



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

**VARIABILIDADE QUÍMICA E ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE *Copaifera langsdorfflii* Desf. EM DIFERENTES FASES FENOLÓGICAS EM
CERRADÃO NO NORDESTE, CEARÁ, BRASIL.**

LIANA GERALDO SOUZA DE OLIVEIRA

CRATO – CE

- 2015 –

LIANA GERALDO SOUZA DE OLIVEIRA

**VARIABILIDADE QUÍMICA E ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE *Copaifera langsdorffii* Desf. EM DIFERENTES FASES FENOLÓGICAS EM
ÁREAS DE CERRADÃO, NORDESTE, CEARÁ, BRASIL.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como requisito para obtenção do título de mestre em Bioprospecção Molecular.

Orientadora:

Profa. Dra. Marta Maria de Almeida Souza

Co-orientador:

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

CRATO – CE

- 2015 –

Oliveira, Liana Geraldo Souza de.
O48v Variabilidade química e antibacteriana dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii* Desf. em diferentes fases fenológicas em áreas de cerradão, Nordeste, Ceará, Brasil/ Liana Geraldo Souza de Oliveira. – Crato-CE, 2015
65p.

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria de Almeida Souza

Co-orientador: Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

1. *Copaifera langsdorffii*; 2. Fenofase; 3. Óleo-resina
4. Sazonalidade; 5. Título.

CDD: 615

LIANA GERALDO SOUZA DE OLIVEIRA

**VARIABILIDADE QUÍMICA E ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE *Copaifera langsdorffii* Desf. EM DIFERENTES FASES FENOLÓGICAS EM
ÁREAS DE CERRADÃO, NORDESTE, CEARÁ, BRASIL.**

DEFESA EM: 23 de janeiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Marta Maria de Almeida Souza
Universidade Regional do Cariri – URCA
(Orientadora)

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa
Universidade Regional do Cariri – URCA
(Co-orientador)

Dr. Everardo Valadares de Sá Barretto Sampaio
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
(Membro Externo)

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
Universidade Regional do Cariri – URCA
(Membro Interno)

Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva
Universidade Regional do Cariri – URCA
(Membro Suplente)

*Aos meus Pais, Luiz Geraldo de Oliveira e Maria Lúcia Pereira Souza de Oliveira
por todo incentivo e dedicação.*

Ao meu esposo Sonístenes Campelo Filho pela compreensão e apoio.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre guiar e iluminar meu caminho!

Aos meus pais, Luiz Geraldo e Mária Lucia Pereira por serem amorosos, compreensíveis e dedicados! Obrigada pelas orações!

Ao meu irmão, Luciano Geraldo Souza de Oliveira pela sua alegria, amizade, confiança e amor.

Aos meus familiares, sempre presentes que contribuíram muito ao longo da minha vida através de grande apoio e muitas lições, em especial agradeço ao meu tio Sandres Pereira e a minha querida avó Cecília Felix.

Ao meu marido Sonístenes Gomes de Figueiredo Campelo Filho, pelas palavras de motivação, além de toda paciência e companheirismo! O seu amor e apoio são fundamentais. Obrigada por tudo!

À minha Orientadora Marta Maria de Almeida Souza pela sua orientação, amizade, incentivo e compreensão, pelas suas críticas e elogios, os quais foram fundamentais para a realização desse trabalho e crescimento pessoal. Obrigada por me ensinar que devemos seguir sempre em frente independente dos obstáculos, sem nunca pensar em desistir! Serei eternamente grata!

Ao Co-orientador José Galberto Martins da Costa, pela valiosa contribuição e confiança! Agradeço principalmente por me permitir participar mais uma vez do seu grupo de pesquisa, sempre ajudando para que tudo fosse possível. Seus ensinamentos foram e sempre serão muito importantes! Obrigada por toda motivação!

À Fabiola Rodrigues por todo ensinamento e disponibilidade em ajudar no que fosse preciso! Serei eternamente grata pela sua contribuição!

Ao Dr. Afrânio Aragão Craveiro, diretor do parque de desenvolvimento tecnológico-PADETEC, pela realização das análises cromatográficas.

Aos professores Dr. Irwin Rose Alencar Menezes e Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva, pela colaboração para este trabalho, principalmente pelas sugestões.

Aos professores Dr. Everardo Valadares de Sá Barretto Sampaio, Dr. Irwin Rose Alencar Menezes e Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva por aceitarem participar da banca examinadora, obrigada por contribuírem para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Corpo Docente que compõem o Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular pelo trabalho indispensável para todos os alunos!

Aos Coordenadores, Prof. Dr. Allysson Pontes Pinheiro e Dr. Irwin Rose Alencar Menezes, pelo acolhimento durante todo o tempo que estive vinculada ao Programa.

As secretárias, Maria Andecieli Rolim de Brito e Maria Lenira Pereira, que sempre estiveram dispostas a ajudar.

Ao motorista Frederico “Fred”, pela paciência e disponibilidade em ajudar. Obrigada por tudo!

À equipe do Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima, pela colaboração e identificação da espécie em estudo em especial, Ana Cleide (Aninha) pela preciosa ajuda! Obrigada pela paciência!

As alunas de iniciação científica, Bianca Vilar, Maria Oliveira, Janaine Camilo, Jessica pela ajuda e companheirismo, vocês foram fundamentais para a realização dessa pesquisa.

Aos anjos Daiany Ribeiro, Walmir Miranda, Stefânio Barreto, Samara Brito e Fábio Rodrigues, pela grande ajuda dedicação e amizade, obrigada por estarem presentes nos momentos mais difíceis. Serei eternamente grata!

Ao seu Cícero e Dona Maria por todo acolhimento, compromisso e honestidade! Vocês foram essenciais para a realização desse trabalho!

As queridas amigas Manuele Eufrásio, Soraya Macedo, Camila Nobre, Débora Odília, Janaine Camilo, Karla Jaqueline e Irismã por todos os momentos felizes vividos!

Aos amigos do Laboratório de Botânica-LAB e do Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais-LPPN.

À Universidade Regional do Cariri – URCA pelo espaço cedido durante minha permanência na instituição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior - CAPES, por ter colaborado financeiramente durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

Que Deus ilumine e proteja a todos! Obrigada!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Variação dos compostos químicos relacionados aos fatores ambientais	15
2.2 Óleo essencial de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	17
2.2.1 <i>Copaifera langsdorffii</i>	17
2.2.2 Óleo-resina de <i>Copaifera langsdorffii</i>	18
2.2.3 Óleo essencial de <i>Copaifera langsdorffii</i>	19
2.2.4 Atividades biológicas do óleo-resina do gênero <i>Copaifera</i>	21
2.2.4.1 Atividade antibacteriana do gênero <i>Copaifera</i>	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Área de estudo	27
3.2 Identificação do material botânico	27
3.3 Fenologia.....	29
3.4 Coleta do óleo-resina	29
3.5 Obtenção dos óleos essenciais	30
3.6 Análise da composição química	30
3.7 Avaliação da atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM)	30
3.8 Avaliação da atividade moduladora por contato direto	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Fenologia de <i>Copaifera langsdorffii</i>	33
4.2 Rendimento da composição volátil	35
4.3 Análise da composição química	37
4.4 Valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de <i>Copaifera langsdorffii</i>	43
4.5 Atividade moduladora do óleo essencial de <i>Copaifera langsdorffii</i>	45
5 CONCLUSÃO	48

REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	64
ANEXO A - Documento de autorização para coleta do material vegetal na Chapada do Araripe	65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização geográfica da área de estudo na Chapada do Araripe, Crato, Ceará, Brasil. 28
- Figura 2.** Fenofases em *Copaifera langsdorffii* em uma área conservada e uma antropizada de cerrado em Crato, CE..... 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento mensal dos óleos essenciais de <i>Copaifera langsdorffii</i>	36
Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais de <i>Copaifera langsdorffii</i> coletados em uma área conservada (C) e uma antropizada (A) de cerrado, em Crato, CE.....	38
Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de <i>Copaifera langsdorffii</i> coletados em uma área conservada (C) e uma antropizada (A) no período chuvoso e de estiagem.....	44
Tabela 4. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) de aminoglicosídeos na ausência e presença do óleo essencial de <i>Copaifera langsdorffii</i> provindos da área da área conservada (C) e antropizada (A) no período chuvoso.....	47
Tabela 5. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) de aminoglicosídeos na ausência e presença do óleo essencial de <i>Copaifera langsdorffii</i> provindos da área da área conservada (C) e antropizada (A) no período de estiagem.....	47

