Artigo

***Copaifera reticulata*: Caracterização Química e Atividade Bactericida Frente à Patógenos de Alimentos**Santos, D. G.;* Castro, V. S.; Conte Junior, C.; Pinto, A. C.;[†] Uekane, T. M.; Rezende, C. M.

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (2), 474-491. Data de publicação na Web: 17 de Abril de 2020

<http://rvq.sbq.org.br>***Copaifera reticulata*: Chemical Characterization and Bactericidal Activity Against Pathogens in Foods**

Abstract: Oil-resin from *Copaifera* is considered one of the most important natural product for natives of the Amazon Region due to its diverse pharmacological properties. The aim of this work was to perform the chemical characterization, the isolation of the constituents and to assess antibacterial activity focusing on diterpenic acids of the *C. reticulata* oil-resin. Regarding antibacterial activity, food-borne bacteria were evaluated, with the most significant activity observed for diterpenes acids against gram-positive bacteria.

Keywords: Oil-resin; copalic acid; gram-positive bacteria; contaminated food.

Resumo

O óleo-resina da espécie *Copaifera* é considerado um dos produtos naturais mais importantes para os povos indígenas da Região Amazônica devido às diversas propriedades farmacológicas. O intuito desse trabalho foi realizar a caracterização química, o isolamento dos constituintes e a avaliação da atividade antibacteriana do óleo-resina de *C. reticulata* com foco nos diterpenos ácidos. No que diz respeito à atividade antibacteriana, foram avaliadas bactérias que provocam doenças de origem alimentar, sendo a atividade mais significativa observada para os diterpenos ácidos contra as bactérias gram-positivas.

Palavras-chave: Óleo-resina; ácido copálico; bactéria gram-positiva; alimentos contaminados.

* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Laboratório de Análise de Aromas, Avenida Athos da Silveira Ramos 149, CEP 21941-909, Bloco A, 6º andar, sala 626A, Cidade Universitária, Rio de Janeiro–RJ, Brasil.

claudia.rezendeufrj@gmail.com
DOI: [10.21577/1984-6835.20200038](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200038)

***Copaifera reticulata*: Caracterização Química e Atividade Bactericida Frente à Patógenos Encontrados em Alimentos**

Deiziane G. Santos,^{a,*} Vinicius S. Castro,^a Carlos A. C. Junior,^a Angelo C. Pinto,^{a,†} Thais M. Uekane,^b Claudia M. Rezende^a

^a Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Laboratório de Análise de Aromas, Avenida Athos da Silveira Ramos 149, CEP 21941-909, Bloco A, 6º andar, Sala 626A, Cidade Universitária, Rio de Janeiro–RJ, Brasil.

^b Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Farmácia, Departamento de Bromatologia, Rua Mário Viana 523, CEP 24241-002, Santa Rosa, Niterói–RJ, Brasil.

[†] in memorium

*claudia.rezendeufri@gmail.com

Recebido em 22 de Novembro de 2019. Aceito para publicação em 24 de Março de 2020

1. Introdução

2. Experimental

2.1. Material vegetal

2.2. Fracionamento do óleo-resina e extração dos diterpenos ácidos

2.3. Derivatização com solução de trifluoreto de boro (BF₃/MeOH)

2.3. Análises cromatográficas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) preparativa

2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

2.5 Avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos

3. Resultado e Discussão

3.1. Análise da composição química do óleo-resina de *C. reticulata* por CG-EM e das frações obtidas por cromatografia em coluna de gel de sílica impregnada com KOH

3.2. Isolamento dos diterpenos ácidos por CLAE-UV semipreparativa

3.3. Atividade antibacteriana do óleo-resina de *C. reticulata* e seus constituintes

4. Conclusão

1. Introdução

A Floresta Amazônica possui um grande número de espécies de plantas que são utilizadas como fonte de óleos e, dentre essas espécies, podemos citar a copaíba (*Copaifera* spp.), que fornece um óleo-resina de ampla comercialização, obtido a partir de seus

troncos.¹ A espécie *Copaifera* é classificada como um gênero pantropical distribuído amplamente nas Américas, podendo ser encontrado do México ao norte da Argentina, na África Ocidental e na Ásia.² A família botânica Leguminosae Juss, a qual pertencem as copaibeiras, é considerada a terceira maior família de angiospermas, possuindo cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies.³

Copaifera reticulata, por sua vez, é nativa das regiões tropicais da América do Sul, possuindo ocorrência confirmada no Brasil nas regiões Norte (Amapá, Pará, Roraima) e Centro-Oeste (Mato Grosso) (Figura 1).^{4,5} Produz um óleo-resina de aspecto líquido, fino e de coloração amarelodourada, podendo ocorrer variações entre as espécies.⁶ O óleo-resina das espécies do gênero *Copaifera* L. é muito utilizado na medicina popular, pois possui diversas atividades,⁷ sendo a atividade antimicrobiana,⁸ uma das mais estudadas.

Em 1972, o óleo-resina da espécie *Copaifera* foi aprovado como agente flavorizante pelo *Food Chemicals Codex*, para o uso como aditivos em alimentos e bebidas,⁹ sendo essa característica relacionada aos sesquiterpenos, que são compostos voláteis muito utilizados na indústria alimentícia e cosmética devido seus odores agradáveis, como exemplo, podemos citar o β -cariofileno, que é um sesquiterpeno presente no óleo-resina de copaíba, onde possui um odor característico amadeirado e picante.¹⁰

Com a finalidade de testar os efeitos tóxicos dos óleos-resinas de copaíba foi realizada a administração de 500 mg/kg por peso corpóreo do óleo-resina das espécies *Copaifera multijuga* e *Copaifera reticulata* em camundongos por via oral, onde não foram observadas alterações comportamentais, perda dos reflexos a luz, aumento ou diminuição da ingestão de alimentos e lesões ou hemorragias no estômago.¹¹

Em estudos clínicos de toxicidade aguda para

o óleo-resina de *Copaifera reticulata* em ratos Wistar foi demonstrado que a administração até a dose de 2000 mg/kg de peso corporal não causa mortalidade, possuindo assim uma relativa margem de segurança.⁷

Quimicamente, o óleo-resina da copaíba é composto por sesquiterpenos, associados ao seu odor e por uma fração resinosa não volátil, formada majoritariamente por ácidos diterpênicos,¹² onde possuem importantes atividades, como por exemplo, atividade antitumoral¹³ e anti-inflamatória.¹⁴

Os principais sesquiterpenos já relatados nos óleos-resinas de *Copaifera cearensis* e de modo geral em espécies de *Copaifera* são: β -cariofileno, óxido de cariofileno, α -humuleno, δ -cadineno, α -cadinol, α -cubebeno, α e β -selineno, β -elemeno, *trans*- α -bergamoteno e β -bisaboleno.^{15,16} Já os principais ácidos diterpênicos descritos no óleo-resina de *Copaifera paupera* e também de um modo geral nas espécies de *Copaifera* são os ácidos copálico, poliáltico, hardwíckico, caurenóico, 3-hidróxi-copálico, 3-acetóxi-copálico e *ent*-agático, entre outros usualmente minoritários.¹⁷

Os diterpenos encontrados nos óleos-resinas das espécies de *Copaifera* apresentam esqueletos caurano, labdano e clerodano. Em estudo realizado com diversos óleos-resinas de copaíba provenientes de várias regiões do Brasil, como por exemplo, Pará, Amazonas e Rio de Janeiro, o ácido copálico foi o único diterpeno ácido encontrado em todos os óleos-resinas analisados,¹⁸ sendo

