.336	α -Cadinol	1620	1625	0.59
5	25.267	Isoaromadendrene epoxide	1612	1692	1.54
6	25.599	NI	NI	1700	4.40
7	26.414	NI	NI	1820	1.30
8	28.137	Hexadecanoic acid, methyl ester	1894	1864	8.82
9	30.383	NI	NI	2023	0.31
10	30.767	NI	NI	2033	0.53
11	31.260	methyl 9,10-octadecadienoate	2075	2047	5.24
12	31.385	9,12-octadecadienoic acid, methyl ester, (E)-	2103	2050	23.33
13	31.489	NI	NI	2053	1.52
14	31.888	Methyl stearate	2140	2064	4.33
15	33.357	NI	NI	2205	4.51
16	34.794	Methyl Copalate	2312	2248	10.24
17	35.354	(+)-Copaiferic acid	NI	2265	25.16
18	37.414	NI	NI	2429	0.69

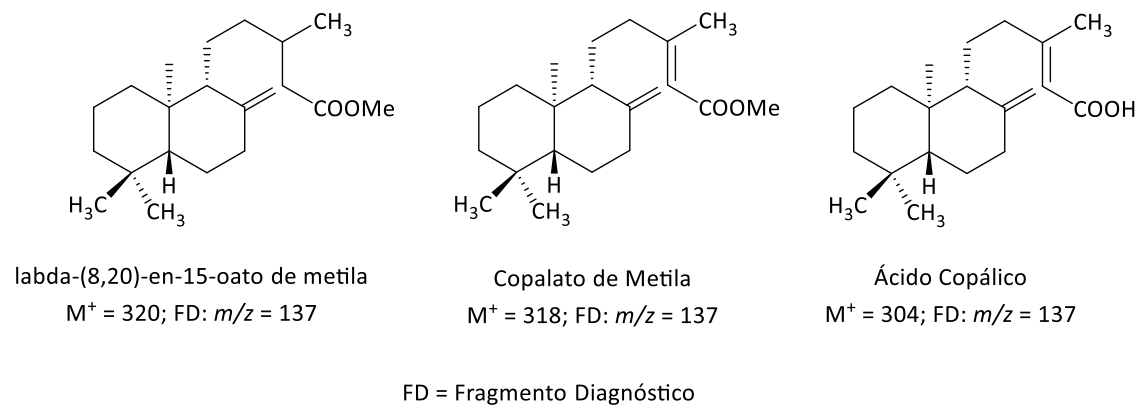


Figura 10. Ésteres metílicos de diterpenos encontrados no OC-SM por CG-EM.

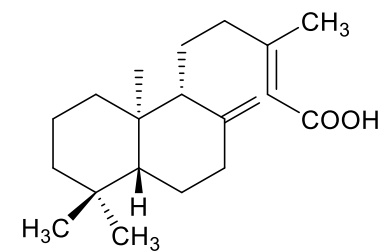
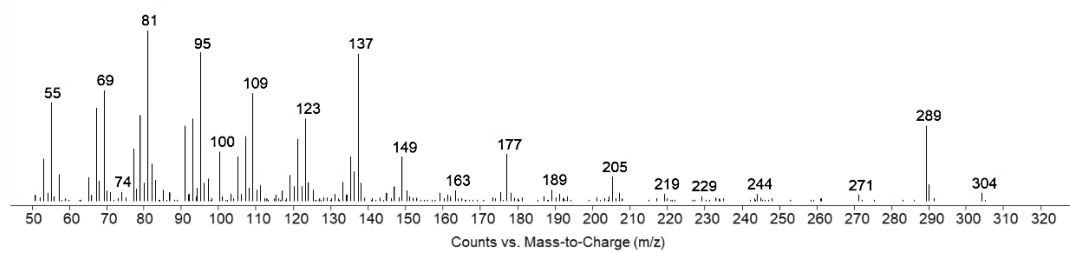
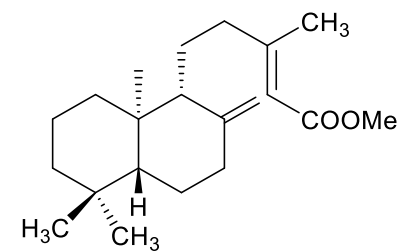
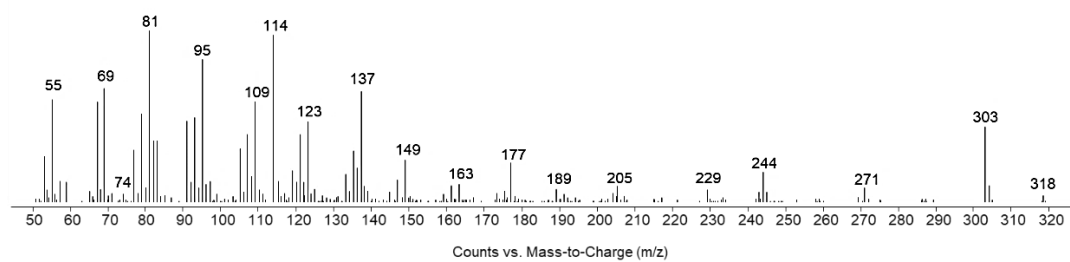
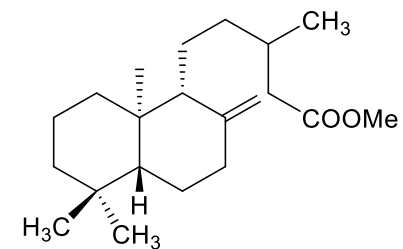
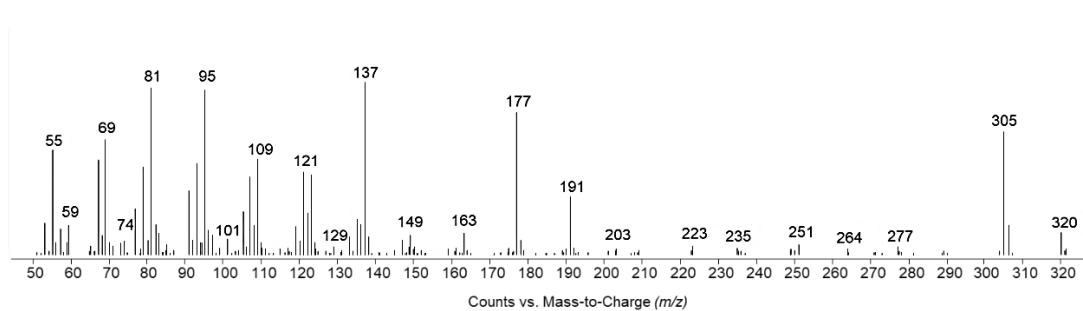


Figura 11. Espectros de massas obtidos por GC-MS dos diterpenos labda-(8,20)-en-15-oato de metila, copalato de metila e ácido copálico

4.3 Fracionamento do óleo em coluna de sílica gel para identificação dos compostos minoritários

Quinze frações foram obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel. Nas primeiras frações foi possível observar a presença de sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, que anteriormente foi descrito na amostra de OC-B, como: Copaeno, Humuleno, Aromandendreno, Bisaboleno, Óxido de Cariofileno. O composto Copalato de Metila concentrou em grande quantidade na fração FOC-2, no tR 34.794 min (Figura 12a), enquanto o Ácido Copálico se concentrou nas frações FOC-4 e FOC-5, no tR 35.406 e tR 35.370 min (Figura 12b e 12c), devido a maior polaridade da fase móvel da qual a fração foi eluída³².

Por sua vez, diácidos que são descritos na literatura presentes no óleo de copaíba (exemplo, Ácido Agático), não puderam ser observados nem mesmo nas frações mais polares (Frações FOC-9 e FOC-11 (Figura 13a, 13b)), sendo que o Ácido Agático é o diterpeno de maior abundância no gênero²⁵.

Nas frações não citadas no texto, referentes as frações onde possuíram solventes de maior polaridade, não tiveram a presença de compostos de relevância para o estudo em questão, sendo os picos remanescentes referentes a possíveis impurezas. Este resultado comprova-se que a cromatografia em coluna de fase normal não é uma técnica eficaz para fracionamento dos diterpenos, nem tão pouco para diterpenos diácidos, os quais, em sua maioria, ficaram retidos na fase estacionária^{32,33}. Tendo em vista que separação e análise do perfil de cada fração é interessante, pois compostos como o Ácido Copálico, já possuem resultados como tendo forte atividade antibacteriana²⁵. Por este motivo, pôde também se confirmar que cromatografia em coluna de fase reversa, como mostrado por Santos e Colaboradores (2020) tem melhores resultados, pois os compostos foram mais bem fracionados³⁴.