RESUMO

O conhecimento dos fatores que determinam a variabilidade química de cada espécie vegetal é muito importante, principalmente para aquelas de interesse medicinal. *Copaifera langsdorffii* Desf. possui elevado número de propriedades terapêuticas atribuídas ao óleo-resina dos troncos. A ação antibacteriana tem mostrado resultados contraditórios, provavelmente ocasionados pelos fatores ambientais e fisiológicos em que as plantas se encontram. O perfil químico de *C. langsdorffii* foi determinado em duas áreas de cerrado (conservada e antropizada em diferentes fases. As fenofases vegetativa (queda foliar e brotamento) e reprodutiva (floração e frutificação) foram quantificadas pelo índice de intensidade de Fournier de agosto de 2013 a julho de 2014. Para obtenção dos óleos essenciais, os óleos-resina foram submetidos ao processo de hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger adaptado. As caracterizações químicas dos componentes dos óleos essenciais foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). A concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial foi obtida usando o método de microdiluição em caldo nas concentrações de 512 a 8 µg/mL. Para avaliar o óleo como potencializador da resistência de antibióticos da classe aminoglicosídeos foram utilizados as linhagens bacterianas que obtiveram CIMs ≤ 512 µg/mL nas concentrações de 2,500 a 2,5 µg/mL. A fase reprodutiva ocorreu apenas na área antropizada. A queda foliar foi a única fenofase a apresentar correlação com a pluviosidade. Os óleos essenciais das duas áreas tiveram rendimentos variando de 5,1 a 28,8%; com maiores rendimentos no final do período chuvoso coincidindo com a fenofase de frutificação na área antropizada e presença de apenas folhas na área conservada. Foram identificados 42 constituintes químicos, sendo 27 comuns para as duas áreas. Observou-se variabilidade na composição e concentração dos compostos, influenciada pela sazonalidade e/ou pela fenologia. Os principais constituintes foram β -cariofileno, α -humuleno, germacreno B e o óxido de cariofileno os quais apresentaram alterações nos teores durante todas as coletas, acarretando diferentes resultados antibacterianos. Na estação chuvosa os óleos essenciais apresentaram melhores atividades contra a Gram-negativa *E. coli* enquanto que no período de estiagem foram para *S. mutans* e a multirresistente *E. coli* 27. Na associação do óleo essencial com os antibióticos aminoglicosídeos houve atividade sinérgica e antagônica.

Palavras-chave: *Copaifera langsdorffii*, fenofase, óleo-resina, sazonalidade, área conservada, área antropizada.

ABSTRACT

know the factors that determine the chemical variability of each plant species is very important particularly for those of the medical interest. *Copaifera langsdorffii* Desf. has high number of therapeutic properties attributed to the oil-resin of the stem. The antibacterial action has shown contradictory results, probably caused by environmental and physiological factors in which the plants are. The chemical profile of *C. langsdorffii* was determined in two areas of Brazilian cerrado (preserved and anthropized at different stages). The vegetative phenophases (leaf fall and sprouting) and reproductive (flowering and fruiting) were quantified by Fournier intensity between August 2013 to July 2014. For extraction of essential oils, resin oils were subjected to hydrodistillation process in adapted Clevenger apparatus. The chemical characterization of the essential oil components were performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). The minimum inhibitory concentration (MIC) of essential oil was obtained using the microdilution broth method in concentrations of 512 to 8mg/mL. To evaluate the oil as enhancer of aminoglycoside antibiotics resistance class bacterial strains were used which had MICs ≤ 512 mg/mL at concentrations from 2.500 to 2.5mg/mL. To assess the oil as enhancer of the class of aminoglycoside antibiotics were used the lineage bacterial who obtained MICs ≤ 512 mg/mL at concentrations of 2.500 to 2.5mg/mL. The reproductive phase occurred only in anthropized area. Leaf fall was the only phenology to present correlation with rainfall. The essential oils from two areas had yields ranging from 5.1 to 28.8 %; with higher yields at the end of rainy season coinciding with fruiting phenology in the anthropized area, and in the preserved area, the presence of only leaves. Were identified 42 chemical constituents, 27 common to both areas. Was observed variability in the composition and concentration of the compounds influenced by climatic conditions and/or the phenology. The main constituents were β -caryophyllene, α -humulene, germacrene B and caryophyllene oxide, which presented alterations in the levels during all collections, leading to different antibacterials results. In the rainy season the Essential Oils presented Best Activities against Gram-negative *E. coli* while in the dry season were to *S. mutans* and multidrug-resistant *E. coli* 27. In the association of essential oil with aminoglycoside antibiotics there was synergistic and antagonistic activity.

Key words: *Copaifera langsdorffii*, phenology, oleoresin, seasonality, conserved area, anthropized areas.

1 INTRODUÇÃO

Muitas comunidades tradicionais possuem uma vasta farmacopeia natural devido à variedade de recursos vegetais, que são muitas vezes utilizados como único meio terapêutico disponíveis para o tratamento e cura de enfermidades (AMOROZO, 2002; MACIEL et al., 2002). Boa parte desses recursos estão inseridos em ambientes naturais ocupados por essas populações ou em ambientes antropicamente alterados (AMOROZO, 2002).

Plantas que ocorrem em diferentes condições ambientais apresentam variação qualitativa e quantitativa dos constituintes químicos responsáveis pelas atividades biológicas (JORGE et al., 2004; DUARTE et al., 2004; LIMA et al., 2006; HIRUMA-LIMA et al., 2006; CERQUEIRA et al., 2009; ALMEIDA, 2014). Considerando que essa variação decorre da interação entre as plantas e o ambiente, a síntese de compostos químicos é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001; GOBBO-NETO; LOPES 2007).

Entre os principais fatores que interferem no conteúdo químico total e nas proporções relativas dos compostos químicos presentes em plantas estão a sazonalidade (SANTOS et al., 2009; SANTANA, 2013; ALMEIDA, 2014), o ritmo circadiano (BLANK et al., 2005, SOUZA et al., 2010), a fase fenológica (LAGO et al., 2007; MURAKAMI, 2009; INACIO, 2013), a composição do solo (DUARTE et al., 2010; BARBOSA et al., 2012; REZENDE et al., 2013) e a radiação solar (GOUINGUENÉ; TURLINGS 2002; OLIVEIRA, 2006; NASCIMENTO, 2010). É importante ressaltar que plantas encontradas em áreas antropizadas estão excessivamente expostas a fatores estressantes devido à modificação do habitat em que as mesmas estão inseridas, ocorrendo aumento dos níveis de luz, temperatura, umidade e vento nos locais afetados (PRIMACK; RODRIGUES 2001).

O conhecimento dos fatores que determinam a variabilidade química de cada espécie vegetal é muito importante, principalmente, para aquelas de interesse comercial e medicinal, colaborando com o aperfeiçoamento das condições de cultivo e o estabelecimento da época de colheita para a obtenção de produtos com concentrações desejáveis de compostos químicos que se adequem as necessidades do mercado e das comunidades (FIGUEIREDO et al., 2009). Entretanto, poucos são os estudos que avaliam

as variações químicas das espécies ocasionadas por fatores ambientais em conjunto com os eventos fenológicos (MURAKAMI, 2009; VALENTINI et al., 2010; INÁCIO, 2013).

Entre as espécies que apresentam grande versatilidade (ALBUQUERQUE et al., 2007; MACÊDO, 2013; RIBEIRO et al., 2014) destaca-se *Copaifera langsdorffii* Desf. com elevado número de propriedades terapêuticas atribuídas ao óleo-resina presente no tronco de seus indivíduos. Entre as principais atividades descritas para este exsudato, à ação antibacteriana tem mostrado resultados contraditórios. (SANTOS et al., 2008; MENDONÇA; ONOFRE, 2009; MASSON, 2011; PIERI, et al., 2012a). A ausência de reprodutibilidade da atividade antibacteriana de diferentes espécies vegetais pode estar associada aos diferentes fatores ambientais e fisiológicos em que os indivíduos se encontram, podendo alterar a composição química da planta (INACIO, 2013).

Considerando a importância medicinal dessa espécie para as comunidades e a escassez de pesquisas referentes à composição química do óleo essencial do óleo-resina em diferentes fases fenológicas e seu efeito no potencial antibacteriano, esse estudo tem como objetivo contribuir com informações sobre o perfil químico de *C. langsdorffii* durante um ano em uma área conservada e outra antropizada, avaliando as variações químicas durante as fases fenológicas e em períodos sazonais distintos, verificando a atividade antibacteriana dos óleos provindos de cada área.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Variação dos compostos químicos relacionados as fenofases e aos fatores ambientais

A produção de compostos químicos durante o desenvolvimento das plantas pode ser afetada pela temperatura, precipitação, ventos fortes, altitude, solo, radiação, época de coleta e outros fatores de estresse (GOBBO NETO; LOPES, 2007; LIMA et al., 2003), podendo ocasionar variabilidade no conteúdo total bem como nas proporções relativas dos compostos químicos, principalmente de óleos essenciais. Essa variação tem grande importância porque as substâncias químicas presentes nos óleos têm significado biossistemático, fisiológico, ecológico, terapêutico e implicações evolutivas (GERSHENZON et al. 1978; BAKKALI et al., 2008; EDRIS, 2007; LAHLOU, 2004).

Os efeitos da sazonalidade em plantas anuais podem ser confundidos com alterações metabólicas sob controle do processo de desenvolvimento vegetal, controlado por processos fisiológicos. Desta forma, é importante ressaltar que alguns fatores apresentam correlações entre si e não atuam isoladamente, podendo influir em conjunto na composição química, como por exemplo, a fase fenológica e sazonalidade (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

O desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, assim como o período de ocorrência, intensidade e duração das fenofases de floração e frutificação são irregulares, variando entre espécimes e dentro de um mesmo indivíduo. Essa variação é ocasionada pela interação de fatores abióticos e bióticos (SILVA, 2005). Os fatores abióticos consistem em disponibilidade hídrica e irradiação luminosa (OPLER et al., 1976; REICH; BORCHERT 1984; WRIGHT; VAN SCHAIK, 1999), enquanto que os bióticos incluem reprodução cruzada entre indivíduos, abundância de polinizadores dispersores e predadores de sementes (SNOW, 1965; TOREZAN-SILINGARDI, 2007).