Figura 1. Mapa ilustrativo com as regiões de ocorrência para a espécie *C. reticulata* no Brasil

considerado um biomarcador para o gênero *Copaifera*.¹⁷

A combinação de sesquiterpenos e diterpenos ácidos do óleo-resina das copaibeiras parece ser relacionado com sua atividade antibacteriana, uma vez que estes compostos afetam a integridade da parede celular bacteriana, sendo esta ação demonstrada em muitos patógenos, incluindo as bactérias gram-positivas.^{19,20}

No caso da fração volátil do óleo-resina de *C. reticulata* Ducke, foi avaliada a atividade frente à *Staphylococcus coagulase* positiva, proveniente de casos de otite em cães, onde se observou uma concentração inibitória mínima (CIM90) de 0,1 mg/mL e concentração bactericida mínima (CBM90) de 1,3 mg/mL, sendo a eficácia demonstrada em concentrações inferiores a 2,6 mg/mL.²¹

O óleo-resina de *C. multijuga* incorporado em embalagem biodegradável produzida com papel e filme de políácido láctico (PLA) foi testado contra bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis*), onde a atividade antibacteriana foi confirmada com um teor de óleo-resina de aproximadamente 20 % em massa, sugerindo sua aplicação em embalagens biodegradáveis com efeito bactericida, com a finalidade de melhorar a vida de prateleira de produtos alimentícios.²²

No estudo do óleo-resina de *C. multijuga* foi relatado a inibição do crescimento de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) com CIM de 1,5, 3,1 e 12,5 %, respectivamente.²³ Já o óleo-resina de *C. officinalis* demonstrou atividade bacteriana contra *S. aureus* com CIM de 0,7 µL/mL para o óleo-resina a 10 %.²⁴

Ação antibacteriana do óxido de cariofileno e do ácido copálico, ácido caurenóico, ácido acetóxicopálico, ácido agático e do ácido hidróxicopálico, isolados do óleo-resina de *C. langsdorffii*, foi avaliada contra as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *E. faecalis* e *S. pneumoniae*, onde o ácido copálico foi a substância mais ativa com valores de CIM variando de 15,6 a 31,2 µg/mL. Os autores relataram ainda que foi testada a atividade desses diterpenos esterificados com solução de diazometano, fornecendo os respectivos ésteres metílicos, porém as modificações nas estruturas moleculares não levaram a nenhuma ação, comprovando a necessidade da presença do grupo doador de hidrogênio (-COOH, grupo hidrofílico), que

interage com grupos fosforilados da membrana da célula bacteriana.²⁵

A atividade antibacteriana dos diterpenos ácidos isolados do óleo-resina da *C. paupera*, uma planta medicinal peruana, foi analisada para as bactérias gram-positivas (*S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* CECT 232, *S. saprophyticus* CECT 235, *B. subtilis* CECT 39) e gram-negativas (*E. coli* CECT 99, *P. aeruginosa* AK 958), onde foi observada atividade somente para os ácidos copálico e caurenóico, com valores de CIM <10 µg/mL para as bactérias gram-positivas.¹⁷

As doenças provenientes do consumo de alimentos contaminados por micro-organismos, como por exemplo, por bactérias ou suas toxinas podem causar efeitos graves na saúde humana.²⁶ Essas doenças ocorrem em muitas regiões do mundo, e pelo menos uma a cada dez pessoas adoecem anualmente devido ao consumo de alimentos contaminados, segundo dados da Organização Mundial da Saúde.²⁷ No Brasil, o patógeno prevalente em surtos de intoxicação alimentar é a *Salmonella* sp. (14,4 %), seguido pelo *S. aureus* (7,7 %) e *E. coli* (6,5 %).²⁸

A bactéria *S. aureus* (gram-positiva) provoca uma variedade de manifestações clínicas, tendo um tratamento difícil devido ao surgimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos.²⁹ As principais fontes de contaminação por *S. aureus* são os produtos lácteos, carnes (principalmente de aves), ovos e atum, entre outros.³⁰ *Lysteria monocytogenes*, pertencente a classe das bactérias gram-positivas, podendo ser encontradas com maior incidência em carnes, aves e frutos do mar.³¹

Escherichia coli O157:H7 pertence ao grupo das bactérias gram-negativas, sendo encontrada com frequência nas fezes de bovinos saudáveis e transmitida aos seres humanos via alimentos contaminados, pela água e pelo contato direto com pessoas ou animais infectados.³² Já a bactéria *S. enterica* serovar Typhimurium (gram-negativa) pode ser encontrada em carnes (bovina e suína), aves, ovos e leite, possuindo uma boa adaptação e capacidade de alterar o ambiente gastrointestinal.^{33,34}

O presente trabalho teve como objetivo analisar os constituintes químicos do óleo-resina de *C. reticulata* e investigar a atividade bactericida do óleo-resina bruto, dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados e ácidos diterpênicos frente a bactérias responsáveis

por surtos de enfermidades causadas pela ingestão de alimentos contaminados.

2. Experimental

2.1 Material vegetal

O óleo-resina utilizado nesse estudo foi cedido pelo Dr. Osmar Lameira, através do projeto “Coleta, conservação, caracterização, documentação e uso de plantas medicinais e aromáticas de ocorrência na Amazônia Oriental”, Embrapa Amazônia Oriental. Número do processo junto ao IBAMA: 02001.010413/2009-64 - autorização de acesso para fins de Pesquisa Científica.

A amostra foi obtida na Fazenda Agroecológica São Roque, localizada no município de Moju-Pará, sob as coordenadas geográficas, 3°03'14,85409" de latitude sul e 48°59'36,15357" de longitude oeste no município. A espécie foi identificada pelo Dr. Osmar Lameira e a coleta realizada nos meses de fevereiro e novembro de 2015, através da incisão com um trado no tronco da árvore. A amostra foi armazenada em frasco âmbar e refrigerada até o momento da análise.

2.2 Fracionamento do óleo-resina e extração dos diterpenos ácidos

Para o fracionamento do óleo-resina foi utilizada a técnica de cromatografia em coluna de gel de sílica impregnada com hidróxido de potássio (KOH).³⁵ Uma coluna aberta de vidro com 60 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro foi recheada com 45 g de sílica impregnada com KOH em hexano, e em seguida adicionado cerca de 1,0 g do óleo-resina bruto de copaíba no topo da coluna e 45 mL de cada um dos eluentes foram empregados: hexano P.A, diclorometano P.A e metanol P.A, fornecendo respectivamente 0,5167 g da fração relativa aos hidrocarbonetos sesquiterpênicos, 0,0498 g da fração relativa aos sesquiterpenos oxigenados e 0,2496 g da fração relativa aos ácidos diterpênicos.

Na fração metanólica resultante, contendo os ácidos diterpênicos na forma de sais de potássio como resultado da eluição na coluna de sílica/KOH, foi realizada acidificação até pH 3 pela adição de uma solução de HCl 3N, utilizando um pHmetro digital da marca Del Lab. Após acidificação, a

amostra foi extraída cinco vezes com 24 mL de diclorometano em funil de separação, sendo a fase aquosa descartada e a fase orgânica seca com Na₂SO₄ e, em seguida, a mesma foi evaporada em evaporador rotatório até secura.