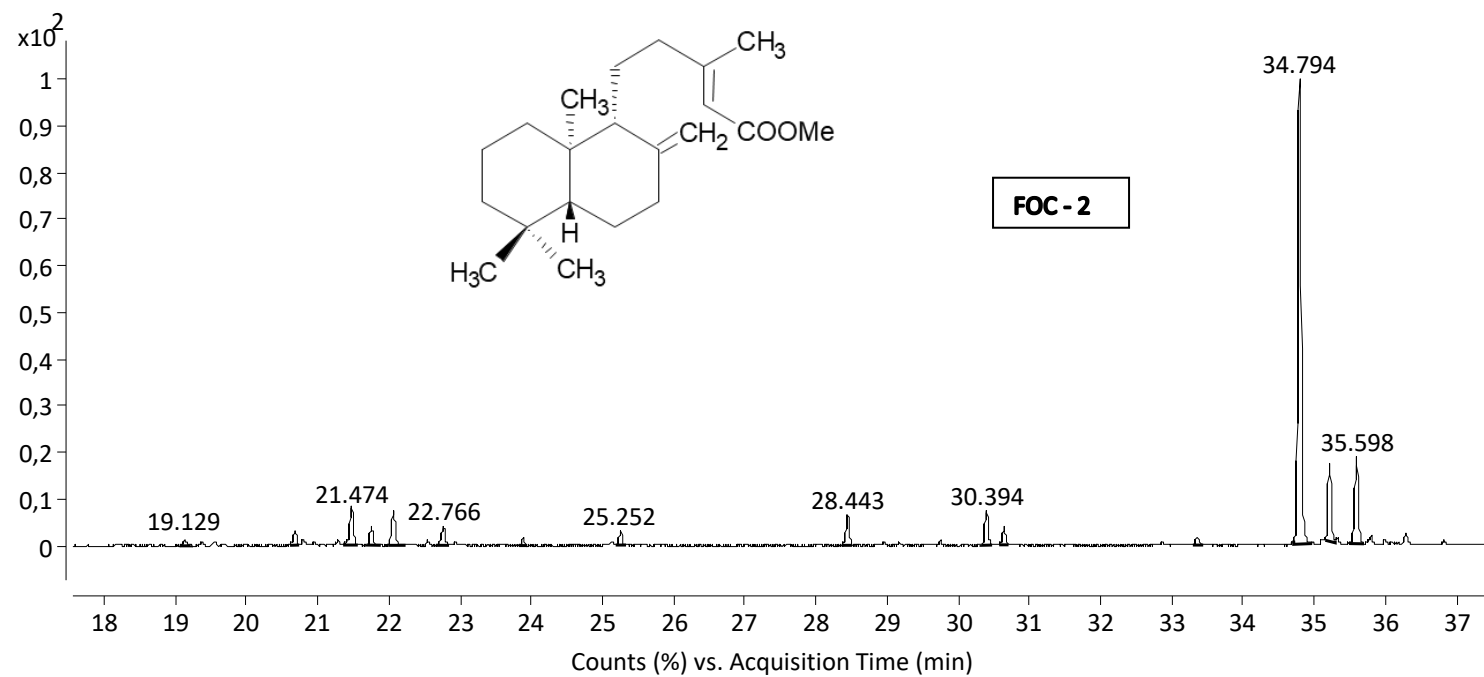


Figura 12a. Copalato de metila na fração FOC-2 da cromatografia em coluna de OC-B