Os fatores ambientais que interferem na produção e concentração de compostos químicos assim como nos eventos fenológicos, em áreas antropizadas são potencialmente amplificados como maior incidência de luz, ventos, temperatura, ataques de herbívoros e patógenos e variações na estrutura física do solo. Estas mudanças podem acarretar na evolução de algumas plantas em resposta a condições ambientais sob as quais viveram ao longo do tempo resultando em grande variabilidade genética, o que pode promover

diferenças químicas intraespecíficas nos óleos voláteis de plantas da mesma espécie (LAHLOU, 2004). Esta situação é evidenciada em *Lippia alba*, encontrada em diferentes localidades geográficas sob influência de diferentes tensões ambientais, isto ocasionou variação da composição química dos óleos essenciais, de acordo com o local de ocorrência da espécie, ao ponto de ter sido sugerido a nomenclatura de quimiotipos separados por seus elementos químicos predominantes (TAVARES, 2005). A incidência e ataques de herbívoros e patógenos estão também relacionados com a variação química de óleos essenciais. Um exemplo seria a produção de β -cariofileno que é particularmente efetivo contra lepidópteros e de seu óxido, que atua diretamente na inibição de fungos (WANG; LANGENHEIM, 1990).

Entre os estudos considerando as variações químicas ocasionadas por fatores ambientais, em conjunto com os eventos fenológicos, podem ser referidos os realizados com *Chromolaena laevigata* (MURAKAMI, 2009), *Hypericum perforatum* (SCHWOB et al., 2004) e *Guarea macrophylla* (LAGO et al., 2007). Os óleos essenciais das duas primeiras espécies extraídos das folhas na fenofase de frutificação e de *G. macrophylla* também da fenofase de floração apresentaram maior número de compostos químicos em relação a quantidade de constituintes identificados nos outros eventos fenológicos. Tais resultados podem estar relacionados com o favorecimento da polinização e dispersão (LAGO et al. 2007), já que a produção de compostos voláteis, como os terpenos oxigenados, são reconhecidos pelo aparelho olfativo de alguns agentes polinizadores (GERSHENZON; DUDAREVA 2007). Pesquisa realizada com *Lippia alba* em condições de cultivo semelhantes demonstrou que o rendimento do óleo e os teores dos componentes majoritários são maiores na fase de crescimento vegetativo (TAVARES et al., 2005).

Vários trabalhos associam as variações químicas aos eventos de variações sazonais (MACHADO et al., 2003; FRIZZO et al., 2004; SCHWOB et al., 2004; BARROS, ZAMBARBA, HEINZMANN, 2009; BARBOSA et al., 2012; SILVA et al., 2013). Entretanto, no estudo de Oliveira et al.(2006), os óleos essenciais de óleo-resinas extraídos de *Copaifera reticulata*, *Copaifera duckei* e *Copaifera martii* apresentaram variações das concentrações das substâncias independentemente do período de chuvas, embora os maiores teores do composto β -cariofileno tenham sido observados em março a abril, período de maior precipitação pluviométrica.

Considerando a sazonalidade (estações seca e chuvosa) em três áreas em São Paulo (duas áreas de floresta estacional semidecídua e uma área de cerrado *strictu sensu*),

Almeida et al. (2014) compararam os perfis fitoquímicos dos óleos essenciais das folhas de *C. langsdorffii*. As plantas das florestas estacionais semidecíduais mostraram diferenças no perfil fitoquímico obtido em períodos secos e chuvosos. Os teores de monoterpenos e sesquiterpenos diminuíram na estação chuvosa. No cerrado *strictu sensu* não houve diferenças significativas na composição química dos compostos voláteis. Os mesmos autores concluíram que fatores ecofisiológicos devem ser considerados ao se discutir variações químicas em plantas, já que a sazonalidade não foi a principal causa da variação total do teor dos óleos essenciais das folhas de *C. langsdorffii*, em diferentes formações do cerrado.

Sabendo-se dos inúmeros fatores que podem levar a variação qualitativa e quantitativa de compostos químicos, fica clara a necessidade de estudos visando detectar as condições e épocas para cultivo e/ou coleta que conduzam a uma matéria-prima vegetal com concentrações desejáveis de princípios ativos (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

2.2 Óleo essencial de *Copaifera langsdorffii* Desf.

2.2.1 *Copaifera langsdorffii*

Copaifera langsdorffii Desf. é uma espécie arbórea pertencente a família Fabaceae, (Leguminosae), encontrada desde o nordeste da Argentina até a Venezuela (ALMEIDA et al., 1998; LORENZI, 2000). No Ceará, *C. langsdorffii* cresce nas caatingas do sul do estado e sobre a Chapada do Araripe (BRAGA, 1976), onde é conhecida popularmente como pau d'óleo ou podói. Nas demais regiões é chamada vulgarmente de copaíba, cupaúba e cupiúva (CORRÊA, 1984; LORENZI, 1992). *C. langsdorffii* é uma espécie adaptável às condições edáficas, ocorrendo tanto em áreas de solo fértil e bem drenado quanto em áreas de solo pobre, ácido e álico do Cerrado. É uma espécie heliófita não pioneira, podendo ser utilizada em programa de recuperação de áreas desmatadas ou em matas com dossel em fechamento (SALGADO et al., 2001).

No Brasil estudos da organização de comunidades vegetais que continham indivíduos de *C. langsdorffii* demonstraram variação dos parâmetros fitossociológicos (frequência, densidade e dominância) entre as fitofisionomias e entre diferentes regiões. Em Tocantins, apresentou valores de densidade e dominância relativas de 0,30 e 0,05%, respectivamente (BRITO et al., 2008). No Mato Grosso (KUNZ et al., 2009) apresentou

valores de frequência, densidade e dominância relativas de 1,9, 3,1 e 5,8% respectivamente, enquanto em Minas Gerais (ALVES et al., 2013) foram obtidos 1,4, 1,0 e 3,4%, e no Paraná (QUIQUI et al., 2007) de 1,1, 0,4 e 0,1%.

Levantamentos e inventários florísticos no nordeste registram a ocorrência do pau d'óleo em Pernambuco (COSTA; JUNIOR, 2008), Piauí (ALVES et al., 2013), Maranhão (CONCEIÇÃO; CASTRO, 2009) e Ceará (MACÊDO, 2014). No Maranhão a espécie foi considerada rara apresentando dominância de 0,07%, densidade de 0,04% e frequência de 0,12%. No Ceará, os indivíduos encontrados no cerrado *sensu stricto* da Chapada do Araripe apresentaram valores superiores, com dominância de 6,35%, densidade de 3,47% e frequência de 5,39% (MACÊDO, 2014).

Na maioria dos estudos etnobotânicos, *C. langsdorffii* é uma das plantas mais citada pelas populações entrevistadas, devido os benefícios oferecidos pelo óleo-resina (ALBUQUERQUE; ANDRADE 2002; PASA, 2005; RIBEIRO, 2014; FERNANDES, 2014). O óleo de copaíba como é popularmente chamado (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002) é um fitoterápico utilizado para os tratamentos de gripes, tosses, resfriados, dores no corpo, feridas abertas, quebras e alergias (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002; PASA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2014).

2.2.2 Óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*

O óleo-resina é encontrado em pequenas bolsas distribuídas nas folhas e no xilema primário, cuja secreção ocorre em canais axiais do tipo esquizógenos, formados a partir do afastamento das células parenquimáticas (MARCATI et al., 2001). Esses canais são organizados na posição vertical e interconectados de tal forma que o óleo-resina drena quando um deles é perfurado (ALENCAR, 1982; SAMPAIO, 2000). É extraído através de três métodos, por meio da extração tradicional, no qual uma grande abertura do tronco da árvore é realizada, o que inutiliza a planta e desperdiça grandes quantidades de óleo, pela extração total que retira todo o óleo a partir de árvores derrubadas e abertas e pela extração racional através de uma pequena abertura no tronco da árvore utilizando-se um trado onde é inserido um cano que conduz o óleo para o exterior, facilitando futuras extrações e que é a mais adequada, podendo ser realizada de modo sustentável, (ALENCAR, 1982).

Resultante da desintoxicação do organismo vegetal o óleo-resina funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias (ALENCAR, 1988). Esse exsudato é utilizado como medicamento natural pela população nativa dos locais de sua ocorrência, com relatos sobre esta prática desde o século XVI (VEIGA JR ; PINTO, 2002). Além de ser utilizado na qualidade de componente de produtos, tais como pomadas e xaropes, é também consumido *in natura*, por administração oral ou aplicação tópica (VEIGA JR. et al., 1997, VASCONCELOS; GODINHO, 2002).