2.3. Derivatização com solução de trifluoreto de boro (BF₃/MeOH)

Para a conversão dos ácidos diterpênicos em seus respectivos ésteres metílicos, foi realizado o método de derivatização utilizando solução de trifluoreto de boro em metanol (BF₃/MeOH).³⁶

2.4. Análises cromatográficas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) preparativa

O óleo-resina bruto de *C. reticulata* e as suas frações foram analisados por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-DIC) utilizando um cromatógrafo a gás modelo Agilent 6890, nas seguintes condições: temperaturas do injetor e do detector foram de 220 e 250 °C, respectivamente e H₂ (1,0 mL/min) como gás de arraste. Coluna capilar de sílica fundida do tipo HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura do filme) e amostras injetadas na razão de 1:20 (*split*). Para a análise do óleo-resina bruto foi utilizada a programação de temperatura do forno: T_{inicial} 80 °C, 6 °C/min até 240 °C, 3 °C/min até 310 °C. Para as frações constituídas pelos hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados foi utilizada a seguinte programação de temperatura do forno: T_{inicial} 80 °C, 3 °C/min até 240 °C. Já para a fração contendo os ácidos diterpênicos esterificados, a programação de temperatura do forno foi alterada para T_{inicial} 110 °C (2 min), 3 °C/min até 130 °C, 8,5 °C/min até 310 °C e as temperaturas do detector por ionização em chama (DIC) e do injetor alteradas para 330 e 270 °C, respectivamente, por se tratarem de substâncias menos voláteis. As condições da programação de temperatura do forno foram ajustadas para obter uma melhor resolução cromatográfica e o ajuste dos índices de retenção.

Para análise do perfil geral do óleo-resina bruto derivatizado de *C. reticulata* e das frações foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa

acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), onde foi utilizado um cromatógrafo a gás modelo Agilent 6850, equipado com um detector de massas modelo Agilent 5973N nas mesmas condições de programação de temperatura do forno citadas acima na análise por CG-DIC. Temperaturas de operação do detector de massas: fonte iônica 230 °C, interface 300 °C e quadrupolo 150 °C e pressão de gás carreador He a 3,5 psi.

Para o isolamento dos diterpenos ácidos foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (LC-6AD Shimadzu) com uma coluna preparativa Phenomenex 5 μ m C18 (250 mm x 21,2 mm) e detector de ultravioleta a 225 nm. Como fase móvel foi utilizado 100 % de metanol (grau espectroscópico) com fluxo de 10 mL/min (com reciclo de solvente) e loop de injeção de 500 μ L. Essa técnica foi realizada com o retorno da fase móvel, onde os ciclos realizados por esse retorno proporcionaram uma melhor separação das substâncias presentes na amostra. Ao final dos reciclos, os picos foram coletados a meia altura, evitando a coleta de compostos em co-eluição. Dos 70 mg/mL injetados da fração em metanol foram obtidos: 9,0 mg do pico 1; 5,7 mg do pico 2; 19,8 mg do pico 3 e 23 mg do pico 4.

A identificação dos compostos por CG-EM foi realizada por comparação dos espectros de massas experimental com a base de dados Wiley Registry of Mass Spectral Data³⁷ e/ou NIST database³⁸. Os compostos voláteis do óleo-resina foram identificados a partir da comparação entre os valores de IRLs calculados com os valores de IRLs descritos na literatura,³⁹ considerando-se uma variação de ± 8 unidades para confirmar a identificação dos compostos. O índice de retenção linear (IRL),⁴⁰ foi calculado após a injeção de uma série homóloga de n-alcanos (C₇-C₂₆).

2.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a elucidação estrutural dos ácidos diterpênicos que se mostraram ativos frente às bactérias gram-positivas, *i.e.*, ácido copálico e ácido *ent*-agático, foi utilizada espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H (500 MHz) e ¹³C (125 MHz) em 1D e 2D (COSY (¹H x ¹H) e HSQC (¹J_{CH}) e HMBC (ⁿJ_{CH}, n = 2 ou 3) através de um espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker modelo AV 500. Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d₆) foi utilizado para solubilização dos compostos por esta técnica.

Ácido copálico: ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ (ppm) / (Hz): 0,64 (s; 3H; H₂₀); 0,77 (s; 3H; H₁₉); 0,85 (s; 3H; H₁₈); 0,99 (td; 1H; H₁); 1,08 (dd; 1H; H₅); 1,16 (td; 1H; H₃); 1,25 (qt; 1H; H₆); 1,36 (m; 1H; H₃); 1,41-1,64 (m; 5H; H₂, H₉, H₁₁); 1,67-1,73 (m; 2H; H₁ e H₆); 1,92 (td; 2H; H₇ e H₁₂); 2,06 (s; 3H; H₁₆); 2,19 (m; 1H; H₁₂); 2,35 (dd; 1H; H₇); 4,50 (s; 1H; H₁₇); 4,84 (s; 1H; H₁₇); 5,53 (sl; 1H; H₁₄). ¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ (ppm): 14,22 (C₂₀); 18,18 (C₁₆); 18,85 (C₂); 21,12 (C₁₁); 33,30 (C₁₈); 23,85 (C₆); 33,17 (C₄); 21,50 (C₁₉); 37,63 (C₇); 38,36 (C₁); 39,02 (C₁₂); 40,02 (C₁₀); 41,59 (C₃); 54,71 (C₅); 55,43 (C₉); 106,40 (C₁₇); 116,10 (C₁₄); 147,85 (C₈); 158,76 (C₁₃); 167,43 (C₁₅).

Ácido *ent*-agático: ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ (ppm) / (Hz): 0,55 (s; 3H; H₂₀); 0,96-1,07 (m; 2H; H₁ e H₃); 1,11 (s; 3H; H₁₉); 1,30 (dd; 1H; H₉); 1,39-1,46 (m; 2H; H₂ e H₁₁); 1,57 (d; 1H; H₅); 1,59-1,66 (m; 1H; H₁₁); 1,73-1,95 (m; 7H; H₁, H₂, H₆, H₇, H₁₂); 2,01 (d; 1H; H₃); 2,06 (s; 3H; H₁₆); 2,16-2,22 (m; 1H; H₁₂); 2,35 (m; 1H; H₇); 4,49 (s; 1H; H₁₇); 4,86 (s; 1H; H₁₇); 5,53 (sl; 1H; H₁₄). ¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ (ppm): 12,58 (C₂₀); 18,18 (C₁₆); 19,65 (C₂); 21,28 (C₁₁); 25,91 (C₆); 28,60 (C₁₉); 37,69 (C₃); 38,13 (C₇); 38,56 (C₁); 39,02 (C₁₂); 40,02 (C₁₀); 43,31 (C₄); 54,66 (C₅); 55,09 (C₉); 106,24 (C₁₇); 116,09 (C₁₄); 147,82 (C₈); 158,83 (C₁₃); 167,44 (C₁₅); 178,32 (C₁₈).

2.6. Avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos

Para avaliação da atividade antibacteriana do óleo-resina de *C. reticulata*, das frações e substâncias isoladas foram utilizadas as bactérias gram-negativas *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC-14028) e *Escherichia coli*

O157:H7 (ATCC-43895) e gram-positivas *Listeria monocytogenes* (ATCC-15313) e *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538), normalmente encontradas em surtos causados pela ingestão de alimentos contaminados. Os ensaios foram realizados no Centro Laboratorial Analítico, na Universidade Federal Fluminense (UFF) e as bactérias cedidas pelo Laboratório de Micro-organismos de Referência do Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ.