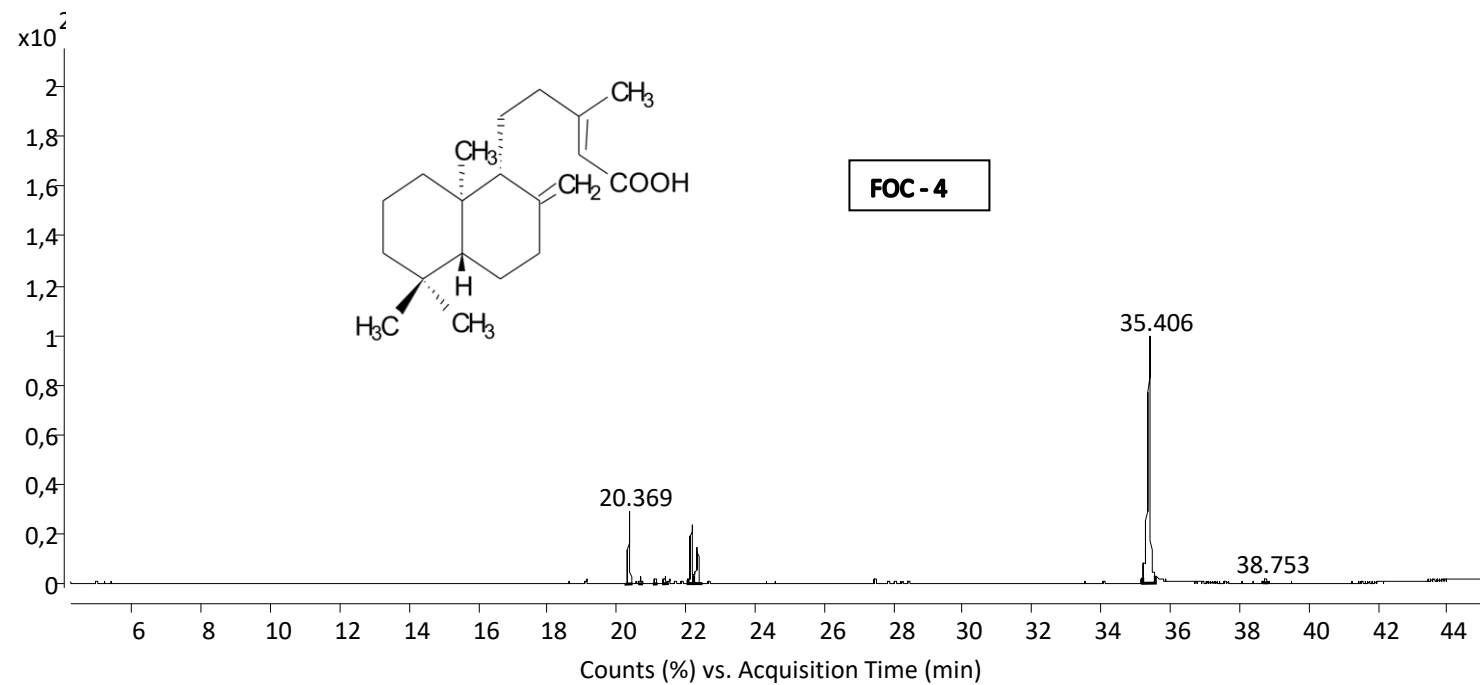


Figura 12b. Ácido Copálico na fração FOC-4 da cromatografia em coluna de OC-B

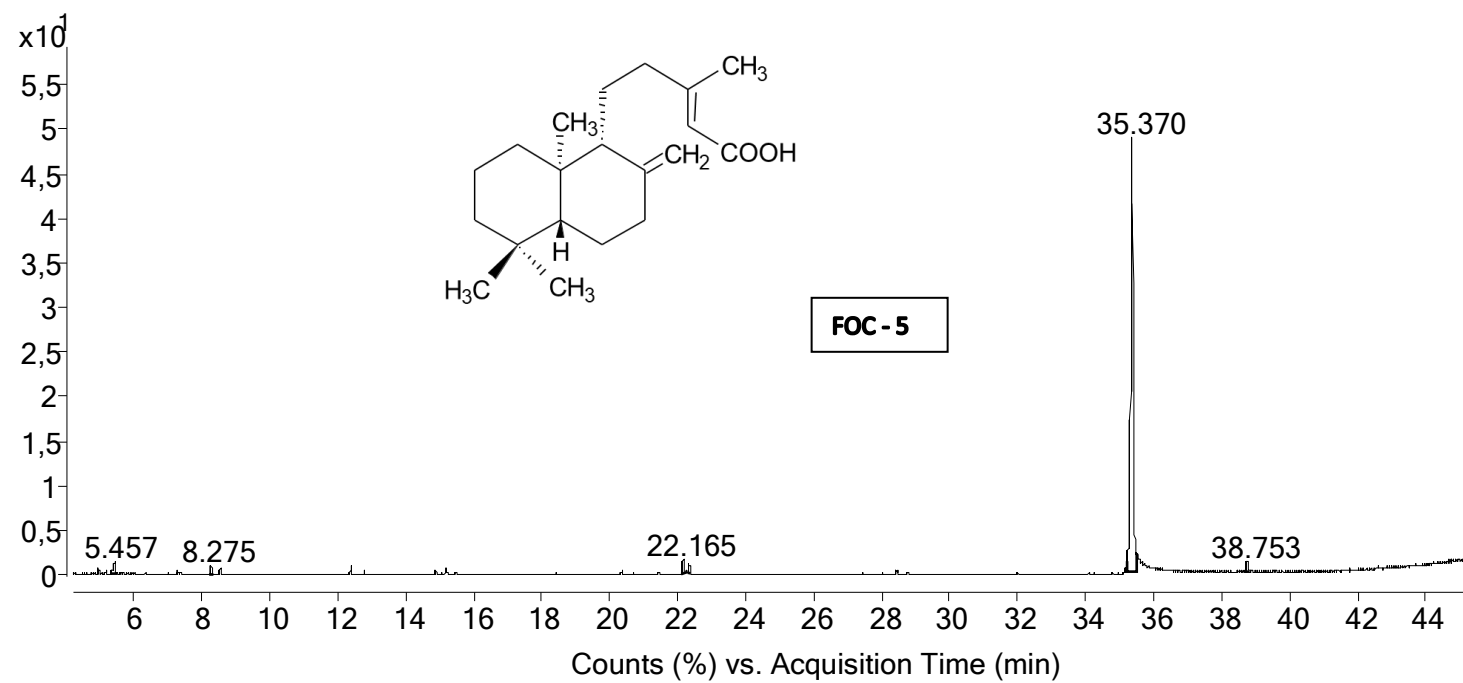


Figura 12c. Ácido Copálico na fração FOC-5 da cromatografia em coluna de OC-B

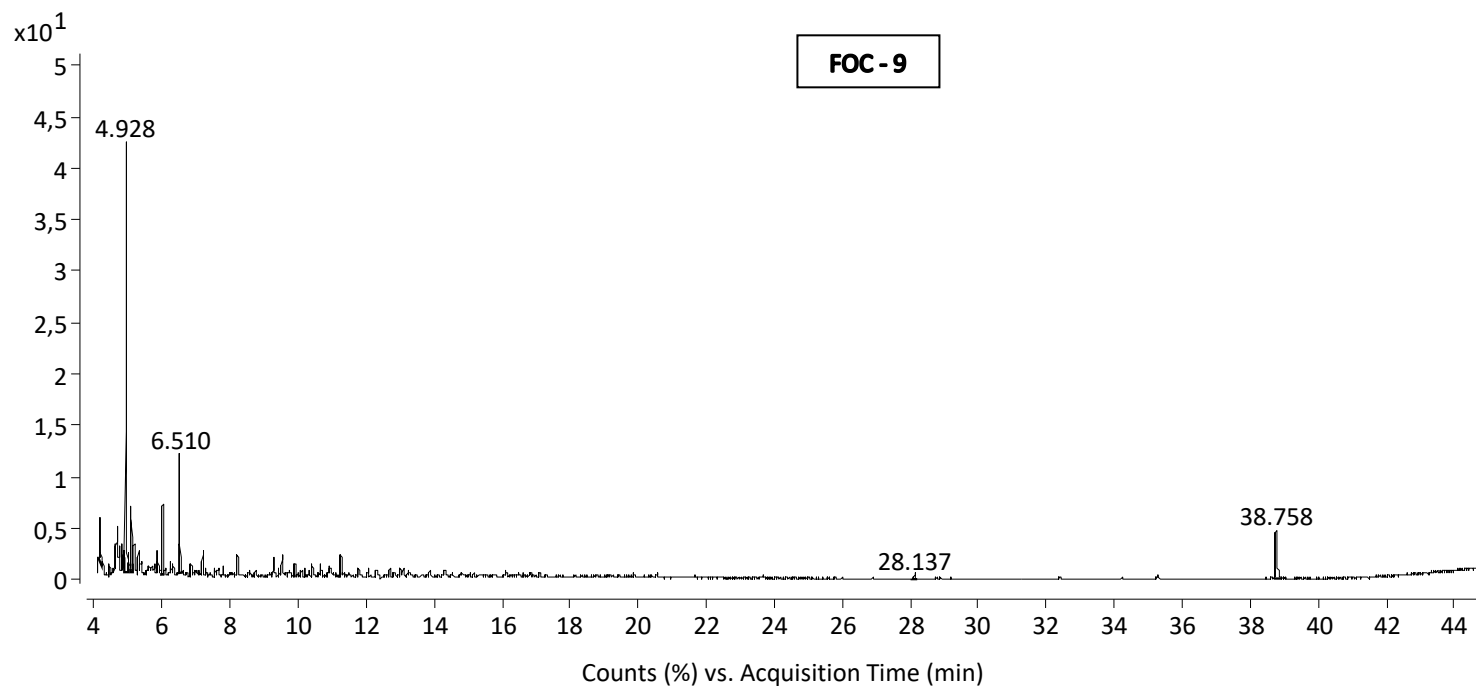


Figura 13a. Cromatogramas das frações FOC-9 da cromatografia em coluna de OC-B

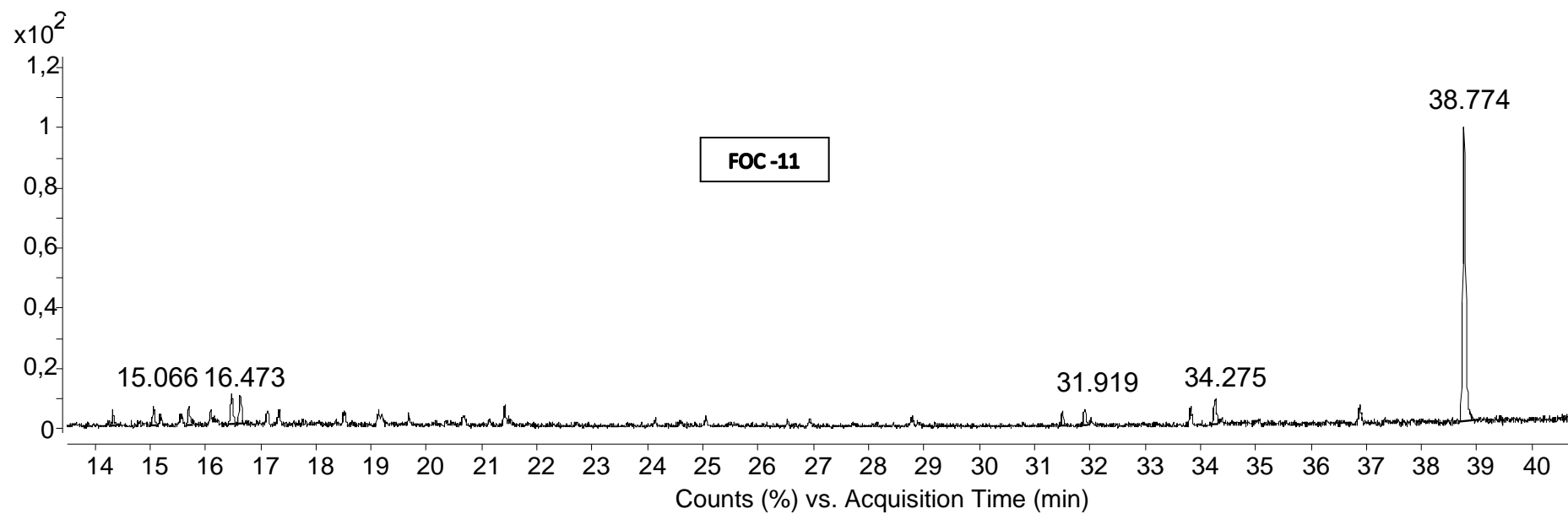


Figura 13b. Cromatogramas das frações FOC-11 da cromatografia em coluna de OC-B

4.4. Perfil químico do óleo de copaíba bruto por FT-ICR-MS e ESI (-) LTQ MS

Com o objetivo de melhorar a identificação dos compostos, nos quais não foram voláteis pela técnica CG-EM uma amostra do óleo de copaíba, OC-B, (a mesma analisada no GC-EM) foi submetida a análise FT-ICR-ESI MS nos modos positivo e negativo - a Figura 14 abaixo mostra os espectros de massas em ambas as fontes gerados pela técnica -, para que houvesse a determinação da fórmula exata (baixos desvios de massa).

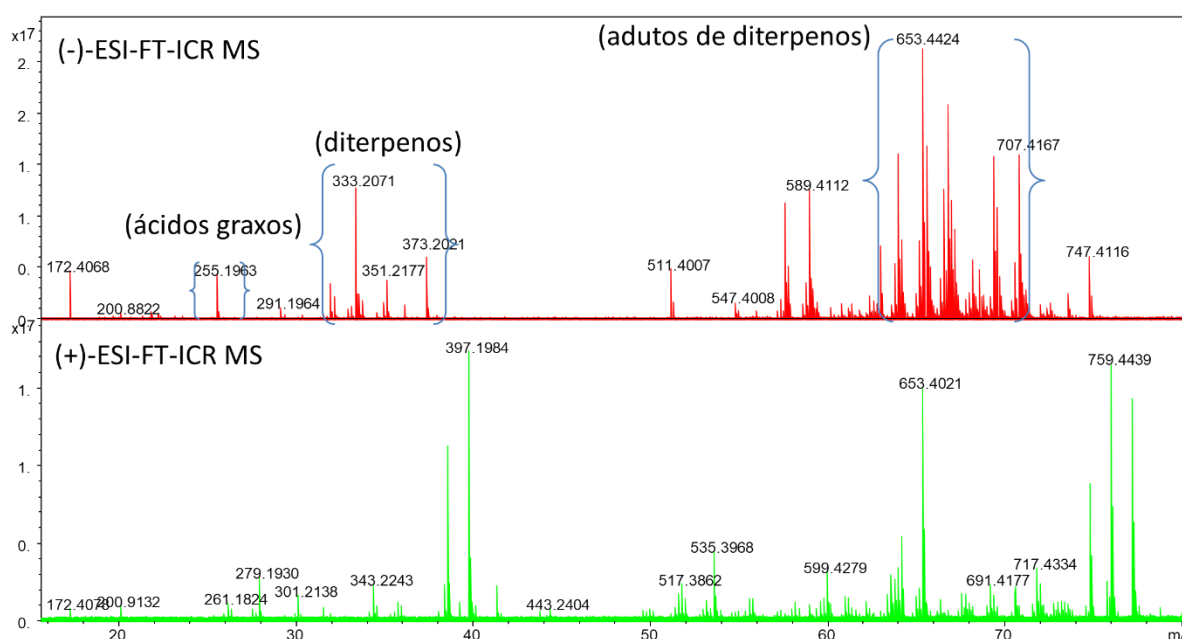


Figura 14. Espectros de massas FT-ICR MS nas fontes eletronebulização (ESI) negativo e positivo

A partir destes espectros gerados pode ser levado a elaboração da Tabela 3 a seguir, que mostra a presença de classes de substâncias ionizadas no modo positivo ($[M+H]^+$ ou $[M+Na]^+$), das quais já eram supostamente esperados por meio da literatura nessa amostra, como por exemplo os sesquiterpenos oxigenados, e outras ionizadas no modo negativo ($[M-H]^-$) como os ácidos diterpênicos e ácidos graxos. Os ácidos diterpênicos também identificaram íons moleculares adutos de cloro ($[M+Cl]^-$), este resultado leva a demonstração da eficiência da técnica quanto a identificação de compostos com maior peso

molecular e polaridade^{32,33}. Com isso, já se nota que as duas técnicas analíticas (CG-EM e FT-ICR-ESI MS) aqui apresentadas, se mostraram complementares, fornecendo informações para o melhor resultado para identificação do perfil químico da amostra³⁵. Ao observar os resultados apresentados na Tabela 3, também é possível notar uma maior variedade de estruturas diterpênicas, quando comparadas às outras duas classes (sesquiterpenos oxigenados e ácidos graxos); essa conferência ocorreu mediante a identificação das fórmulas moleculares a partir da comparação entre as fórmulas moleculares geradas no espectro com os resultados dos estudos na literatura referente à dos compostos isolados do gênero *Copaifera*, como descreve na Tabela 3.