Devido às suas aplicações medicinais, a constituição do óleo-resina extraído do tronco de *C. langsdorffii* vem sendo largamente investigada. Esse exsudato consiste de grandes quantidades de óleos voláteis (principalmente de sesquiterpenos), resinas não voláteis e pequenas quantidades de ácidos (YAMAGUCHI; GARCIA, 2012). Até o ano de 2012 foram descritos 110 sesquiterpenos e 42 diterpenos presentes nos óleos-resina das espécies do gênero *Copaifera* (LEANDRO et al., 2012).

Os principais sesquiterpenos encontrados no óleo-resina da copaíba são β -cariofileno, β -bisaboleno, α -humuleno, α e β -selineno, α -bisabolol, β -elemeno, γ -cadineno e o α -cadinol (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; OLIVEIRA et al., 2006; RAMOS, 2006; LEANDRO et al., 2012). Entre esses constituintes, o β -cariofileno é considerado um marcador químico dos óleos-resina das espécies de *Copaifera*. Os diterpenos mais presentes são os ácidos hardwíckico, colavenol, copaiferólico, calavênico, patagônico, copálico e copaiférico. O ácido copálico é usado como marcador químico do óleo-resina dessas plantas (MACIEL et al., 2002; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; ARAÚJO JÚNIOR et al., 2005). A combinação de sesquiterpenos e diterpenos pode ser responsável pela resistência da planta a ataques por insetos e bactérias (PLOWDEN, 2004).

2.2.3 Óleo essencial de *Copaifera langsdorffii*

Alguns trabalhos relatam variações na constituição química do óleo essencial entre plantas do gênero *Copaifera*, entre as diferentes partes de um espécime, em indivíduos de uma mesma população e em ambientes distintos (CASCON; GILBERT, 2000; TAPPIN et al., 2004; GRAMOSA; SILVEIRA, 2005; NASCIMENTO et al., 2012; ALMEIDA et al., 2014). A concentração e a natureza dos compostos químicos desses óleos podem variar, mas somente as classes dos sesquiterpenos e diterpenos estão presentes nos óleos

essenciais das espécies de *Copaifera* (VEIGA JUNIOR et al., 2002; NASCIMENTO, 2010).

Estudo realizado em Crato, Ceará, com óleos essenciais de todas as partes de um indivíduo de *C. langsdorffii*, identificou diferentes compostos químicos, sendo os principais: o β -cariofileno, encontrado no óleo-resina; o γ -muuroleno, nos óleos essenciais de folhas e frutos; o óxido cariofileno, nos óleos oriundos das cascas do fruto, raiz e tronco; o β -bisabolol, no óleo da casca do tronco; o caureno, no tronco; e o caurenal, na casca do tronco (GRAMOSA; SILVEIRA, 2005).

Em estudo realizado por Souza (2011) com um indivíduo de *C. langsdorffii* foram comparadas as constituições químicas das folhas, no óleo-resina e no seu respectivo óleo essencial. No óleo-resina, os diterpenos foram os principais constituintes, enquanto seu óleo essencial foi constituído principalmente de sesquiterpenos, com destaque para o β -cariofileno. No óleo essencial das folhas também foram presentes o germacreno D e biciclogermacreno. Em outro estudo com o óleo essencial extraído das folhas a composição foliar foi semelhante à da parte volátil sesquiterpênica do óleo-resina, com substâncias como β -cariofileno, cadinol, germacreno D e B e γ -cadineno (SILVA et al. 2006).

Para diferentes indivíduos, os resultados mostraram elevada variabilidade intra-populacional na composição e concentração dos compostos químicos dos óleos essenciais extraídos dos diferentes órgãos (folhas, pericarpo, ramo e semente) de *C. langsdorffii*, sendo os compostos principais β -cariofileno, germacreno D, espatulenol, óxido de cariofileno, iso-espatulenol e cumarina, a qual foi encontrada apenas nas sementes (NASCIMENTO, 2012). Comparando o estudo de Nascimento et al. (2012) com o de Gramosa; Silveira (2005), na Chapada do Araripe, notou-se grande diferença quantitativa entre os óleos, principalmente o óxido de cariofileno (encontrado nos óleos do pericarpo) e o γ -muuroleno (presente nos óleos das folhas) que apresentaram respectivamente valores de 47,3 e 25,2%. Enquanto que Nascimento (2012) encontrou estes compostos variando de 4,0 a 6,9% para o óxido de cariofileno, e de zero a 2,1% de γ -muuroleno.

Um estudo recente comprovou a variação química do óleo essencial das folhas de *C. langsdorffii* em três áreas no estado de São Paulo, com grande variação das classes dos voláteis. Em apenas uma área (floresta estacional semidecidual) ocorreu à presença de monoterpenos, enquanto que os óleos provindos das outras duas áreas (floresta estacional semidecidual e cerrado *sensu stricto*) foram constituídos principalmente por sesquiterpenos

(ALMEIDA et al., 2014). Nesse mesmo estudo não foi relatado a presença do β -cariofileno, tendo como majoritário na maioria das análises o sesquiterpeno germacreno D.

Os trabalhos relatados estão de acordo com Veiga Junior; Pinto (2002), pois os óleos de *C. langsdorffii* apresentaram em sua constituição as duas classes (sesquiterpenos e diterpenos) que caracterizam o óleo-resina e seu óleo essencial, havendo variações nas proporções relativas dos mesmos. Essas observações reforçam que as condições ambientais são fundamentais na determinação da natureza bem como nas proporções relativas dos compostos químicos (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

2.2.4 Atividades biológicas do óleo-resina do gênero *Copaifera*

São inúmeras as pesquisas que abordam diferentes atividades biológicas dos óleos-resina das espécies do gênero *Copaifera*, sendo aqui abordados os principais estudos sobre as atividades antiinflamatória, cicatrizante, anticancerígena, toxicidade e larvicida. Entre as propriedades medicinais dos óleos-resina, a mais estudada é a antiinflamatória (YAMAGUCHI; GARCIA, 2012). O primeiro estudo com objetivo de demonstrar essa atividade foi realizado em 1988, no qual foram testados vários óleos-resina comerciais em ratos, utilizando-se diferentes ensaios farmacológicos. Os experimentos apresentaram resultados promissores pela inibição de edema induzido por carragenina, por impedir a formação de granuloma “Cotton- pellet” além de aumentar a permeabilidade vascular (LEANDRO et al., 2012).

Ao longo do tempo diversos estudos foram realizados confirmando o potencial antiinflamatório do óleo-resina provindo de diferentes espécies do gênero *Copaifera* (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). O exsudato de *Copaifera officinalis* foi eficaz na inibição da enzima 5-lipoxigenase que desenvolve importante função na cascata inflamatória (BAYLAC; RACINE, 2003).

Estudo comparativo efetivado com os óleos-resina das espécies *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera cearenses* Huber ex Ducke e *Copaifera reticulata* Ducke, mostrou que, embora possuam características semelhantes, têm constituição química e atividade antiinflamatória diferentes (VEIGA JUNIOR et al., 2007). Os efeitos farmacológicos dos três óleos-resina foram avaliados in vitro através da medição da produção de óxido nítrico por macrófagos murinos e in vivo utilizando o modelo de pleurisia induzida por zimosano em ratos. Entre os exsudatos dessas plantas, o que possuiu

melhor efeito antiinflamatório foi o da *C. multijuga* (100 mg / kg) inibindo a produção de óxido nítrico e a pleurisia, o seu óleo-resina apresentou maiores teores do sesquiterpeno cariofileno (57,5%) e do diterpeno ácido copálico (6,2%).

O óleo-resina de *Copaifera multijuga* já tinha sido classificado por Brito et al. (2005) como um produto vegetal capaz de mitigar danos ocasionados aos rins, devido a diminuição dos níveis séricos de ureia em 24 horas e 48 horas e os de creatinina nas 48 horas após o procedimento de isquemia e reperfusão renal em ratos foram observados diminuição da permeabilidade vascular e agentes pró-inflamatórios originados pelo material vegetal da espécie. Em outro estudo, foi visto que o óleo-resina e suas frações (hexano, diclorometano e metanol) têm propriedades anti-inflamatórias contra a formação de edema induzido por carragenina e bradicinina em patas de ratos (VEIGA, JR. et al., 2006).

Estudos realizados com *C. langsdorffii* verificaram a ação antiinflamatória potente após a indução de colite pela aplicação de ácido acético nos intestinos de ratos (PAIVA et al., 2002a; PAIVA et al., 2004). Atribuiu-se a atividade antiinflamatória ao diterpeno, ácido caurenóico, presente no óleo-resina dessa espécie. Segundo Castrillo et al. (2001) esse ácido inibe a atividade de transcrição do Fator Nuclear - kB (NF-kB), uma importante molécula envolvida no processo de ativação celular na resposta imune inata. O exsudato dessa espécie foi eficaz também na redução do volume da endometriose em ratas (NOGUEIRA NETO et al., 2011).

Outra propriedade citada em estudos etnobotânicos para as espécies do gênero *Copaifera* é a atividade cicatrizante (RIBEIRO et al., 2014;), ainda que, na maioria dos estudos farmacológicos, essa atividade não tenha sido conferida pelos óleos-resina testados. O exsudato de *C. reticulata* retardou o processo de cicatrização de feridas em ratos apresentando um maior quadro inflamatório do que os animais do grupo controle (solução salina) (BRITO et al., 1998, 1999). O mesmo foi observado por Vieira et al. (2008), que descreveram que o óleo-resina de *C. langsdorffii*, na presença de corpos estranhos, prejudica o processo normal de cicatrização de feridas. O exsudato de *C. langsdorffii* apresentou atividades gastroprotetoras, por ter proporcionado a redução de feridas gástricas induzidas por etanol em ratos, através do seu efeito sobre a produção de muco antiácido (PAIVA et al., 1998).