No teste de antibiograma foi analisado o óleo-resina bruto de *C. reticulata* e suas frações, solubilizados em 1 mL de DMSO e na concentração de 100 mg/mL. Como controle positivo foi utilizado discos comerciais de ampicilina a 10 mg/disco e como controle negativo dimetilsulfóxido (DMSO). Foi transferido um volume de aproximadamente 50 mL do meio de cultura Ágar Muller Hinton II liquefeito para as placas de Petri esterilizadas de 90 x 15 cm, sendo o inóculo distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar com o auxílio de um swab esterilizado. Em seguida, os discos foram impregnados, adicionados nas placas contendo o meio de cultura inoculado e incubados em estufa a 37 °C por 24 h. Após esse período, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e comparados com os valores estabelecidos pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais.

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo-resina bruto e das frações contendo os sesquiterpenos oxigenados e os diterpenos ácidos foi utilizada a concentração de 50 mg/mL. Para os diterpenos ácidos isolados por CLAE-UV semipreparativa, foi utilizada a concentração de 0,003 mmol/L. Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado para solubilizar as substâncias testadas e como controle negativo e a penicilina G benzatina como controle positivo a 0,001 mmol/L.

A determinação da CMI foi realizada com base na metodologia padrão internacional NCCLS / CLSI (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*),⁴¹ descrita para bactérias (norma M7-A6 para bactérias aeróbicas). As bactérias foram cultivadas em ágar infusão de cérebro e coração bovino (BHI) e incubadas por 24 h a 37 °C, sendo o preparo do inóculo realizado a partir da suspensão em água para determinar a densidade ótica (D.O) de 0,08 a 0,1 em 625 nm, onde para *E. coli* e *S. enterica* serovar Typhimurium foram obtidos valores de D.O de 0,08 para ambas, para *L. monocytogenes* D.O de 0,07 e para *S. aureus* 0,09.

Inicialmente, foram adicionados 150 µL do meio BHI na placa de 96 poços e em seguida 50 µL da amostra na coluna 1 e realizada a diluição seriada até a coluna 11. Logo após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, o corante resazurina (0,005 % em tampão fosfato salino 0,01M) foi adicionado a todos os poços (30 µl por poço) e a incubação se deu por mais 2-4 h.

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise da composição química do óleo-resina de *C. reticulata* por CG-EM e das frações obtidas por cromatografia em coluna de gel de sílica impregnada com KOH

Inicialmente, para a visualização do perfil geral do óleo-resina bruto de *C. reticulata* derivatizado com trifluoreto de boro em metanol (BF₃/MeOH), a análise por CG-EM foi realizada utilizando uma coluna apolar do tipo HP-5MS, onde foi possível verificar duas regiões distintas, sendo as primeiras substâncias a serem eluídas os hidrocarbonetos sesquiterpênicos e os sesquiterpenos oxigenados, seguido dos ácidos diterpênicos.

O cromatograma da Figura 2 é referente ao óleo-resina derivatizado com BF₃/MeOH, onde as últimas substâncias a serem eluídas foram os diterpenos esterificados, pois a derivatização dos ácidos carboxílicos permite a modificação dos grupos funcionais da molécula, aumentando a sua volatilidade e diminuindo a polaridade, facilitando assim a análise por cromatografia gasosa.

Foi realizado o fracionamento por cromatografia em coluna de gel de sílica impregnada com KOH para a obtenção de três frações distintas, ou seja, a fração obtida pela eluição com hexano continha os hidrocarbonetos sesquiterpênicos, a fração eluída com diclorometano continha os sesquiterpenos oxigenados e a fração eluída com metanol continha os ácidos diterpênicos na forma de sais de potássio, posteriormente extraídos por ação de uma solução de ácido inorgânico (rendimentos descritos Materiais e métodos).

Na Figura 3 constam os cromatogramas das frações contendo os hidrocarbonetos sesquiterpênicos (A) e os sesquiterpenos oxigenados (B), obtidos por CG-EM, após o fracionamento do óleo-resina de *C. reticulata*.

Figura 2. Cromatograma do óleo-resina bruto de *C. reticulata* derivatizado com BF_3/MeOH obtido por CG-EM com coluna do tipo HP-5MS

Figura 3. Cromatogramas das frações contendo os hidrocarbonetos sesquiterpênicos (A) e os sesquiterpenos oxigenados (B) obtidos por CG-EM com coluna do tipo HP-5MS, referente ao fracionamento por cromatografia em coluna de gel de sílica impregnada com KOH

De acordo com a Tabela 1, após análise da composição química do óleo-resina por CG-EM, foram identificados os seguintes constituintes majoritários para a fração contendo os hidrocarbonetos sesquiterpênicos: β -bisaboleno

(48,9 %), *trans*- α -bergamoteno (23,4 %) e β -cariofileno (12,0 %). Já para a fração contendo os sesquiterpenos oxigenados, os compostos majoritários foram: β -bisabolol (16,7 %), óxido de cariofileno (11,8 %) e *allo*-himachalol (9,8 %).

Tabela 1. Composição química das frações contendo os hidrocarbonetos sesquiterpênicos e os sesquiterpenos oxigenados obtidas a partir do fracionamento do óleo-resina de *C. reticulata*

Nº pico	IRL _{cal} ^a	IRL _{lit} ^b	Nome	% ^c	Classificação terpênica
1	1368	1369	ciclosativeno	1,2	HS
2	1393	1389	β -elemeno	1,8	HS
3	1421	1417	β -cariofileno	12	HS
4	1436	1432	<i>trans</i> - α -bergamoteno	23,4	HS
5	1443	1442	6,9-guaiadieno	<1	HS
6	1453	1452	α -humuleno	1,3	HS
7	1456	1454	<i>trans</i> - β -farneseno	3,4	HS
8	1495	1498	α -selineno	2	HS
9	1503	1505	α -farneseno	2	HS
10	1510	1505	β -bisaboleno	48,9	HS
11	1514	-	NI	1,9	HS
12	1524	1521	β -sesquifelandreno	2,7	HS
13	1530	1531	<i>cis</i> -nerolidol	1,7	SO
14	1547	1542	hidrato de <i>cis</i> -sesquisabineno	3,4	SO
15	1556	1550	<i>cis</i> -5-muurolen-4- β -ol	1,7	SO
16	1566	1561	<i>trans</i> -nerolidol	1,4	SO
17	1584	1582	óxido de cariofileno	11,8	SO
18	1592	-	NI	<1	SO
19	1600	-	NI	1,5	SO
20	1602	-	NI	2,2	SO
21	1605	1600	guaiol	4,7	SO
22	1611	1602	ledol	3,6	SO
23	1615	1601	bisabolatrien-7-ol	1,9	SO
24	1618	1618	<i>epi</i> -cedrol	2	SO
25	1627	-	NI	3	SO
26	1637	-	NI	7,7	SO
27	1646	-	NI	2	SO
28	1648	1645	cubenol	3,7	SO
29	1667	1661	<i>allo</i> -himachalol	9,8	SO
30	1673	1670	β -bisabolol	16,7	SO
31	1686	1685	α -bisabolol	3,6	SO
32	1694	1690	<i>trans</i> - α -bergamotol	3,5	SO
33	1715	1713	14-hidróxi- α -humuleno	7,7	SO
34	1724	-	NI	2,8	SO
35	1729	-	NI	<1	SO
36	1751	-	NI	1,3	SO