Tabela 3. Estruturas propostas para sesquiterpenos oxigenados, ácidos diterpênicos, ácidos graxos e diterpenos ionizados com ESI (-) e (+) como íons [M-H]⁻, [M-H]⁺ e [M+Na]⁺.

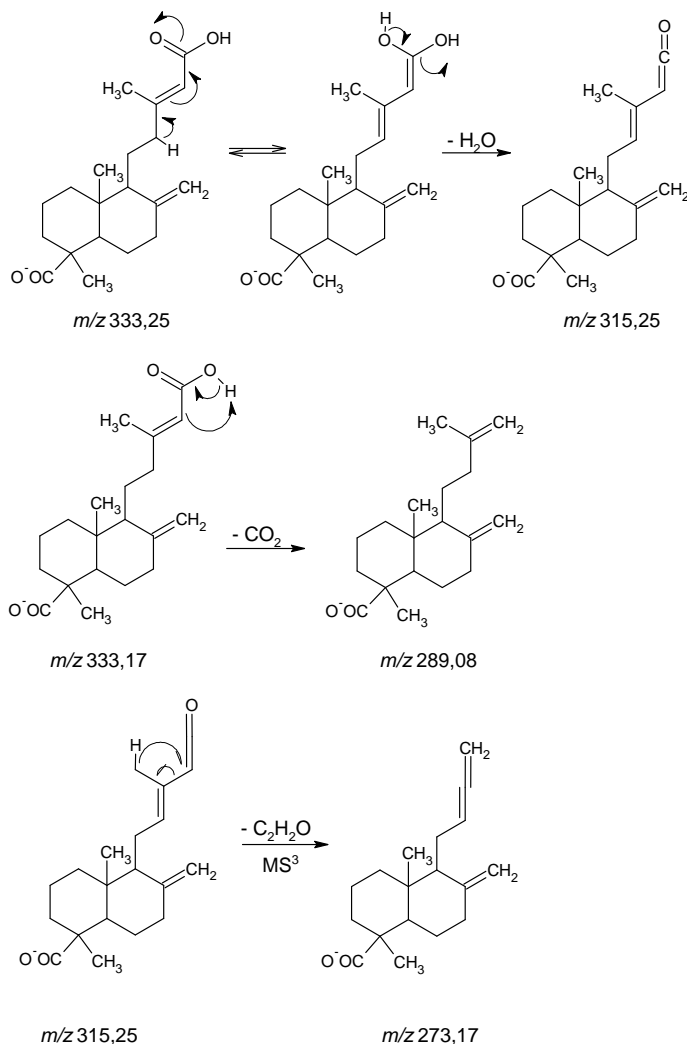
Diterpenos	[M-H] ⁻	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺	Fórmula Molecular	DBE	Desvio (ppm)
Diterpenos Ácidos					
Ácido copálico	303.2328		C ₂₀ H ₃₁ O ₂	5,5	0,51
Ácido hardwickiico	315.19658		C ₂₀ H ₂₇ O ₃	7,5	-0,05
Ácido 3-hidroxicopálico	319.22793		C ₂₀ H ₃₁ O ₃	5,5	-0,20
Ácido 3-hidroxiabdan-8(17)-en-15-oico	321.24366		C ₂₀ H ₃₃ O ₃	4,5	-0,44
Ácido 7-hidroxihardwickiico	331.19163		C ₂₀ H ₂₇ O ₄	7,5	-0,45
Ácido agático	333.20724		C ₂₀ H ₂₉ O ₄	6,5	-0,31
Ácido pinifólico	335.2229		C ₂₀ H ₃₁ O ₄	5,5	-0,35
Tetrahydroagathic acid (ácido Labdan-15,19-óico)	337.23861		C ₂₀ H ₃₃ O ₄	4,5	-0,52
Aduto de cloro do ácido copálico	339.2097		C ₂₀ H ₃₂ ClO ₂	4,5	-0,20
Aduto de Na do Ácido 3-hidroxicopálico		343.22436	C ₂₀ H ₃₂ NaO ₃	4,5	0,01
Aduto de sódio do Ácido 3-hidroxiabdan-8(17)-en-15-oico		345.23998	C ₂₀ H ₃₄ NaO ₃	3,5	0,11
Aduto de sódio do ácido hidroxihardwickiico		355.18796	C ₂₀ H ₂₈ NaO ₄	6,5	0,06
Aduto de sódio do ácido agático		357.20363	C ₂₀ H ₃₀ NaO ₄	5,5	-0,01
Ácido 3-acetoxicopálico	361.2387		C ₂₂ H ₃₃ O ₄	6,5	-0,73
Ácido 7-acetoxihardwickiico	373.20229		C ₂₂ H ₂₉ O ₅	8,5	-0,64
Aduto de sódio do Ácido 3-acetoxicopálico		385.23488	C ₂₂ H ₃₄ NaO ₄	5,5	0,12
Aduto de sódio do Ácido 7-acetoxihardwickiico		397.19849	C ₂₂ H ₃₀ NaO ₅	7,5	0,13
Aduto do ácido 3-hidroxicopálico	639,46323		C ₄₀ H ₆₃ O ₆	9,5	-1,16
Aduto do ácido agático com o ácido 3-hidroxicopálico	653,44242		C ₄₀ H ₆₁ O ₇	10,5	-0,71
Aduto do ácido pinifólico com o ácido 3-hidroxicopálico	655,45818		C ₄₀ H ₆₃ O ₇	9,5	-1,01
Aduto do ácido 7-hidroxihardwickiico com o ácido agático	665,40619		C ₄₀ H ₅₇ O ₈	12,5	-0,98
Aduto do ácido agático	667,42168		C ₄₀ H ₅₉ O ₈	11,5	-0,71
Aduto do ácido agático com o ácido pinifólico	669,43745		C ₄₀ H ₆₁ O ₈	10,5	-1,04

Como expostos na Figura 14 anteriormente, e identificados na Tabela 3 logo acima, a presença de adutos diterpênicos $[2M - H]^-$ é digno de nota, por apresentar os sinais mais intensos do espectro de massas ESI negativo (FT-ICR MS). Este fato induz a hipótese da capacidade de associação entre essas moléculas, possivelmente por ligações hidrogênio intermoleculares dos ácidos carboxílicos.

No FT-ICR MS, na fonte ESI (-) foi possível notar o íon $[M-H]^-$ 333.20711 ($C_{20}H_{29}O_4$), (intensidade 48,41%), identificado como sendo o ácido *ent*-agático, que por sua vez é o diterpeno de maior intensidade deste produto comercial e, que também foi identificado também no estudo de Pereira ³⁶ no óleo de copaíba e também nos estudos de Oliveira e colaboradores ²⁵. A observação deste composto na amostra se torna um resultado satisfatório devido ao destaque frente as atividades biológicas, como, antileishmanial e anti-trypanosoma e, que também é encontrado na composição química de diversas espécies do gênero *Copaifera* ³⁷. O seu aducto dimérico ($C_{40}H_{59}O_8$), com 79,24% de intensidade, íon $[2M-H]^-$ 667.42168, também foi produzido pela técnica, sendo o diterpeno majoritário desse produto comercial.

Com isso, foram pelos motivos de notar a presença e a importância deste composto, foi que levou o ácido agático a ser selecionado para experimento de fragmentação múltipla (MS^n) pela análise de óleo de copaíba em ESI(-)-LTQ MS. Ao realizar a fragmentação múltipla, duas fragmentações importantes, as perdas de H_2O (íon 315,15) e de CO_2 (íon 289,08) puderam ser mostradas a partir do íon molecular (MS^2), conforme o Figura 15.