O óleo-resina de *C. multijuga*, ao ser aplicado na cavidade peritoneal, desencadeou irritação, ocasionada por aderências e os volumes não absorvidos deste óleo tem relação

direta com a formação de abscessos cavitários em ratos (SOUZA et al., 2002). Resultado semelhante foi descrito em pesquisa utilizando-se o óleo-resina dessa mesma espécie, sendo observada macroscopicamente intensa reação irritante pleuro-pulmonar no grupo de ratos tratados com injeções intrapleurais (WESTPHAL et al., 2007).

Paiva et al. (2002b), com a mesma espécie, encontrou atividade cicatrizante de feridas em ratos tratados com seu óleo-resina. Em controvérsia, em outro experimento o óleo-resina puro de *C. langsdorffii* não se mostrou eficaz em aumentar a resistência da anastomose intestinal de ratos em processo pós-operatório (COMELLI, JR et al., 2010).

A atividade anticancerígena dos óleos-resina de algumas espécies foi conferida em diferentes experimentos. O óleo-resina de *C. langsdorffii* apresentou atividade anticancerígena contra carcinoma IMC, em camundongos (OHSAKI et al., 1994), enquanto que o fracionamento guiado por bioensaio mostrou que os diterpenos colavenol e o ácido hardwíckico apresentam potente atividade anticancerígena, sem apresentarem citotoxicidade contra as mesmas células (OHSAKI et al., 1994).

Após administração por via oral do óleo-resina de *C. multijuga* ocorreu a redução do crescimento das células de melanoma em ratos (LIMA et al., 2003). O exsudado dessa mesma espécie e suas frações (hexano e clorofórmio) demonstraram efeito significativo na inibição de tumores em ratos (GOMES et al., 2008), resultados que confirmam a sua utilização como anticancerígeno na medicina tradicional. No entanto, foi observado que o óleo-resina de *C. officinalis* estimulou o crescimento do tumor de Walker 256 inoculado na vagina e no colo do útero de ratas (BRITO et al., 2010).

A presença de atividade mutagênica e tóxica do óleo-resina de *C. langsdorffii* foi demonstrada pelo teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos (Chen-Chen; Sena, 2002). Porém, Veiga-Júnior et al. (2007) e Gomes et al. (2007) não observaram nenhum efeito citotóxico. O exsudato de *C. duckei* foi avaliado em ratos por aplicação dérmica, sendo observada toxicidade para os reticulócitos do sangue periférico e para células da medula óssea (MAISTRO et al., 2005), enquanto que em outro estudo pré-clínico com creme vaginal contendo 2,5% de óleo-resina da mesma espécie foi observada a ausência de toxicidade materna e embriofetal, na dose administrada, sendo adequado sua utilização durante a gravidez (LIMA et al., 2011).

Os efeitos tóxicos e neurotóxicos do óleo-resina de *C. reticulata* foram avaliados por administração oral em ratos, não havendo mortalidade nem mesmo nas doses mais elevadas (SACHETTI et al., 2009). Na avaliação da embriotoxicidade do óleo-resina de *C. reticulata* em ratas prenhas, o exsudato apresentou efeito tóxico para a mãe e embriotóxico, mas não foi letal em nenhuma das doses testadas (SACHETTI et al., 2011).

Atividade larvicida também foi conferida aos óleos-resina de algumas espécies como *C. reticulata*, devida seu exsudato ter sido eficaz na morte das larvas em todos os estágios testados de *Culex quinquefasciatus*, transmissora da *filariose bancroftiana* (SILVA, ZANON, SILVA, 2003). Essa mesma espécie também apresentou toxicidade contra as larvas da *Aedes aegypti* (SILVA et al., 2007).

A atividade inseticida de extratos e óleos de dezessete plantas medicinais do Brasil foram determinadas usando bioensaio larvicida com *Aedes aegypti*. O óleo-resina de *C. langsdorffii* foi classificado juntamente com outras quatro espécies (*Anacardium occidentale*, *Carapa guianensis*, *Cymbopogon winterianus* e *Ageratum conyzoides*) como um potente inseticida, apresentando CL50 de 41, 57 mg / l (MENDONÇA et al., 2005). O óleo-resina de *C. multijuga* foi testado em diferentes concentrações contra *Aedes aegypti* e *Anopheles darlingi*, tendo melhor resultado contra *A. darlingi* (TRINDADE et al., 2013).

2.2.4.1 Atividade antibacteriana do gênero *Copaifera*

A atividade antimicrobiana é uma importante propriedade atribuída ao óleo-resina das espécies de *Copaifera*, sendo comprovada por diversos estudos com diferentes cepas bacterianas (LEANDRO et al., 2012). Os exsudatos obtidos a partir de *C. martii*, *C. officinalis* e *C. reticulata* demonstraram atividade bactericida *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*, com concentrações inibitórias mínimas que variaram de 31,3 a 62,5ng/mL (SANTOS et al., 2008). Em estudo recente, o óleo-resina de *C. reticulata* exerceu atividade bacteriostática e bactericida mesmo em cepas multirresistentes de *Staphylococcus* coagulase-positiva provenientes de casos de otite externa em cães (ZIECH et al., 2013).

O óleo-resina de *C. multijuga* apresentou atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (MENDONÇA, ONOFRE, 2009). No entanto, em estudo anterior não foi observado qualquer atividade do óleo-resina dessa espécie contra *S. aureus* ou qualquer outra bactéria analisada (PACHECO, 2006).

O potencial preventivo contra doença periodontal do óleo-resina de *C. officinalis* foi avaliado por ensaios clínicos e microbiológicos com cães. O exsudato mostrou-se capaz de inibir a adesão bacteriana em dentes, podendo ser um possível substituto da clorexidina na terapia antimicrobiana oral (PIERI et al., 2010a). Em outro estudo constataram que a atividade antimicrobiana do óleo-resina de *C. langsdorffii* contra *Listeria monocytogenes* manteve-se, mesmo após a exposição a altas temperaturas em autoclave (PIERI et al., 2010b).

A atividade antimicrobiana de duas soluções que continham óleos-resina de duas espécies distintas de *Copaifera* foi testada contra 27 estirpes de *Escherichia coli* obtido a partir de leite mastítico. A solução contendo óleo-resina de *C. langsdorffii* inibiu o crescimento de oito estirpes e em outra solução contendo *C. officinalis* inibiu o crescimento de sete isolados. Os resultados sugerem que os óleos-resina provindos das espécies de *Copaifera* podem ser uma fonte potencial de novos agentes antimicrobianos (PIERI et al., 2011).

Em outro experimento, os óleos-resina de *C. officinalis* e *C. langsdorffii* inibiram três espécies Gram-negativas: *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Shigella flexneri*. Na inibição de *P. aeruginosa*, o exsudato de *C. officinalis* apresentou atividade superior a de *C. langsdorffii* ($P < 0,05$). Todas as cepas de *S. aureus* tiveram seu crescimento inibido pelas soluções no ensaio, sem diferença estatística entre os halos. De acordo com os dados os óleos-resina de copaíba podem ser uma fonte de compostos inibitórios que podem ser utilizados como antimicrobianos no tratamento de infecções humanas e animais e na conservação de alimentos (PIERI et al., 2012a).

O exsudato de *C. officinalis* apresentou atividade bacteriostática contra *S. mutans* em baixas concentrações, apresentando-se como uma opção de fitoterápico contra bactérias cariogênicas na prevenção de cáries (PIERI et al., 2012b). O óleo essencial de *C. officinalis* também apresentou alto potencial antibacteriano contra espécies de *Paenibacillus* (SANTOS et al. 2012). Atividade antimicrobiana também foi conferida ao óleo essencial de *C. langsdorffii*, que teve atividade contra *Escherichia coli* com halo de

inibição de 25mm, o mesmo obtido pelo controle positivo constituído pelo antibiótico penicilina (PAVANELI; GARCIA, 2013). Isso provavelmente pode justificar as indicações terapêuticas entre os estudos etnobotânicos e ensaios farmacológicos.

Os óleos-resina das espécies de *Copaifera* apresentam-se como fonte de novos e seletivos agentes para o tratamento de importantes doenças. No entanto, são necessários mais estudos com o objetivo de estabelecer melhores épocas de utilização, devido às variações na composição e nas concentrações, decorrentes de fatores ambientais e fisiológicos, que podem afetar significativamente as atividades biológicas. É importante considerar a espécie estudada, uma vez que existe variabilidade dos componentes do óleo-resina entre diferentes espécies e regiões (SANTOS et al., 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

A pesquisa foi realizada em duas áreas de cerrado inseridas na Chapada do Araripe, no município de Crato, Ceará, Brasil (Figura 1).