^aIRL_{calc} = índice de retenção linear calculado em coluna HP-5. ^bIRL_{lit} = índice de retenção linear em coluna DB-5 na literatura.³⁹. ^c% = percentual da área do pico. Área mínima: 100 pA; NI: não identificado; HS: hidrocarboneto sesquiterpênico; SO: sesquiterpeno oxigenado

O óleo-resina de *C. multijuga* fracionado através de cromatografia em coluna de gel de sílica impregnada com uma solução metanólica de KOH, utilizando como eluentes hexano, clorofórmio e metanol, apresentou na fração em hexano o *trans*- β -cariofileno como constituinte majoritário, seguido de α -humuleno, γ -muuroleno, germacreno D, biciclogermacreno, α -elemeno e α -copaeno. Na fração em clorofórmio, constituída pelos sesquiterpenos oxigenados, foram identificados óxido de cariofileno, τ -muurolol, α -cadinol, δ -cadinol e *trans*- α -santalol.⁴² Dentre esses sesquiterpenos, somente o α -humuleno e o óxido de cariofileno foram identificados no estudo em questão.

Na fração volátil do óleo-resina de *C. reticulata* do estado do Pará obtida através de hidrodestilação com aparelho de Clevenger foram identificados como constituintes majoritários, para os hidrocarbonetos sesquiterpênicos, β -bisaboleno (24,91 %), *trans*- α -bergamoteno (21,99 %) e β -selineno (12,17 %). Referente aos sesquiterpenos oxigenados foram relatados somente o α -bisabolol (0,17 %) e o óxido de cariofileno (0,21 %),¹⁴ sendo esses compostos também encontrados no estudo em questão, com 3,6 % e 11,8 %, respectivamente.

O cromatograma da Figura 4 é referente à fração constituída pelos ácidos diterpênicos derivatizados com BF_3/MeOH , obtidos através da análise por CG-EM utilizando uma coluna do tipo HP-5MS, onde foram observados dez picos. Na Tabela 2 consta a composição química desta fração, onde foram tentativamente identificados como majoritários

o agatato de dimetila (27,4 %), abietato de metila (25,1 %) e 3-acetóxi copalato de metila (20,4 %). O ácido copálico, que é considerado o marcador da espécie *Copaifera*, foi encontrado em 2,1 % na sua forma metilada, o copalato de metila.

A partir do óleo-resina de *C. reticulata* investigado em estudo anterior foram isolados quatro diterpenos ácidos por cromatografia em coluna de gel de sílica de baixa pressão, onde identificaram o ácido 3- β -acetóxilabdan-8(17)-13-dien-15-óico, ácido alepteróico, ácido 3- β -hidróxilabdan-8(17)-en-15-óico e ácido *ent*-agático.⁴⁵ No nosso estudo, o único diterpeno coincidente em ambos os trabalhos foi o ácido *ent*-agático. Estas alterações já foram observadas em outras espécies de copaíba e podem ser devidas às características sazonais e climáticas, tipo e composição do solo, índice pluviométrico, entre outros fatores.⁸ Já no fracionamento do óleo-resina de *C. multijuga* através de cromatografia em coluna de gel de sílica impregnada com KOH utilizando como eluentes hexano, clorofórmio e metanol foram identificados o ácido copálico, ácido colavênico, ácido *ent*-agático, ácido hidróxicopálico e o ácido acetóxicopálico.⁴²

3.2 Isolamento dos diterpenos ácidos por CLAE-UV semipreparativa

Na Figura 5 consta o cromatograma da fração metanólica obtida por CLAE-UV semipreparativa contendo os ácidos diterpênicos, onde foi possível observar a presença de pelo menos quatro diterpenos ácidos, em condições de reciclo de solvente. Embora

Figura 4. Cromatograma da fração contendo os diterpenos ácidos derivatizados com BF_3/MeOH obtido por CG-EM com coluna do tipo HP-5MS, referente ao fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel impregnada com KOH do óleo-resina de *C. reticulata*

Tabela 2. Composição química sugerida por CG-EM da fração contendo os diterpenos ácidos derivatizados com BF₃/MeOH

Nº pico	Nome	t _R (min)	% ^a
37	copalato de metila	23,1	2,1
38	labdan-7,13-dien-15-oato de metila	23,2	1,8
39	3-hidróxicopalato de metila	23,4	9,3
40	NI	23,6	13,6
41	3-acetóxicopalato de metila	23,9	20,4
42	agatato de dimetila	24,4	27,4
43	pinifolato de dimetila	24,6	<1
44	polialtato de metila	24,9	<1
45	NI	25,6	<1
46	abietato de metila	25,9	25,1

t_R: tempo de retenção; NI: não identificado; ^a%= percentual da área do pico. Identificação foi realizada por comparação dos espectros de massas experimental com a base de dados Wiley Registry of Mass Spectral Data³⁷ e/ou NIST database³⁸ e com a literatura^{43,44}

o número de constituintes observados por CG seja maior (Figura 4), alguns dos ácidos tentativamente identificados (Tabela 2) possuem cromóforos pouco evidentes no comprimento de onda fixo escolhido para a análise, e outros saíram em co-eluição, não sendo possível caracterizá-los.

A substância referente ao pico 1 na CLAE preparativa (Figura 5) foi analisada por CG-EM (Figura 6) e, pela comparação do espectro de massas com a literatura,⁴³ foi possível sugerir o ácido *ent*-agático (t_R= 19,7 min), que possui um esqueleto do tipo labdano e o íon molecular m/z 334. A estrutura química do ácido *ent*-agático foi confirmada RMN de ¹H e ¹³C, conforme descrito no item 2.5, após a comparação dos deslocamentos químicos com a literatura.⁴⁶

Na substância referente ao pico 2 (Figura 7) foi possível sugerir o ácido poliáltico (t_R= 18,0 min) após

comparação do espectro de massas com a literatura, pois foi observado o íon molecular m/z 316, os íons característicos m/z 271 referente à perda do grupamento carboxila e o m/z 189 referente à perda do anel furânico no carbono 12, sendo esses íons já citados na literatura após o isolamento do ácido poliáltico do óleo-resina de *C. glycyarpa*.⁴⁴

A substância coletada no pico 3 (Figura 8), após comparação do espectro de massas com a literatura,⁴³ foi sugerida como sendo o ácido copálico (t_R= 17,2 min). Entre outros íons, foi observada a presença do íon molecular m/z 304 e do íon m/z 289 referente à perda da metila em C₂₀ e o íon m/z 137 como pico base. O ácido copálico foi confirmado por RMN de ¹H e ¹³C, conforme descrito no item 2.5, após comparação dos deslocamentos químicos com a literatura.⁴⁶

Figura 5. Cromatograma referente ao reciclo de solvente para o isolamento dos diterpenos ácidos obtidos por CLAE-UV preparativa com coluna Phenomenex 5 µm C18 e metanol 100 % como fase móvel

Figura 6. Cromatograma obtido por CG-EM com coluna do tipo HP-5MS, referente ao pico 1 da Figura 5 (ácido *ent*-agático) isolado da fração contendo os diterpenos ácidos por CLAE-UV semipreparativa

Figura 7. Cromatograma obtido por CG-EM com coluna do tipo HP-5MS, referente ao pico 2 da Figura 5 (ácido poliáltico) isolado da fração contendo os diterpenos ácidos por CLAE-UV semipreparativa

Figura 8. Cromatograma obtido por CG-EM com coluna do tipo HP-5MS referente ao pico 3 da Figura 5 (ácido copático) isolado da fração contendo os diterpenos ácidos por CLAE-UV semipreparativa

A substância obtida pela coleta do pico 4 (Figura 9), conforme a comparação do espectro de massas com a literatura,⁴³ foi sugerida como o ácido 3-hidróxi copálico ($t_{R=17,6}$), que possui o íon molecular m/z 320 e que não foi observado devido à perda de uma molécula de água, gerando assim o íon m/z 302.