Figura 15. Fragmentações sequenciais (MS² e MS³) para o ácido agático



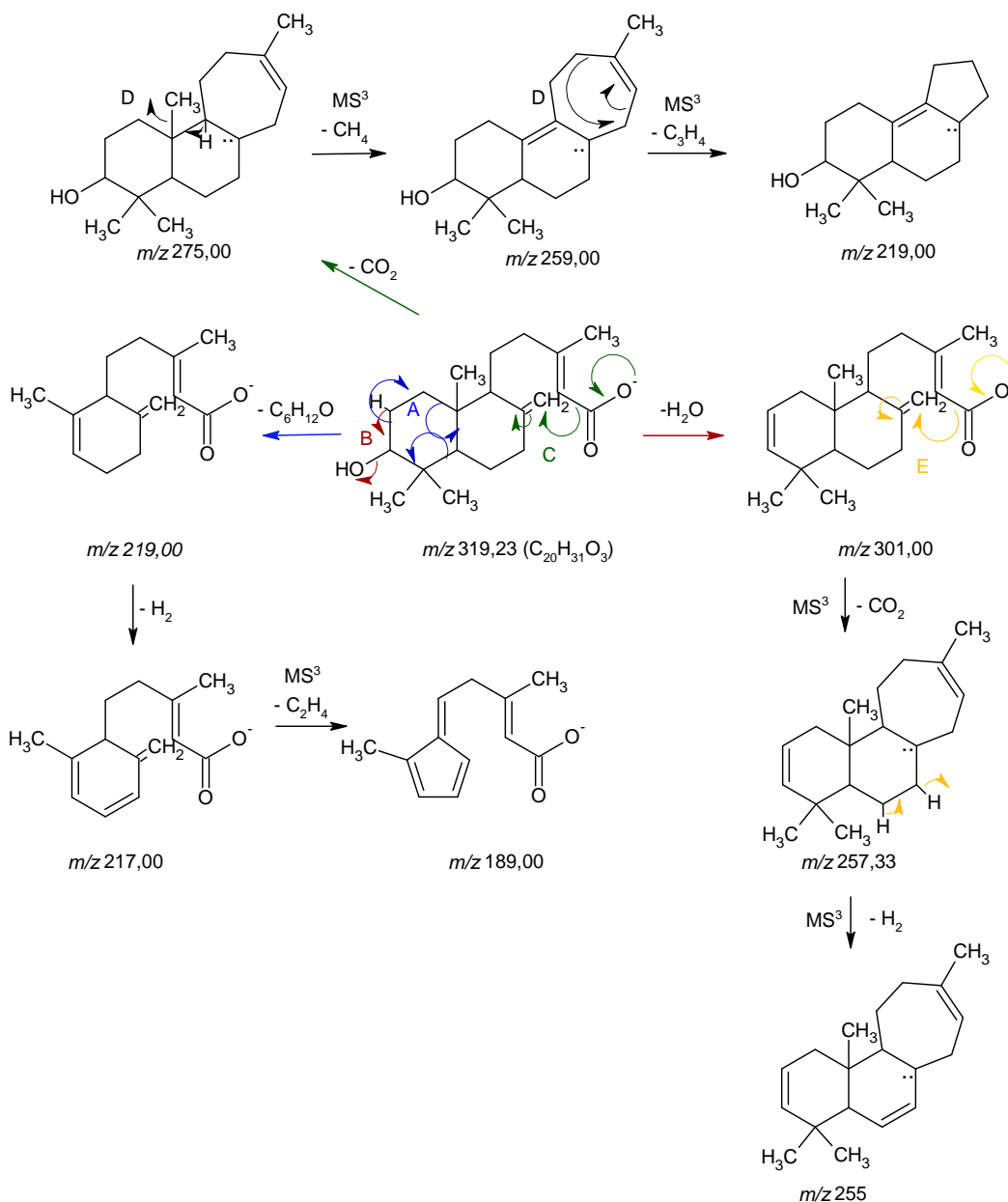
Uma tautomeria do íon molecular, seguida de perda de água, é uma hipótese para a formação do íon 315,15, bem como descarboxilação da carboxila na vizinhança do grupo vinila é uma hipótese para a formação do íon 289,08. De fato, a planaridade entre os grupos vinila e carboxila é importante no mecanismo da descarboxilação. Um experimento ms^3 realizado pela seleção do fragmento base, 315,15, a partir do espectro de massas ms^2 , mostrou a perda de C_2H_2O como hipótese para o fragmento 273,17 (Figura 15). O ácido agático foi também identificado por ESI (+) como o aduto de sódio em m/z 357.20363 ($C_{20}H_{30}NaO_4$).

Outro diterpeno de interesse no gênero *Copaifera* é o ácido copálico ($[M-H]^-$ 303.2328 - $C_{20}H_{31}O_2$), também presente em *Copaifera reticulata*³¹. Mauro *et al.* avaliaram o processo de fragmentação desta substância, quando ionizada por fonte ESI (-), e propuseram um mecanismo de fragmentação que conduziram

aos fragmentos m/z 285 (perda de H_2O), 259 (descarboxilação) e 99 (pico base, $C_5H_7O_2$, 3-metilcrotonato) ³¹. Foi encontrado os mesmos fragmentos, o que confirma a substância e propusemos novas fragmentações (Anexo, Figura 3, p. 72).

Três derivados do ácido copálico, também presentes em *Copaifera reticulata*, foram identificados por ESI(-)-LTQ MSⁿ, os ácidos 3-hidroxicopálico, 3-hidroxilabdan-8(17)-en-15-óico e o 3-acetoxicopálico ³⁸. A fragmentação MS² do ácido 3-hidroxicopálico ($C_{20}H_{31}O_3$ m/z 319.22793) levou aos fragmentos m/z 301,00 ($[M-H]^- - H_2O$), 275,33 ($[M-H]^- - CO_2$), 219,00 ($[M-H]^- - C_6H_{12}O$) e 217 ($[M-H]^- - C_6H_{12}O - H_2$), cuja proposta de fragmentação é mostrada na Figura 16.

Figura 16. Fragmentações sequenciais (MS² e MS³) para o ácido 3-hidroxipópálico

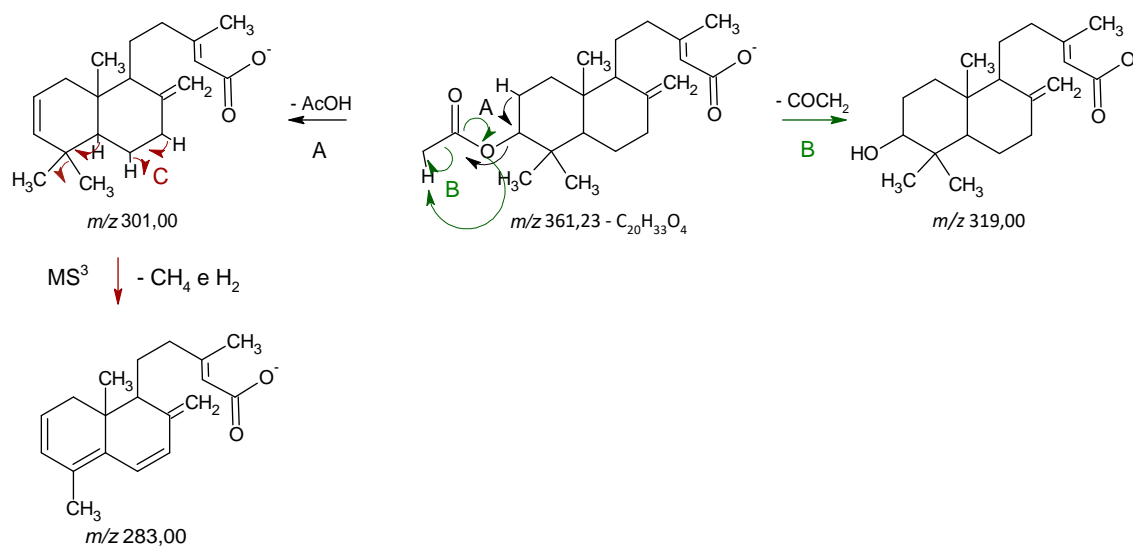


Os fragmentos *m/z* 219 e 217 foram os mais intensos e surgiram a partir da fragmentação do anel ciclohexânico, o qual contém o grupo hidroxila da função álcool (via A, Figura 16). A desidratação do ácido 3-hidroxipópálico forneceu o íon *m/z* 301 (via B, Figura 16). Já a descarboxilação dele forneceu o fragmento 275 (via C, Figura 16), o qual, quando analisado em MS³, perdeu metano e C₃H₄ para fornecer os ânions alílicos *m/z* 259 e 219 (via D, Figura 16). A via E, semelhante a D, é uma hipótese para os fragmentos *m/z* 257 e 255 originados a partir do MS³ do íon *m/z* 301.

Se sabe que o ácido 3-hidroxiabdan-8,17-en-15-óico é o derivado reduzido na ligação dupla C-13,14 do ácido 3-hidroxicopálico. O íon quasimolecular $[M-H]^-$ 321.24366, de fórmula exata $C_{20}H_{33}O_3$, após fragmentação MS^2 , forneceu o íon m/z 303 (perda de H_2O), como pico base, comprovando a presença de função álcool e os fragmentos m/z 277 (perda de CO_2) e 275 (perda de H_2 a partir de 277) originados da descarboxilação do íon quasimolecular, comprovando a presença de ácido carboxílico. O íon m/z 303, por sua vez, ao ser fragmentado (MS^3) perde CH_4 na vizinhança da dupla originada por desidratação, originando o fragmento m/z 287, o qual perde sucessivamente $2H_2$ para originar os íons 285 e 283 de duplas conjugadas.

Experimento MS^3 foi também realizado com o íon m/z 277, o qual também perdeu CH_4 para originar o ânion alílico m/z 261. Todas as fragmentações são semelhantes às descritas na Figura 16 para o ácido 3-hidroxicopálico, exceto que, com a ausência da dupla nos carbonos 13 e 14, houve a perda de H_2 destes carbonos saturados para formar o fragmento m/z 275 a partir de m/z 277, o que não ocorreu para o ácido 3-hidroxicopálico (Anexo, Figura 5, p. 72). O ácido 3-acetoxicopálico ($[M-H]^-$ 361.2387, $C_{22}H_{33}O_4$) é o derivado acetilado do ácido 3-hidroxicopálico. Ao ser fragmentado, houve a formação do fragmento base m/z 301, devido a perda de ácido acético (Figura 17, via A). Este é o mesmo íon originado da desidratação do ácido 3-hidroxicopálico.