A Chapada do Araripe apresenta uma superfície tabular, conservada em um nível de 800m a 1000m de altitude (CAVALCANTI, 1994). O Latossolo Vermelho-Distrófico é predominante na área (BRASIL 1972). A precipitação total média anual é cerca de 760 mm, concentrada entre os meses de janeiro e abril (66,3%) e a temperatura média anual de 24,1°C (COSTA et al., 2004).

A área 1 trata-se de uma área de cerrado conservada conhecida por Malhada Bonita (07°21'5.0.5"S e 039°27'26.3"W), a qual está localizada na Floresta Nacional do Araripe (Flona Araripe/Apodi), a 10Km da área 2 nomeada por Barreiro Grande (07°21'37.4"S e 039°28'33.8"W) área antropizada pela atividade de manejo florestal iniciado em 2009, sendo algumas espécies preservadas por solicitação do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), entre elas *Copaifera langsdorffii*. Apresenta fisionomia de vegetação arbórea arbustiva, com indivíduos isolados ou agrupados.

3.2 Identificação do material botânico

Para identificação do material botânico foram coletadas durante o período de floração, cinco amostras férteis de *Copaifera langsdorffii* no mês de fevereiro de 2014. O material vegetal coletado foi acondicionado e tratado segundo as técnicas usuais de herborização (MORI et al., 1989). O material testemunho foi incorporado ao acervo do Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional do Cariri (HCDAL-URCA) – sob o número de tombo: 10.645.

A autorização para as atividades foi fornecida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), registrado sob o número 40171-1.

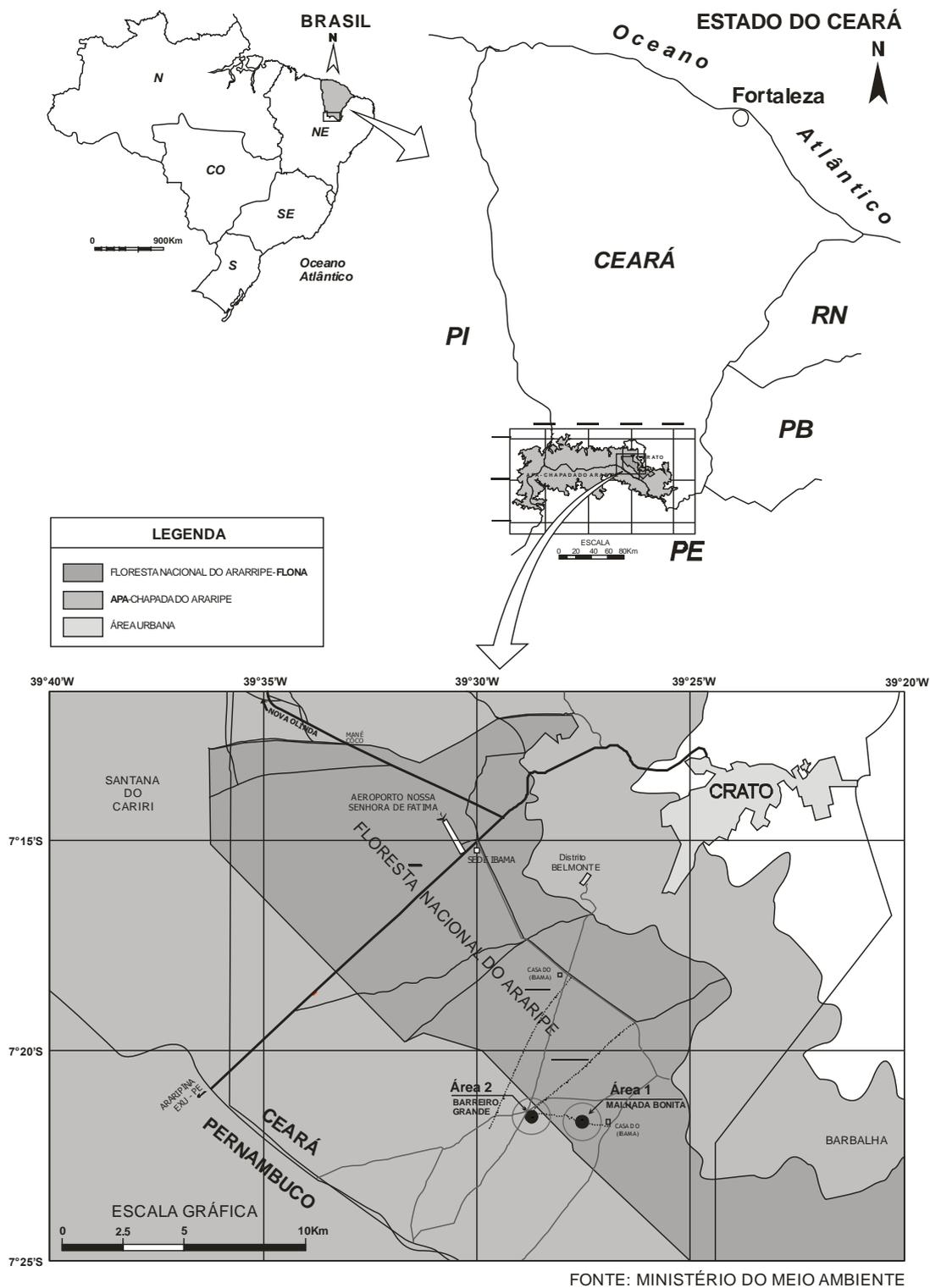


Figura 1. Localização geográfica da área de estudo na Chapada do Araripe, Crato, Ceará, Brasil.

3.3 Fenologia

Observações fenológicas foram realizadas mensalmente no período de agosto de 2013 a julho de 2014, em 10 indivíduos selecionados ao acaso em cada área, seguindo a metodologia de Fournier e Charpantier (1975). Todos os indivíduos selecionados foram marcados com etiquetas presas às árvores por fio de nylon.

As fenofases foram estimadas qualitativamente como presente ou ausente e quantitativamente pelo percentual de intensidade de Fournier. Para a intensidade das fenofases cada indivíduo foi classificado dentro de uma escala intervalar de cinco categorias: 0= ausência da fenofase; 1= presença de fenofase com magnitude de 1 a 25%; 2= presença de fenofase com magnitude de 26-50%; 3= presença de fenofase com magnitude de 51-75%; 4= presença de fenofase com magnitude de 76-100% (Fournier, 1976). A cada mês, fez-se a soma dos valores de intensidade obtidos para todos os indivíduos e dividiu-se pelo valor máximo possível. Foi calculada ainda, a correlação de Spearman (r_s) entre o percentual mensal de cada fenofase e a precipitação pluvial do mês.

As fenofases foram classificadas segundo a metodologia de Locatelli e Machado (2004), considerando-se como período de floração aquele em que os indivíduos apresentaram flores em antese; o período de frutificação, quando apresentaram frutos verdes e/ou maduros; como brotamento, quando surgiram folhas novas até $\frac{3}{4}$ do tamanho das folhas adultas; e queda de folhas, quando elas mudaram de cor e tornaram-se senescentes. Os dados de chuvas foram obtidos do posto Crato, monitorado pela Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUNCEME) referente ao posto Crato.

3.4 Coleta do óleo-resina

Para a coleta do óleo-resina foi utilizada uma árvore adulta em cada área, de aspecto visualmente saudável com DAP de 53cm na área 1 e 56cm na área 2. A extração foi feita furando o tronco da árvore com um trado de 2cm de diâmetro a uma altura de 1,30m do solo. No furo foi introduzido um pedaço de cano de PVC ($\frac{3}{4}$) para o escoamento do óleo-resina. O cano foi conectado a um recipiente coletor com capacidade de 250 ml, através de uma mangueira de plástico ($\frac{3}{4}$). De agosto de 2013 a julho de 2014, foram feitas coletas sempre nos 15 primeiros dias de cada mês. Após a coleta do óleo-resina os canos foram retirados e os furos vedados com argila. Todo óleo extraído foi acondicionado em potes de

plástico e cobertos com papel alumínio para a maior segurança no transporte ao laboratório. Este método produz pouco óleo, tem altos custos operacionais, mas preserva a árvore para colheitas futuras e é ecologicamente correto (RIGAMONTE; AZEVEDO, 2004).

3.5 Obtenção dos óleos essenciais

Foram obtidos durante um ano, 24 amostras de óleos-resina provenientes das duas áreas de estudo, as quais foram submetidas ao processo de hidrodestilação, por 2 horas, em aparelho tipo Clevenger adaptado. A mistura água-óleo foi coletada, tratada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), sendo os óleos essenciais separados e mantidos sob refrigeração a menos de 4°C até serem analisados.

3.6 Análise da composição química

As identificações dos componentes dos óleos essenciais dos óleos-resina de *C. langsdorffii* foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM), em um espectrômetro Hewlett-Packard modelo 5971, operando com energia de ionização de 70 eV. Utilizou-se coluna capilar de sílica fundida DB-5(30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura do filme) e carreador de gás hélio com fluxo de 1mL/min com split.

As temperaturas do injetor e detector foram programadas de 250°C e 200°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi determinada de 35°C a 180°C a 4°C/min e, em seguida de 180°C a 280°C a 10°C/min. Os espectros de massas foram obtidos de 30 a 450 m/z. Componentes individuais foram identificados por correspondências de seus espectros de massas com os da base de dados, bem como através de comparação visual da fragmentação padrão com aqueles relatados na literatura (ADAMS, 2001).