3.3 Atividade antibacteriana do óleo-resina de *C. reticulata* e seus constituintes

O fluxograma da Figura 10 mostra o procedimento empregado para a avaliação antimicrobiana. Inicialmente, foi realizada uma avaliação preliminar da atividade antibacteriana

pelo teste de difusão em disco (antibiograma), onde foi utilizado o óleo-resina bruto e as frações contendo os hidrocarbonetos sesquiterpênicos e os diterpenos ácidos na concentração de 0,1 g/mL. A fração contendo os sesquiterpenos oxigenados não foi utilizada nesse teste, pois a massa obtida dessa fração foi muito reduzida.

De acordo com os valores dos halos de inibição (Tabela 3), foi observado que para o óleo-resina bruto e para as frações contendo os hidrocarbonetos sesquiterpênicos e os ácidos diterpênicos, ocorreu inibição somente da bactéria *S. aureus*, com halos de inibição de 13 mm, 8 mm e 10 mm, respectivamente. As bactérias *S. enterica* serovar Typhimurium, *L.*

Figura 9. Cromatograma obtido por CG-EM com coluna do tipo HP-5MS, referente ao pico 4 da Figura 5 (ácido 3-hidróxi copálico) isolado da fração contendo os diterpenos ácidos por CLAE-UV semipreparativa

Figura 10. Fluxograma para avaliação da sensibilidade das bactérias testadas frente ao óleo-resina bruto de *C. reticulata* e às frações obtidas após cromatografia em coluna de sílica gel impregnada com KOH

monocytogenes e *E. coli* se mostraram resistentes ao óleo-resina bruto e às frações testadas. Todas as bactérias analisadas se mostraram resistentes ao solvente dimetilsulfóxido (DMSO).

Os valores de referência dos halos de inibição para ampicilina (10 mg/disco) são: para halos de inibição ≤ 13 mm, as bactérias são consideradas resistentes; valores entre 14-16 mm, intermediário e para valores ≥ 17 mm, as bactérias são consideradas sensíveis.⁴⁷

O efeito antibacteriano do óleo-resina de *C. langsdorffii* foi analisado para a bactéria *L. monocytogenes* (ATCC 7644), onde para a solução do óleo-resina a 10 %, autoclavado, obteve-se um halo de inibição de 9 mm; já para as soluções a 5 % e 2,5 %, autoclavadas, e para a solução a 10 % não autoclavada, não ocorreu inibição, sendo a inibição justificada pela ação do tratamento térmico que pode ter causado alterações estruturais que potencializaram a atividade antibacteriana.⁴⁸ Já na análise da atividade antibacteriana do óleo-resina bruto de *C. multijuga* para a bactéria *S. aureus* (ATCC 25923) foi observado um halo de inibição de 13 mm,²³ ou seja, o mesmo valor observado no estudo em questão.

Para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), foi analisado o óleo-resina bruto de *C. reticulata* e as frações contendo os sesquiterpenos oxigenados e os ácidos diterpênicos. Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos

não foram analisados nesse teste, pois não foi obtido um valor satisfatório do halo de inibição no teste do antibiograma.

Conforme a Tabela 4, o óleo-resina bruto apresentou os menores valores de CIM para as bactérias gram-positivas *L. monocytogenes* e *S. aureus*, onde foi encontrado o valor de 12.500 mg/mL para ambas as bactérias. Já para a fração contendo os sesquiterpenos oxigenados, a maior atividade também foi observada para as bactérias *S. aureus* e *L. monocytogenes*, onde ambas apresentaram valores de CIM de 6.250 mg/mL. Para a fração contendo os ácidos diterpênicos, foi obtido o valor de CIM de 6.250 mg/mL para *S. aureus* e 20 mg/mL para *L. monocytogenes*. Dentre as classes de metabólitos de *C. reticulata* avaliadas, a que apresentou melhor atividade foi a dos ácidos diterpênicos, especificamente para a bactéria gram-positiva *L. monocytogenes*.

A atividade antibacteriana dos ácidos diterpênicos se deve a presença do grupo carboxila, pois conforme testes já realizados, o mascaramento do ácido carboxílico como éster metílico eliminou completamente esta atividade. Além disso, a presença de ligação dupla parece ocasionar algum aprimoramento da atividade antibacteriana.¹⁷

A atividade antibacteriana dos óleos-resinas de *C. martii*, *C. officinalis* e *C. reticulata* coletados no estado do Acre foram analisadas para bactérias

Tabela 3. Valores dos halos de inibição do crescimento (mm) para o óleo-resina bruto e frações de *C. reticulata* a 0,1 g/mL

	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>
OR	R	13	R	R
HS	R	8	R	R
DA	R	10	R	R
AMP	24	37	26	18

OR: óleo-resina bruto *C. reticulata*; HS: hidrocarbonetos sesquiterpênicos; DA: diterpenos ácidos; AMP: ampicilina (10 µg/disco); R: resistente; (-): não analisado.

Tabela 4. Resultado da CIM (µg/mL) para o óleo-resina bruto de *C. reticulata*, fração dos sesquiterpenos oxigenados e fração dos diterpenos ácidos

	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
OR	25.000	25.000	12.500	12.500
SO	12.500	12.500	6.250	6.250
Controle	R	R	3	3

OR: óleo-resina *C. reticulata*; SO: sesquiterpenos oxigenados; DA: diterpenos ácidos; Controle: penicilina G benzatina (1 mg/mL). R: resistente; (-): não analisado

gram-positivas e gram-negativas, porém foi observada boa atividade somente contra as bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus* resistente à meticilina, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*), com uma faixa de CIM de 62,5-125 µg / ml, sendo esses óleos-resinas inativos contra bactérias gram-negativas.⁸ Já no estudo em questão foi encontrado o valor de 12.500 mg/mL, porém, essas alterações na atividade antibacteriana do óleo-resina de espécies de *Copaifera* são comuns, pois a composição química do óleo-resina varia devido às características climáticas, entre outros fatores.⁸

A atividade antibacteriana do óleo-resina bruto de *C. langsdorffii* foi testada para as bactérias *S. aureus* (ATCC 9144 e ATCC 6538) e *E. coli* (ATCC 14958), porém foi observado que o óleo-resina dessa espécie foi inativo para essas bactérias, pois obtiveram valores de CIM acima de 200 mg/mL.²⁵

Para as bactérias *E.coli* e *S. enterica* serovar Typhimurium pertencentes à classe das bactérias gram-negativas foram obtidos valores de CIM entre 25.000 e 12.500 mg/mL. Resultado semelhante já havia sido observado na literatura, onde após análise da atividade antibacteriana do óleo-resina bruto de *C. langsdorffii* para a bactéria *E. coli* (ATCC 10538), também não foi obtida inibição, o que se justifica pelo fato das bactérias gram-negativas serem mais resistentes à ação de antibióticos devido à presença de uma membrana interna, que impede a entrada de substâncias com tamanho molecular maiores que 600 Da.⁴⁹ Assim sendo, a avaliação da atividade antibacteriana dos ácidos diterpênicos isolados somente se deu para as bactérias gram-positivas.