Figura 17. Fragmentações sequenciais (MS^2 e MS^3) para o ácido 3-acetoxicopálico

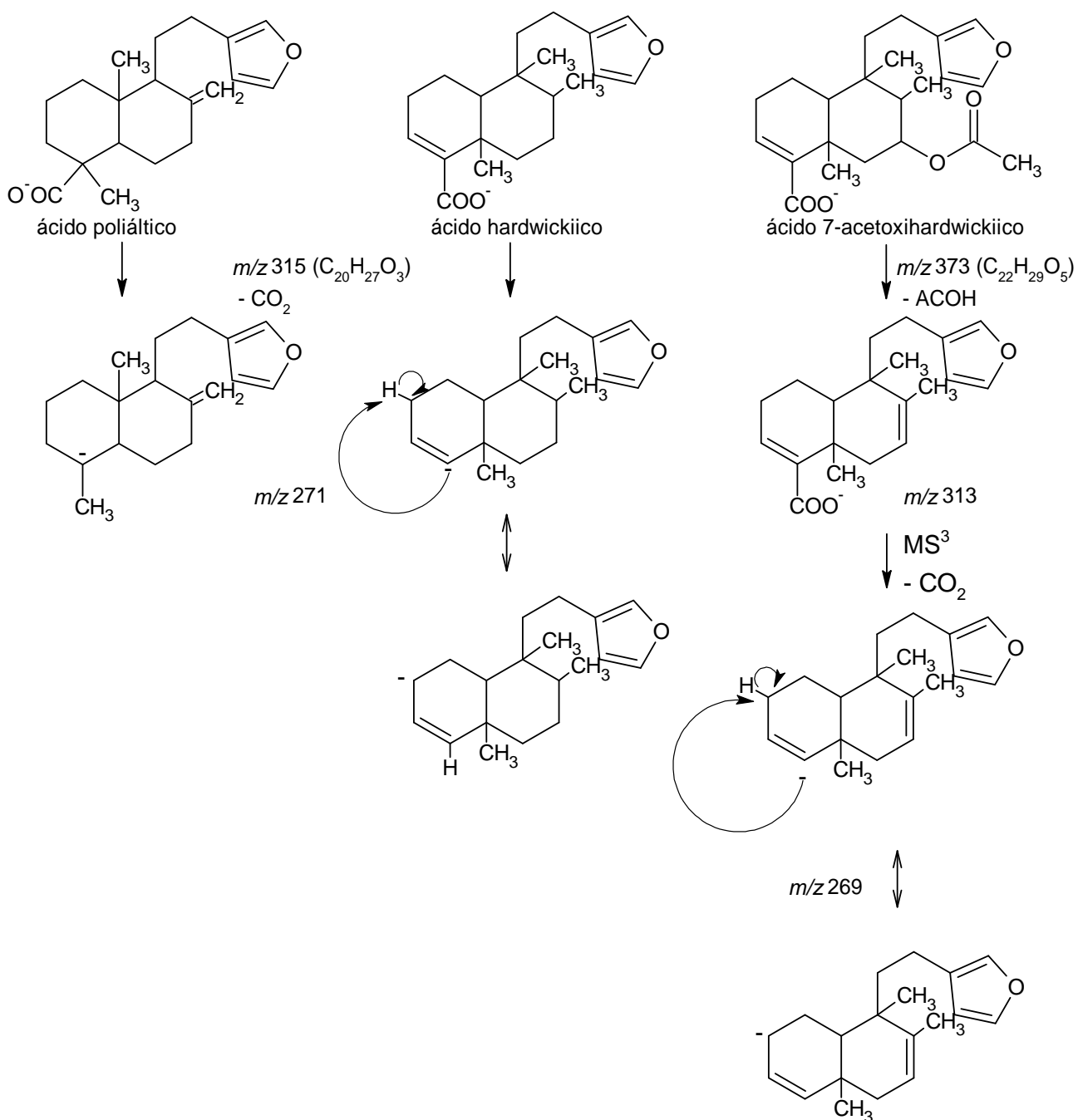


Outro fragmento importante foi o m/z 319 resultante do rearranjo com perda de 42 um para originar o ânion 3-hidroxicopalato (Figura 17, via B). O experimento MS³ do íon m/z 301 levou a formação do fragmento m/z 283 pela perda de 18 um, provavelmente de CH₄ + H₂, o que origina um tetraeno (Figura 17, via C). Também a descarboxilação de m/z 301 leva ao íon 257, o qual foi anteriormente proposta na Figura 16. O fragmento m/z 241 pode ter se originado a partir do fragmento m/z 257 pela perda de CH₄, levando a um ânion alílico. Também o experimento MS³ com o íon m/z 319 levou a formação dos fragmentos m/z 301, 219 e 217, propostos no esquema 2 para o ácido 3-hidroxicopálico confirmando, desta maneira, a estrutura do ácido 3-acetoxicopálico.

Dois diterpenos encontrados em *Copaifera reticulata*, bem como em outras espécies, são isômeros de fórmula molecular C₂₀H₂₈O₃, o ácido poliáltico e o ácido hardwickiico, ambos furanoditerpenos³⁹. Lima *et al.*, utilizando padrões de ambos os ácidos, em cromatografia de camada fina de alta performance (HPTLC), visando análise de oleoresina de diferentes espécies de *Copaifera*, encontraram padrão de eluição praticamente igual entre as suas substâncias (R_fs 0,39-0,40)³⁹. Segundo os autores, o ácido hardwickiico é um dos principais ácidos diterpênicos detectados nas oleorresinas de *C. langsdorffii* Desf., *C. cearensis* Huber ex Ducke e *C. reticulata* Ducke, enquanto o poliáltico é o ácido diterpênico presente em maior concentração nos óleos de *C. officinalis* (Jacq.) L. e nos óleos de *C. lucens* Dwyer³⁹. Entretanto, outros autores encontraram ácido poliáltico em *C. reticulata* Ducke, como Cicek *et al.*⁴⁰.

Por ESI-FT-ICR MS de OC-B, um sinal com [M-H]⁻ 315,19658 e massa exata de C₂₀H₂₇O₃ foi encontrado, o qual após ser fragmentado (MS²) forneceu o íon m/z 271, como íon base, resultante da descarboxilação do diterpeno, a qual conduziria a um ânion terciário no caso do ácido poliáltico e a um ânion vinílico para o ácido hardwickiico (Figura 20).

Figura 20. Fragmentações sequenciais (MS² e MS³) para diferenciar o ácido poliáltico do ácido hardwickiico



O MS³ dele não induziu posterior fragmentação. Entretanto, dois derivados, o ácido 7-hidroxihardwickiico e o 7-acetoxihardwickiico são descritos em oleorresinas do gênero *Copaifera*⁴¹. Nenhum derivado hidroxilado ou acetoxilado do ácido poliáltico foi descrito nessa espécie até o momento. Na Tabela 3, citada anteriormente, foram mostrados os íons quasimolecular [M-H]

OC-B, NEG, MSMS, 373.313, 220413102303 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 3.87E+003
 ITMS - p ESI FT-ICR MS 373.00@cid15.00 313.00@cid20.00 [85.00-400.00]
 1002041613002772200020338900

Figura 19. Espectro de massas do íon $[M-H]^-$ 313,00 mostrando o fragmento intenso m/z 269 pela perda de CO_2

Entretanto para o caso do ácido poliáltico, a perda de CO_2 não conduziria a um carbânion estável (terciário), sendo improvável a sua formação. O ácido cicloexano carboxílico, por exemplo, não sofreu descarboxilação por gerar um carbânion secundário instável⁴². No espectro (-)-ESI-FT-ICR MS (Figura 14) é possível notar um aduto $[M-H]^-$ 665,40619 ($C_{40}H_{57}O_8$) foi formado resultante da associação entre o ácido agático ($C_{20}H_{30}O_4$) com o ácido 7-hidroxihardwickiico ($C_{20}H_{28}O_4$).

A espectrometria de massas de altíssima resolução (FT-ICR MS) permite detectar a presença de moléculas em concentrações muito baixas em extratos vegetais. Desta maneira, ela é um bom caminho para se encontrar moléculas que ainda não foram isoladas em plantas muito investigadas quanto as suas atividades biológicas a partir de sua estrutura química.

Este é o caso, por exemplo, do sinal $[M-H]^-$ 335.2229 ($C_{20}H_{31}O_4$), cuja fórmula molecular pode conduzir ao ácido pinifólico, o qual foi identificado em *Copaifera officinales*⁴³. A possibilidade de ele estar presente na amostra analisada fundamenta-se pelo fato de ser resultante da hidrogenação do ácido agático na ligação dupla 13,14. Além disso, um aduto entre o ácido agático e o ácido pinifólico em $[M - H]^-$ 669,43745 ($C_{40}H_{61}O_8$) foi encontrado. Trabalhos posteriores poderão comprovar tal hipótese. Também através da FT-ICR MS pode-se deduzir da ausência de determinada substância em um extrato vegetal. Por exemplo, o ácido kaurenóico ($C_{20}H_{30}O_2$), muito presente em espécies de *Copaifera*, não foi encontrado como sinal $[M-H]^-$ 301 no espectro de massas de OC-B. Da mesma maneira o ácido kolavênico ($C_{20}H_{32}O_2$), não foi encontrado⁴⁴.

Como referido anteriormente, o óleo de copaíba pode conter adulterações e ser comercializados com óleos comestíveis comerciais. Entretanto, a amostra por nós analisada mostrou sinais pouco intensos para ácidos graxos, os principais componentes dos adulterantes ⁴⁵. A figura 14 mostra sinais de baixíssima intensidade para a região de ácidos graxos, o que evidencia a excelente qualidade da amostra.