3.7 Avaliação da atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM)

Para o ensaio antibacteriano, foram selecionados os óleos essenciais obtidos no período chuvoso em dezembro (área 1 e 2) e na estiagem em julho (área 1 e 2) na presença foliar (área 1) e floração (área 2) no mês de dezembro e queda foliar (área 1) e frutificação (área 2) em julho.

A atividade antibacteriana do óleo essencial foi avaliada através do método de microdiluição, com base no documento M7-A6 do NCCLS (NCCLS, 2013). Foram utilizadas seis linhagens de bactérias padrão, sendo duas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 12692 e *Streptococcus mutans* ATCC 0046) e duas Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442) e duas linhagens de isolados clínicos multirresistentes (*Escherichia coli* 27 obtida de escarro e *Staphylococcus aureus* 358 de ferida cirúrgica).

Previamente aos testes, as linhagens bacterianas foram ativadas em meio Brain Heart Infusion Broth (BHI 3,8%) e mantidas a 37°C por 24 h. Após este subcultivo, o inóculo bacteriano foi padronizado a partir de uma suspensão com concentração de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL (0,5 unidades de turbidez nefelométrica-escala McFarland). Em seguida, esta suspensão foi diluída a 1×10^6 UFC/mL em caldo BHI a 10%, e volumes de 100 µL foram adicionados e então homogeneizados nos poços de uma placa de microdiluição acrescido de diferentes concentrações do óleo essencial de *C. langsdorffii*, resultando num inóculo de 5×10^5 UFC/mL. O óleo essencial foi diluído em água destilada e dimetil sulfoxido (DMSO) a uma concentração de 1.024 µg/mL. Outras diluições seriadas foram realizadas através da adição de caldo BHI com finalidade de atingir as concentrações no intervalo de 512 a 8 µg/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata, as placas de microdiluição contendo bactérias foram incubadas a 37°C por 24 h. A atividade antibacteriana foi detectada através do método colorimétrico pela adição de 25 µL da solução de resazurina sódica (0,01%) após o período de incubação (SALVAT et al., 2001). A atividade antifúngica foi avaliada através de turbidez, cada inóculo do teste que não apresentou crescimento e seus controles positivos, foram subcultivados em placas de agar sabouraud dextrose, devidamente identificadas. Após 24 horas de incubação a 36°C, as leituras das CFMs foram realizadas com base no crescimento dos controles (SHADOMY et al., 1985). A CIM foi definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento de bactérias.

3.8 Avaliação da atividade moduladora por contato direto

O teste de modulação foi realizado na presença e na ausência do óleo através de microdiluição em duplicata. Inóculos bacterianos (MIC/8) em BHI a 10% foram distribuídos em placas de microdiluição seguido da adição de 100 µL das soluções de

antibióticos (5.000 µg/mL) seguido de diluições seriadas (1:2). As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h e a leitura dos resultados foi realizada com resazurina sódica como descrito anteriormente (SAGDIC, 2005).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fenologia de *Copaifera langsdorffii*

A fase vegetativa (queda foliar e brotamento) ocorreu nas duas áreas, mas a fase reprodutiva (floração e frutificação) ocorreu apenas na área antropizada (Figura 2). A queda foliar foi observada em agosto e setembro de 2013, com intensidades de 62% (área 1) e 65% (área 2) no mês de agosto e 38% (área 1) e 40% (área 2) em setembro (Figura 2). Em 2014, essa fenofase foi observada em julho com intensidade de 30% na área 1 e de 32% na área 2. A queda foliar coincidiu com o final da estação seca estando correlacionada com a pluviosidade ($r_s = -0,67$; $p = 0,01$) não houve desfolhamento total.

Em floresta semidecídua de São Paulo, a fase de queda das folhas de *C. langsdorffii* também ocorreu no final da estação seca (julho e agosto) e foi correlacionada com a precipitação (PEDRONI et al., 2002). Segundo o mesmo autor, a troca de folhas é gradual, não havendo desfolhamento total. O mesmo foi observado na vegetação de campo rupestre em Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2013). Entretanto, em cerrado de Minas Gerais, a perda de folhas foi praticamente constante durante todo o ano com produção de folhas novas também frequentes e de baixa intensidade (FREITAS; OLIVEIRA, 2002). No mesmo estado em mata ciliar, não houve correlação entre a precipitação e queda foliar (AZEVEDO et al., 2014).

A brotação de novas folhas se deu na sequência da abscisão foliar, coincidindo com o início da estação chuvosa. Em outubro, as intensidades foram 60 e 62%, respectivamente e em novembro 45% em ambas as áreas. Esta fenofase é facilmente observada devido ao aspecto avermelhado das copas. Oliveira et al. (2013) observou que o aumento da disponibilidade de água é o fator mais influente para a ocorrência dessa fenofase, sendo o mesmo observado neste estudo. O brotamento não foi significativamente correlacionado com a pluviosidade ($r_s = -0,13$; $p > 0,01$), como também foi em floresta semidecídua de São Paulo (PEDRONI et al., 2002). Já no trabalho de Azevedo et al. (2014) o brotamento foi correlacionado com a precipitação ($r_s = -0,82$; $p < 0,05$).

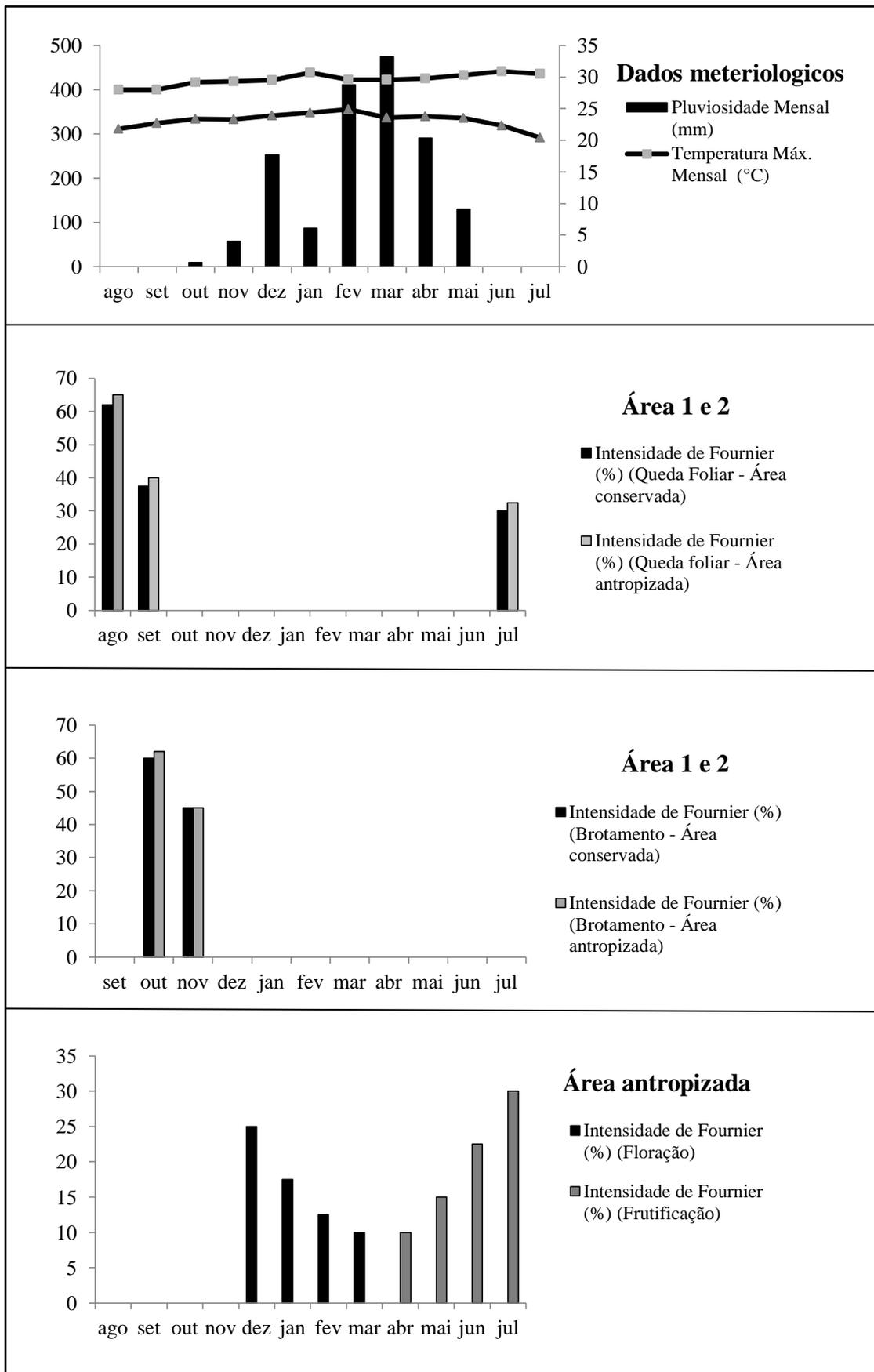


Figura 2: Fenofases em *Copaifera langsdorffii* em uma área conservada e uma antropizada de cerrado, em Crato, CE.