Conforme a Tabela 5, na avaliação da atividade antibacteriana dos ácidos diterpênicos isolados, o ácido copálico apresentou um valor de CIM de 0,01 mmol/L para a bactéria *L. monocytogenes*, sendo esse composto o mais ativo quando comparado

aos demais. Já para *S. aureus*, o ácido copálico apresentou valor de CIM de 0,04 mmol/L.

O ácido copálico isolado a partir do óleo-resina de *C. langsdorffii*, após análise da atividade antibacteriana para *S. aureus* (ATCC 6538) apresentou um valor de CIM de 0,04 mmol/L,²⁵ ou seja, o mesmo valor obtido no presente estudo. Já na análise da atividade antibacteriana do ácido copálico para a bactéria *E. coli* (ATCC 14958), não foi observada inibição.²⁵

Para o ácido ent-agático, a maior atividade foi observada para a bactéria *L. monocytogenes*, com CIM de 0,04 mmol/L. A característica estrutural dos diterpenos que promove a atividade antibacteriana é principalmente a presença de um grupo doador de hidrogênio (COOH) que interage com os grupos fosforilados da membrana da célula bacteriana. No entanto, a presença de um segundo grupo doador de hidrogênio, como no caso do ácido agático, parece diminuir a atividade antibacteriana dessa substância, sendo esse fato confirmado após análise da atividade antibacteriana do ácido agático para a bactéria *S. aureus* (ATCC 6538), onde não foi observada inibição.²⁵

O ácido 3-hidróxicopálico apresentou um valor de CIM de 0,39 mmol/L para *S. aureus* e 0,19 mmol/L para *L. monocytogenes*. Já o ácido poliáltico apresentou um valor de CIM de 1,58 mmol/L para *S. aureus* e 0,19 mmol/L para *L. monocytogenes*.

Na determinação do potencial antimicrobiano de compostos isolados de fontes naturais são estabelecidos critérios para os valores de CIM, onde valores de CIM abaixo de 100 µg/mL são considerados interessantes para extratos. Já para compostos isolados, são considerados promissores na busca por novos agentes antimicrobianos aqueles cuja inibição se apresente em concentrações inferiores a 10 µg/mL,⁵⁰ o que reforça que o ácido copálico é a substância mais promissora para o uso como antibiótico.

Tabela 5. Resultado da CIM (mmol/L) para os ácidos diterpênicos isolados por CLAE-UV semipreparativa para as bactérias gram-positivas *L. monocytogenes* e *S. aureus*

	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Ácido copálico ^a	0,04	0,01
Ácido ent-agático ^a	0,09	0,04
Ácido 3-hidróxicopálico ^b	0,39	0,19
Ácido poliáltico ^b	1,58	0,19
Controle	0,003	0,003

^a identificados por RMN; ^b tentativamente identificados por CG-EM; Controle positivo: penicilina G benzatina

4. Conclusão

O fracionamento do óleo-resina de *C. reticulata* foi realizado por cromatografia em coluna de gel de sílica impregnada com KOH, que possibilitou a obtenção das três classes de metabólitos que compõem o óleo-resina (hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados e os ácidos diterpênicos). Seguindo de CLAE preparativa, foi possível isolar quatro ácidos diterpênicos: ácido copálico, ácido *ent*-agático, ácido poliáltico e ácido 3-hidróxicopálico.

Na avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco frente a patógenos alimentícios, foi observada uma maior atividade para a bactéria gram-positiva *S. aureus* para todos os materiais avaliados. Posteriormente, através da análise da concentração inibitória mínima (CIM), a maior atividade foi observada para a bactéria *L. monocytogenes* pertencente à classe gram-positiva, com destaque para o ácido copálico, que pode ser uma substância alternativa para a crise mundial de resistência aos antibióticos.

Ressaltamos ainda que, de acordo com a literatura científica, ainda não havia sido relatada a atividade antibacteriana de um composto isolado do óleo-resina de *C. reticulata* para a bactéria *L. monocytogenes*, sendo este resultado muito importante, pois se trata de uma bactéria causadora de vários surtos de doenças transmitidas por alimentos.

5. Referências bibliográficas

- ¹Medeiros, R. S.; Vieira, G.; Almeida, D. R. A.; Fo, M. T. New information for managing *Copaifera multijuga* Hayne for oleoresin yield. *Forest Ecology and Management* 2018, 414, 85. [Crossref]
- ²Rosa, J. C.; Da Silva Gomes, A. M. Os aspectos etnobotânicos da copaíba. *Revista Geografar* 2009, 4, 59. [Crossref]
- ³Lewis, G.; Schrire, B.; MacKinder, B.; Lock, M. Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew 2005, 195. [Crossref]
- ⁴Correa, M. P.; *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Imprensa Nacional:Rio de Janeiro, 1984.
- ⁵Costa, J. A. S. *Copaifera* in Flora do Brasil 2020 em construção. Acesso em: 20 outubro 2019. [Link]
- ⁶Silva, E. S.; Mathias, C. S.; Lima, M. C. F.; Veiga Jr., V. F.; Rodrigues, D. P.; Clement, C. R. Análise físico-química do óleo-resina e variabilidade genética de copaíba na Floresta Nacional do Tapajós. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 2012, 47, 1621. [Link]
- ⁷Sachetti, C. G.; Fascinelli, M. L.; Sampaio, J. A.; Lameira, O. A.; Caldas, E. D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2009, 19, 937. [Link]
- ⁸Santos, A. O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2008, 103, 277. [Crossref]
- ⁹Food Chemical Codex, 2nd ed., Washington, 1972, 218. Disponível em: <<https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/004/nas.food.1972.pdf>>. Acesso em: 14 março 2020.
- ¹⁰Lima, M. C. F.; Silva, L. S.; Veiga Jr., V. F.; Wiedemann, L. S. M. Quantification of β -caryophyllene and caryophyllene oxide for quality control of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne). *Brazilian Journal of Development* 2020, 6, 608. [Link]
- ¹¹Gomes, N. M.; Rezende, C. M.; Fontes, S. P.; Matheus, M. E.; Fernandes, P. D. Antinociceptive activity of Amazonian copaiba oils. *Journal of Ethnopharmacology* 2007, 109, 486. [Link]
- ¹²Barreto Jr. A. G.; Biscaia Jr. E. C.; Veiga Jr. V. F.; Pinto, A. C.; Carvalhaes, S. F.; Maciel, M.A.M. Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e da sacaca (*Croton cajucara*). *Química Nova* 2005, 28, 719. [Crossref]
- ¹³Ohsaki, A.; Yan, L. T.; Shigeru, I.; Edatsugi, H.; Iwata, D.; Komoda, Y. The isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorfii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1994, 4, 2889. [Crossref]
- ¹⁴Bardaji, D. K. R.; Silva, J. J. M.; Bianchi, T. C.; Eugênio, D. S.; Oliveira, P. F.; Leandro, L. F.; Rogez, H. L. G.; Veneziaanni, R. C. S.; Ambrosio, S. R.; Tavares, D. C.; Bastos, J. K. G. Martins, C. H. *Copaifera reticulata* oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. *Anaerobe* 2016, 40, 18. [Crossref]