4.5 Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica do OC-B em células de adenocarcinoma gástrico é mostrada na Figura 21 utilizando diferentes concentrações da amostra. Os valores de CI_{50} encontrados foram $43,01 \pm 0,67 \mu\text{g/mL}$ e $4,52 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$ para o óleo de copaíba bruto e para a cisplatina, respectivamente. A cisplatina é um quimioterápico já utilizado clinicamente, utilizado como padrão de comparação nesse estudo. É importante ressaltar a citotoxicidade do óleo na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, reduzindo a viabilidade das células AGS em mais de 90%, indicando alta citotoxicidade nessa concentração. Dessa forma, sugere-se importante efeito citotóxico para um óleo bruto comercial, originado de um extrato vegetal.

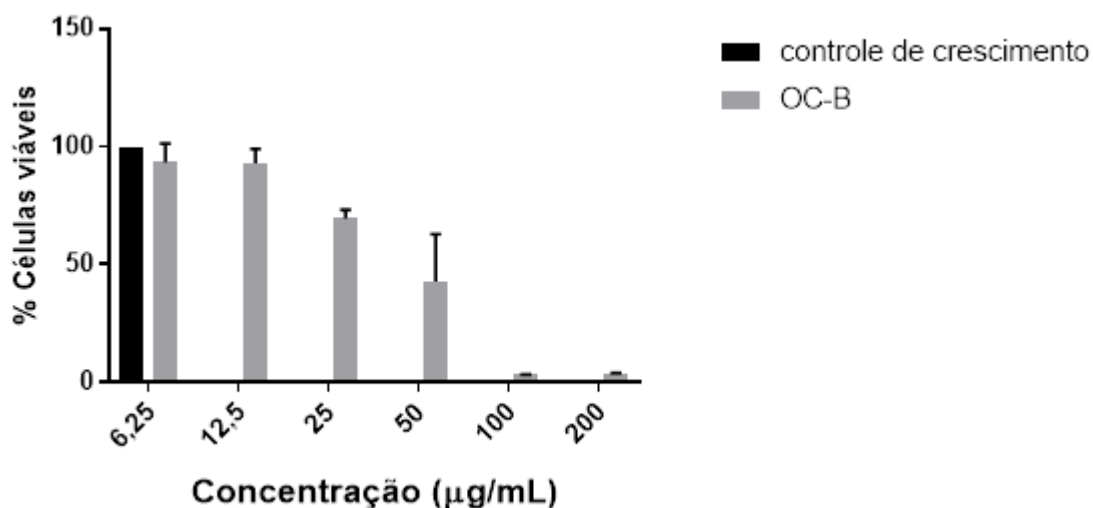


Figura 21. Efeito de *Copaifera sp.* e cisplatina na cultura de células AGS. Resultados expressos em percentagem de células viáveis. *p < 0,001 em relação ao controle de crescimento.

O OC-B mostrou efeitos citotóxicos em vários estudos com diferentes células tumorais. Frota ³³, em sua dissertação de mestrado analisou a fração volátil (sesquiterpenos) do óleo de copaíba (*Copaifera reticulata*) e a fração resinosa (diterpenos) para atividade citotóxica em diversas linhagens cancerosas, como MCF7 (câncer de mama), HOS (osteosarcoma), PC3 (adenocarcinoma de próstata), H1299 (carcinoma pulmonar), linhagens leucêmicas Nalm 6 (leucemia B) e Jurkat (leucemia T). De acordo com os resultados obtidos, a fração resinosa (diterpênica) apresentou maior citotoxicidade frente a maioria das linhagens de células cancerígenas, como Jurkat (leucemia T), Nalm 6 (leucemia B), HOS (osteosarcoma), PC3 (adenocarcinoma de próstata) e principalmente à H1299 (carcinoma pulmonar). A fração diterpênica (FR) obteve os menores valores CI_{50} , enquanto o óleo bruto e a fração volátil mostraram valores maiores, mas significativos. Entretanto, a linhagem MCF7 (câncer de mama) foi mais suscetível à fração volátil (FV).

Com relação a substâncias isoladas, Abrão *et al.* ³³ analisou o diterpeno ácido copálico sobre várias linhagens celulares cancerosas, sendo que o menor valor de CI_{50} foi sobre o glioblastoma humano, com valor de 68,31 $\mu\text{g/mL}$. Dentre os sesquiterpenos, β -cariofileno e óxido do β -cariofileno apresentaram atividade citotóxica sobre várias linhagens celulares, conforme revisado por Fidy *et al.* ³⁵. Assim como Dahham e colaboradores apresentaram resultados satisfatórios quanto a efeitos antioxidantes e efeitos antiproliferativos seletivos sobre células de câncer colorretal (CI_{50} 19 μM), após o ensaio com o β -cariofileno que foi isolado de forma bioguiada ⁵¹. Desta maneira, a presença destas classes de substâncias e a composição química no óleo de copaíba comercial, em geral, justifica a atividade citotóxica sobre células de adenocarcinoma gástrico, visto que os compostos presentes nessa amostra já apontam resultados frente a outros tipos de linhagens celulares.

Para melhor fim da investigação sobre a citotoxicidade necessária da investigação da amostra do óleo de copaíba frente a células saudáveis (macrófagos), podendo assim investigar se além dos resultados satisfatórios frente as células AGS, não há agressão significativa nestas células. Pois, como já mencionado anteriormente neste texto, que, medicamentos para o tratamento quimioterápico tem efeitos colaterais por atingir também atingir células boas, embora sejam os melhores e mais bem estudados medicamentos até o presente momento. O intuito com o avanço das pesquisas científicas é minimizar progressivamente os danos a vida, proporcionando a melhor qualidade com isso. Estudos futuros poderão dar prosseguimento a estes resultados desta pesquisa.

5. CONCLUSÃO

Pode-se constatar que, para a caracterização do perfil químico do óleo de copaíba ser mais completa foi necessário a utilização de duas técnicas analíticas (CG-EM e FT-ICR-ESI MS), sendo possível a observação dos compostos mais voláteis e menos voláteis. A amostra comercial do óleo de copaíba mostrou-se de excelente qualidade, como demonstrado pelos baixíssimos níveis de ácidos graxos, determinados por FT-ICR MS, e, mostrou conter as principais substâncias presentes em *Copaifera reticulata*, como o sesquiterpeno β -cariofileno e os diterpenos ácido agático, ácido copálico e seus derivados. A espectrometria de massas sequencial (MS^n) auxiliou na determinação do ácido hardwickiico e seus derivados, diferenciando-o do ácido poliáltico. Ensaio citotóxicos mostraram atividade potente do produto comercial para câncer gástrico, o que é de suma importância devido ao fato do óleo de copaíba ter grande aplicação em enfermidades gástricas.

6. REFERÊNCIAS

- [1] PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.
- [2] FRANCISCO, S. G. Uso do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) em inflamação ginecológica. *Femina*, v. 33, n. 2, p. 89-93, 2005.
- [3] ARAÚJO JÚNIOR, F.A.; BRAZ, M.E.; ROCHA NETO, O.G.; COSTA, F.D.; BRITO, M.V.H. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases 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.
- [4] LLOYD, J. U. *Copaifera officinalis*. Chicago: The Western Druggist, 1898.
- [5] VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, Angelo C. O gênero *copaifera* L. *Química nova*, v. 25, p. 273-286, 2002.
- [6] BARBOSA, A. L. P.; STORJOHANN, A.W.; BARBOSA, J.D.; ZIDORN, C.; PEIFER, C.; TASDEMIR, D.; ÇIÇEK, S.S. Efeitos antimicrobianos e citotóxicos da oleorresina de *Copaifera reticulata* e seus principais ácidos diterpênicos. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018.
- [7] ARRUDA, C.; MEJÍA, J.A.A.; RIBEIRO, V.P.; BORGES, C.H.G.; MARTINS, C.H.G.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R.; BASTOS, J.K.; Occurrence, chemical composition, biological activities, and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 109, p. 1-20, 2019.
- [8] SANTIAGO, K.B.; CONTI, B.J.; ANDRADE, B.F.M.T.; SILVA, J.J.M.D.; ROGEZ, H.L.G.; CREVELIN, E.J.; MORAES, L.A.B.D.; VENEZIANI, R.; AMBRÓSIO, S.R.; BASTOS, J.K. Immunomodulatory action of *Copaifera* spp oleoresins on cytokine production by human monocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 70, p. 12-18, 2015.
- [9] DEWICK, P. Medicinal Natural products A Biosynthetic Approach. *Journal of*

Bioscience and Bioengineering 2, (John Wiley & Sons, 2002).

[10] TINCUSI, B.M.; JIMÉNEZ, I.A.; BAZZHOCCHI, I.L.; MOUJIR, L.M.; MAMANI, Z.A.; BARROSO, J.P.; RAVELO, A.G.; HERNÁNDEZ, B.V; Terpenóides antimicrobianos da oleorresina da planta medicinal peruana *Copaifera paupera*. *Planta Med.*, v. 68, p. 808-812, 2002.

[11] LEITE, Roberta. Food Safety Brazil.O que significa o termo “aprovado pelo FDA”?, ano indisponível. Disponível em: <<https://foodsafetybrazil.org/significa-aprovado-pelo-fda/>>. Acesso em: 25 de jan. 2022.

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

[13] BRITTO, A. V. Stomach cancer: risk factors. *Cadernos de saúde pública*, v. 13, p. S7-S13, 1997.

[14] INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Estômago. em: INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Tipos de câncer. [Brasília, DF]: Instituto Nacional do Câncer, 2010. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-estomago>. Acesso em: 25 jan. 2022.

[15] DAHHAM, S.S.; TABANA, Y.M.; IQBAL, M.A.; AHAMED, M.B.K.; EZZAT, M.O.; MAJID, A.S.A.; MAJID, A.M.S.A. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*, v. 20, n. 7, p. 11808-11829, 2015.

[16] LEMOS, M.; SANTIN, J.R.; MIZUNO, C.S.; BOEING, T.; DE SOUSA, J.P.B.; NANAYAKKARA, D.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F.D. *Copaifera langsdorffii*: evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, p. 238-245, 2015.

[17] GOBBO NETO, L. Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais. (Universidade de São Paulo, 2007).

- [18] IBEKWE, N.; AMEH, S. Hyphenated Techniques in Liquid Chromatography as Current Trends in Natural Products Analysis. *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.* 7, 132-149 (2015).
- [19] PATEL, K., PATEL, J., PATEL, M., RAJPUT, G. e PATEL, H. Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. *Pharm. Methods* 1, 2 (2010).
- [20] LIMA NETO, José de Sousa; GRAMOSA, Nilce Viana; SILVEIRA, Edilberto Rocha. Constituintes químicos dos frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1078-1080, 2008.
- [21] HOFFMANN, E. DE e STROOBANT, V. *Mass Spectrometry Principles and Applications*. Mass spectrometry. 3ª Ed. USA: Wiley, 2007, 29 p.
- [22] PEREIRA, T. M. C. **Aplicações da Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclôtrônica de Íons por Transformada de Fourier (FT ICR MS) em Petroleômica**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.
- [23] COLATI, K. A. P. **Extração e Caracterização de Ácidos Naftênicos por Espectrometria de Massas de Altíssima Resolução e Exatidão (ESI-FT-ICR MS)**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2012.
- [24] CORREIA, R. M. **Perfil químico do café capixaba conilon & arábica por ESI (-) FT-ICR MS e ATR-FTIR: uma abordagem quantitativa**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016.
- [25] OLIVEIRA, Davi S.; LIMA, L. S.; ANTÔNIO, A. S.; WIEDEMANN, A. S. M.; VEIGA JUNIOR, V.F. Perfil Metabólico Dos Extratos Polares Das Folhas, Galhos E Cascas De *Copaifera Multijuga* Hayne (Copaíba Mari-Mari Da Amazônia) Por Esi-Em. *Química Nova*, v. 43, p. 72-77, 2020.
- [26] DE SOUZA, L. S. **Metodologias analíticas para determinação do perfil químico, atividade imunomoduladora e citotóxica do látex de *Euphorbia tirucalli***

L. Dissertação de mestrado. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2019.

[27] LYRIO, M. V.; FEU, A. E.; MOTTA, L. C.; FIGUEROA, L. P.; BOASQUEVISQUE, L., PINTO, R. T.; ROSA, A. C.; DE ARANTES, H. T. L.; BOTTOCIM, R. R. T.; FONSECA, V. R.; SANTOS, N. A.; LACERDA JÚNIOR, V. L.; CASTRO, E. V. R.; Romão, W. Comparando o desempenho de dois analisadores de massas (FT-ICR MS & LTQ MS): uma aula experimental sobre análise de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 45, p. 455-465, 2022.

[28] Mosmann, T.; Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**, 55-63, 1983.

[29] GELMINI, F.; GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; MAGNI, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; FACINO, R. M. GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. **International journal of pharmaceutics**, v. 440, n. 2, p. 170-178, 2013.

[29] BASILE, A. C.; SERTIÉ, J. A. A.; FREITAS, P. C. D.; ZANINI, A. C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **22**, n. 1, p. 101-109, 1988.

[30] FARIA, M. J. M. Oleorresina de *Copaifera* spp.: caracterização, verificação da atividade antimicrobiana in vitro e avaliação preliminar de uma formulação em vacas leiteiras com mastite. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, 2014.

[31] Mauro, M.; Da Silva, R. M.; De Campos, M. L.; Bauermeister, A.; Lopes, N. P.; De Moraes, N. V.; In vitro metabolism of copalic and kaurenoic acids in rat and human liver microsomes. *Quimica Nova*, v. 6, p. 700-708, 2021.

[32] FROTA, Jhéssica Krhistine Caetano. Avaliação química e atividade antitumoral *in vitro* do óleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke. 2018. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Oeste do Pará, 2018.

[33] ABRÃO, F.; L. D. C.; Alves, J. M.; Senedese, J. M.; De Castro, P. T.; Ambrósio, S. R.; Veneziani, R. C. S.; Bastos, J. K.; Tavares, D. C.; Martins, C. H. G.; *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2015.

[34] FRANCOMANO, F.; CARUSO, A.; BARBAROSSA, A.; FAZIO, A.; LA TORRE, C.; CERAMELLA, J.; MALLAMACI, R.; SATURNINO, C.; LACOPETTA, D.; SINICROPI, M. S. β -Caryophyllene: a sesquiterpene with countless biological properties. *Applied Sciences*, v. 9, n. 24, p. 5420, 2021.

[35] FIDYT, K., Fiedorowicz, A.; Strz̧dała, L.; Szumny, A. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer medicine*, v. 5, n. 10, p. 3007-3017, 2016.

[36] PEREIRA, Mariana Harumi Tasaka. **Separação e Caracterização dos Diterpenos Ácidos presentes em óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

[37] PATEL, K., PATEL, J., PATEL, M., RAJPUT, G. e PATEL, H. Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. *Pharm. Methods*. 1 (1), 2-13 p., 2010.

[38] Aguiar, G. P. †; Crevelin, E. J. †; Dias, H. J. †; Ambrósio, S. R.; Bastos, J. K.; Vladimir, C. G. H; Vessecchi, R.; Crotti, A. E. M.; Electrospray ionization tandem mass spectrometry of labdane-type acid diterpenes. *Journal of Mass Spectrom*, **53**, 1086-1096, 2018.

[39] De Lima, M.C. F.; De Almeida, S. F. C.; Wiedemann, L. S. M.; Veiga Junior, V. F.; Caracterização E Controle De Qualidade De Óleos De Copaíba (Copaifera Sp.) Utilizando Detecção De Marcadores Por Fator De Retenção Relativa Em Hptlc. *Química Nova*, v. 7, p. 878-883, 2020.

[40] Çiçek, S. S.; Barbosa, A. L. P.; Girreserb, U.; Quantification of diterpene acids in Copaiba oleoresin by UHPLC-ELSD and heteronuclear two-dimensional qNMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, **160**, 126-134 p.

[41] De Albuquerque, K. C. O.; Da Veiga, A. S. S.; Da Silva e Silva, J. V. Brigido, H. P. C.; Ferreira, E. P. R.; Costa, E. V. S.; Marinho, A. M. R.; Percário, S.; Dolabela, M. F.; Brazilian Amazon Traditional Medicine and the Treatment of Difficult to Heal Leishmaniasis Wounds with Copaifera. *Hindawi*, 2017, 9 p.

[42] Bandu, M. L.; Watkins, K. R.; Bretthauer, M. L. ; Moore, C. A.; Desaire, H.; Prediction of MS/MS Data. 1. A Focus on Pharmaceuticals Containing Carboxylic Acids. *Anal. Chem.*, **76**, 1746-1753, 2004.

[43] Dos Santos, A. O.; Izumi, E.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B. P.; Veiga-Júnior, V. F.; Nakamura. C. V.; Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2013, **108** (1), 59-64 p.

[44] Veiga Junior, V. F.; Rosas, E.C.; Carvalho, M.V.; Henriques, M. G. M. O.; Pinto, A. C.; Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera*

multijuga Hayne—A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 248–254 p., 2007.

[45] Veiga Junior, V. F.; Zunino, L.; Calixto, J. B.; Patitucci, M. L; Pinto, A. C; Phytochemical and Antioedematogenic Studies of Commercial Copaiba Oils Available in Brazil. *Phytotherapy Research* **2001**, 15, 476-480.

[46] RIBEIRO, B. F. Dos S.; FERRIELLO, Vanessa. Chemoinduced Effects in Oral Cavity. *Journal of Biodentistry and Biomaterials*, V. 5, n. 3, 2015.

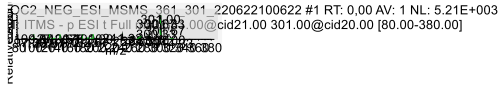


Figura 6b. Espectro de massas MS3 do fragmento m/z 301 do ácido 3-acetoxicopálico

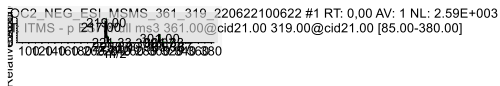


Figura 6c. Espectro de massas MS3 do fragmento m/z 319 do ácido 3-acetoxicopálico

6. Ácido hardwickiico $[M-H]^- = 315$

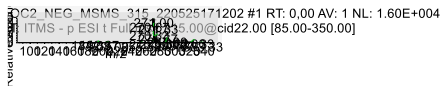


Figura 6a. Espectro de massas MS2 do ácido hardwickiico

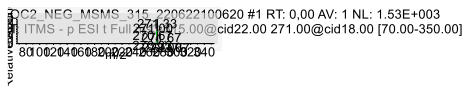


Figura 6b. Espectro de massas MS3 do fragmento m/z 271 do ácido hardwickiico

7. Ácido 7-acetoxihardwickiico $[M-H]^- = 373$

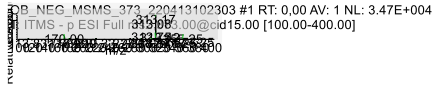


Figura 7a. Espectro de massas MS2 do ácido 7-acetoxihardwickiico



Figura 7b. Espectro de massas MS3 do fragmento m/z 313 do ácido 7-acetoxihardwickiico