- ¹⁵Pinto, A. C.; Braga, W. F.; Rezende, C. M.; Garrido, F. M. S.; Veiga Jr. V. F.; Bergter, L.; Patitucci, M. L.; Antunes, O. A. C. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2000**, *11*, 355. [Crossref]
- ¹⁶Leandro, L. M.; Vargas, F. S.; Barbosa, P. C. S.; Neves, J. K.; Silva, J. A.; Veiga Jr. V. F. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. *Molecules* **2012**, *17*, 3866. [Crossref]
- ¹⁷Tincusi, B. M.; Jiménez, I. A.; Bazzocchi, I. L.; Moujir, L. M.; Mamani, Z. A.; Barroso, J. P.; Ravelo, A. G.; Hernández, B. V. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. *Planta Medica* **2002**, *68*, 808. [Crossref]
- ¹⁸Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C.; Patitucci, M. L. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. *Química Nova* **1997**, *20*, 612. [Crossref]
- ¹⁹Alencar, E. N.; Xavier-Junior, F. H.; Morais, A. R.; Dantas, T. R.; Dantas-Santos, N.; Verissimo, L. M.; Rehder, V. L.; Chaves, G. M.; Oliveira, A. G.; Egitol, E. S. Chemical characterization and antimicrobial activity evaluation of natural oil nano structured emulsions. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2015**, *15*, 880. [Crossref]
- ²⁰Santos, E. C. G.; Donnici, C. L.; Camargos, E. R. C.; Rezende, A. A.; Andrade, E. H.; Soares, L. A.; Farias, L. M.; Roque, C. M. A.; Almeida, M. D. Effects of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin on the cell wall and cell division of *Bacillus cereus*. *Journal of Medical Microbiology* **2013**, *62*, 1032. [Crossref]
- ²¹Ziech, R. E.; Farias, L. D.; Balzan, C.; Ziech, M. F.; Heinzmann, B. M.; Lameira, O. A.; Vargas, A. C. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata*) frente a *Staphylococcus coagulase* positiva isolados de casos de otite em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **2013**, *33*, 909. [Link]
- ²²Morelli, C. L.; Mahrous, M.; Belgacem, M. N.; Branciforti, M. C.; Bretas, R. E. S.; Bras, J. Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging. *Industrial Crops and Products* **2015**, *70*, 134. [Crossref]
- ²³Mendonça, D. E.; Onofre, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba-*Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2009**, *19*, 577. [Link]
- ²⁴Pieri, F. A.; Mussi, M. C.; Fiorini, J. E.; Moreira, M. A. S.; Schneedorf, J. M. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Brazilian Dental Journal* **2012**, *23*, 36. [Crossref]
- ²⁵Abrão, F.; Costa, L. D. A.; Alves, J. M.; Senedese, J. M.; 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* **2015**, *15*, 443. [Crossref]
- ²⁶Alegbeleye, O. O.; Singleton, I.; Sant'ana, A. S. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology* **2018**, *73*, 177. [CrossRef]
- ²⁷World Health Organization, 2015. Food Safety. Fact Sheet Nº 399. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>>. Acesso em: 29 outubro 2019.
- ²⁸Anvisa, 2016. Doenças transmitidas por alimentos: informações técnicas. Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-2016>>. Acesso em: 09 outubro 2019.
- ²⁹Taylor, T. A.; Unakal, C. G.; *Staphylococcus Aureus*. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine: Bethesda, 2017. [PubMed]
- ³⁰Alves, A. R. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Fernando Pessoa, Portugal, 2012. [Link]
- ³¹Farber, J. M.; Peterkin, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiology Reviews* **1991**, *55*, 476. [PubMed]
- ³²Mead, P. S.; Griffin, P. M. *Escherichia coli* O157:H7. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. *The Lancet* **1998**, *352*, 1207. [Crossref]
- ³³Gart, E. V.; Suchodolski, J. S.; Welsh, T. H.; Alaniz, R. C.; Randel, R. D.; Lawhon, S. D. *Salmonella* Typhimurium and Multidirectional Communication in the Gut. *Frontiers in Microbiology* **2016**, *7*, 1827. [Crossref]
- ³⁴Fabrega A.; Vila J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews* **2013**, *26*, 308. [PubMed]
- ³⁵Pinto, A. C.; Antunes, O. A. C.; Rezende, C. M.; Correia, C. R. D. Separation of Acidic Components of *Vellozia flavicans* by Silica Gel/Potassium Hydroxide Chromatography. *Phytochemical Analysis* **1997**, *8*, 14. [Crossref]

- ³⁶Metcalfe, L. D.; Schmitz, A. A. Rapid Preparation of Fatty Acid Esters from Lipids for Gas Chromatographic Analysis. *Analytical Chemistry* **1961**, 33, 363. [Crossref]
- ³⁷Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edn. Wiley Interscience: New York, 1994.
- ³⁸NIST, Base de dados do National Institute of Standards and Technology. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 20 agosto 2019.
- ³⁹Adams, R. P. *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. 4th edn. Allured Publ. Corp: Carol Stream, 2007.
- ⁴⁰Van den dool, H.P.D. Kratz. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography* **1963**, 11, 463. [Crossref]
- ⁴¹NCCLS/CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antibacteriana de bactérias de crescimento aeróbico M7-A6. Pensilvânia, Estados Unidos, 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/servicos/medicamentos/manuais/clsi/clsi_OPASM7_A6.pdf>. Acesso em: 8 outubro 2019.
- ⁴²Gomes, N. M.; Rezende, C. M.; Fontes, S. P.; Matheus, M. E.; Pinto, A. C.; Fernandes, P. D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. *Journal of Ethnopharmacology* **2010**, 128, 177. [PubMed]
- ⁴³Pereira, M. H. T.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2011. [Link]
- ⁴⁴De Souza, P. A.; Rangel, L. P.; Oigman, S. S.; Elias, M. M.; Ferreira, P. A.; De Lucas, N. C.; Leitão, G. G. Isolation of Two Bioactive Diterpenic Acids from *Copaifera glycyarpa* Oleoresin by High-speed Counter-current Chromatography. *Phytochemical Analysis* **2010**, 21, 539. [PubMed]
- ⁴⁵Geris, R.; Silva, I. G.; Da Silva, H. H. G.; Barison, A.; Rodrigues-Filho, E.; Ferreira, A. G. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, culicidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **2008**, 50, 25. [Crossref]
- ⁴⁶Romero, A. L.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2007. [Link]
- ⁴⁷Anvisa, 2005. Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_ref_testes_diluicao_modulo4.pdf>. Acesso em: 29 outubro 2019.
- ⁴⁸Pieri, F. A.; José, R. M.; Galvão, N. N.; Nero, L. A.; Moreira, M. A. S. Antimicrobial activity of autoclaved and non autoclaved copaíba oil on *Listeria monocytogenes*. *Ciência Rural* **2010**, 40, 1797. [Crossref]
- ⁴⁹Masson, D. S.; Salvador, S. L.; Polizello, A. C. M.; Frade, M. A. C. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorfii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **2013**, 15, 664. [Crossref]
- ⁵⁰Ríos, J. L.; Recio, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, 100, 80. [Crossref]