A fase reprodutiva ocorreu somente em 30% dos indivíduos da área antropizada. A floração foi presente em dezembro (25%), janeiro (17%), fevereiro (12%) e março (10%) de 2013 e a frutificação de abril a julho de 2014, com maior intensidade em julho (30%). A fase reprodutiva não foi significativamente correlacionada com a pluviosidade, apresentando $r_s = 0,60$ ($p > 0,01$) para floração e $r_s = 0,27$ ($p > 0,01$) para frutificação. A ausência de correlação entre a precipitação e a floração para Pedroni et al. (2002) parece contraditório, por essa espécie apresentar tendência de florar na estação chuvosa. Em relação à frutificação, o mesmo autor (PEDRONI et al., 2002), observou que essa fenofase ocorreu com anos de intensa produção de frutos, seguidos por anos de pouca ou nenhuma produção.

Em floresta estacional semidecídua em Minas Gerais, a floração teve início em meados da estação chuvosa (dezembro a fevereiro) enquanto que o desenvolvimento dos frutos ocorreu durante a estação seca (abril a setembro) (DIAS; OLIVEIRA-FILHO, 1996). Já no presente estudo a floração foi observada após o brotamento. No cerrado de São Paulo, a floração ocorreu logo após a queda de folhas, concomitantemente com o brotamento (BATALHA et al. 1997). Em florestas semidecíduas, *Copaifera langsdorffii* foi classificada como regular, devido à floração ter ocorrido sempre no período chuvoso, e supra-anual, possivelmente relacionado a existência de um padrão bi ou trienal (DIAS; OLIVEIRA-FILHO, 1996; PEDRONI et al., 2002; FREITAS; OLIVEIRA, 2002).

Por *Copaifera langsdorffii* ter apresentado comportamento supra-anual em outras áreas, pode-se supor que na área 1 a fase de floração não foi observada no ano de 2013, pela ocorrência de eventos florais anteriores.

4.2 Rendimento da composição volátil

Os óleos essenciais provindos das áreas 1 e 2 apresentaram maiores rendimentos em maio, no final do período chuvoso, com valores de 28,8 e 28,3% respectivamente coincidindo com a fenofase de frutificação na área 2 e presença de apenas folhas na área 1. Em novembro, foram obtidos os menores rendimentos nas duas áreas (6,6 e 2,1%) coincidindo com o brotamento (Tabela 1).

Os óleos essenciais obtidos das coletas na área 1 apresentaram maiores rendimento que a área 2, com exceção de agosto (9,6%), janeiro (11%) e julho (5,1%). O rendimento do óleo essencial não está relacionado com a quantidade de óleo-resina utilizado para a

extração dessa mistura. Isto ficou mais evidente em dezembro, quando foram coletadas quase as mesmas quantidades de óleo-resina nas áreas 1 (14,2g) e 2 (14,1g), mas os rendimentos foram de 28,0 e 17,0% respectivamente. Até o momento, não há como determinar os possíveis fatores que influenciam no rendimento dos óleos essenciais, sendo necessário um acompanhamento mais detalhado das variáveis ambientais para possíveis conclusões.

Tabela 1. Rendimento mensal dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii*.

Mês/Ano	Massa de óleo-resina coletada (g)		Rendimento (%)	
	Área 1	Área 2	Área 1	Área 2
Agosto 2013	4	0,8	9,6	13,3
Setembro 2013	2,7	1,1	12	8,8
Outubro 2013	2,8	1,8	11,1	7,7
Novembro 2013	14,1	9,9	6,6	2,15
Dezembro 2013	14,2	14,1	28	16,8
Janeiro 2014	2,9	3,2	11	11,2
Fevereiro 2014	10,6	3,1	23,2	11,6
Março 2014	26,1	31,5	18,4	8,4
Abril 2014	21,2	13,0	21,9	18,0
Mai 2014	18,3	21,0	28,8	28,3
Junho 2014	23,4	27,0	26,1	16,1
Julho 2014	34,7	16,7	5,1	16,4

A coleta dos óleos-resina foi maior na área 1 em julho, período de estiagem, enquanto que na área 2 foi em março, na estação chuvosa. Trabalhos realizados com o mesmo gênero têm relatado maiores produções, tanto no período chuvoso (Alencar, 1982; Carvalho et al., 2001) como no período de estiagem. Segundo Medeiros; Vieira (2008), no período chuvoso com o aumento da umidade, microrganismos, como fungos e bactérias, proliferam e aumenta a herbívora por insetos, e esses fatores podem levar as plantas a aumentar a produção de óleo-resina como uma forma de defesa. Em áreas antropizadas, essas situações podem ser mais agravantes devido a maior exposição das plantas a esses agentes (PRIMARK, 2001). Entretanto, Oliveira et al. (2006), em estudo com *Copaifera reticulata* e *Copaifera duckei* obtiveram maior produção do exsudato no período de menor precipitação pluviométrica, como foi observado na área 1. Essa elevada discrepância, na produção, entre árvores e áreas, pode estar atrelada a espécie em estudo e aos fatores

ambientais, como, os fatores edáficos. Segundo Alencar (1982), árvores em solos argilosos foram mais produtivas (39%) do que em solos arenosos (24%).

4.3 Análise da composição química

Foram identificados 42 constituintes químicos nos óleos obtidos dos materiais vegetais coletados nas duas áreas de estudo (Tabelas 2). Com exceção dos diterpenos caurano-18-al e caurano-16-eno, toda a composição química é formada de sesquiterpenos. Estes compostos são responsáveis pelo aroma característico do óleo (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002). Parece ser uma identidade química dos óleos de *C. langsdorffii* a ausência de monoterpenos em suas composições. Essa informação corrobora os resultados de Veiga Junior e Pinto (2002), Lameira et al. (2009) e Souza (2011), que constataram que os óleos-resinas das espécies do gênero *Copaifera* são caracterizados pela presença de apenas duas classes terpênicas, sesquiterpenos e diterpenos, podendo haver variações das concentrações dos compostos entre espécies e até no mesmo indivíduo.

Os maiores números de compostos químicos identificados nos óleos essenciais (15 a 21) ocorreram de março a julho, nas duas áreas, correspondendo ao período de maiores índices pluviométricos e início de estiagem (Figura 5). Na área 1, este período corresponde apenas a presença foliar e na área 2 a fenofase de frutificação. Na floração foram observados os menores números de compostos. Segundo Valentine et al. (2010), não somente no caso de metabólitos secundários voláteis, mas de modo geral, o metabolismo está associado com a adaptação da planta ao meio que habita. O estresse hídrico pode justificar o aumento de concentrações de alguns compostos químicos, como os terpenos (LOKAR et al., 1987). A formação de voláteis, em geral, parece aumentar em temperaturas altas, apesar de dias muito quentes levarem a uma perda excessiva destes metabólitos (CHENG et al., 2007).

Tabela 02: Composição química dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii* coletados em uma área conservada (C) e uma antropizada (A) de cerrado, em Crato, CE.

Composto	TR (min)	AGO 2013		SET 2013		OUT 2013		NOV 2013		DEZ 2013		JAN 2014	
		C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
aristoleno	31,7	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-	-	-	-
cicloisositiveno	32,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,6	-	-
α -ialangeno	33,0	-	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-
α -cubebeno	33,7	1,4	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -elemeno	34,2	-	2,7	3,8	-	3,3	1,1	13,2	6,8	5,1	-	3,2	-
γ -cadineno	35,4	6,1	5,7	-	13,5	-	-	-	-	2,3	1,0	-	2,2
β - cariofileno	35,9	55,1	31,3	27,6	34,5	25,3	49,1	21,2	47,5	27,3	72,2	28,3	51,1
α -copaeno	36,2	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	-	-
γ -elemeno	36,4	-	-	3,7	-	4,0	-	-	-	4,8	-	2,8	-
valenceno	36,4	-	1,8	3,7	-	3,0	1,6	-	-	1,7	-	2,9	-
α -bergamonteno	36,5	-	3,7	-	-	-	1,9	-	-	-	-	-	-
3,7 (11)-selinadieno	36,6	-	-	3,3	-	3,4	-	-	-	-	-	2,4	-
α -guaiano	36,7	-	-	-	-	-	-	13,6	2,7	-	-	-	-
α - humuleno	37,7	7,5	4,5	3,2	5,6	2,7	6,6	2,3	5,6	3,6	9,1	4,4	6,6
α -selimeno	37,9	-	2,3	4,8	-	5,3	-	6	2,1	11,9	-	11,8	3,8
α - amorfeno	39,1	5,3	7,1	2,6	9,1	3,2	2,7	-	2,8	2,7	2,8	2,7	5,9
germacreno D	39,4	10,5	1,7	-	2,1	2,5	2,5	1,5	-	6,0	1,3	2,1	3,6
β -selineno	39,7	-	5,6	8,5	-	8,5	1,2	12,3	4,4	19,7	0,7	19,9	7,9
δ -guaiano	40,4	-	-	-	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-
β -bisaboleno	40,6	-	3,6	-	-	-	7,8	-	1,3	-	-	-	-
δ -cadineno	41,1	4,4	3,2	-	4,0	-	1,0	-	-	-	1,8	-	3,5
aloaromadendreno	42,2	-	9,1	-	5,2	-	5,2	-	-	-	-	-	5,8
germacreno B	42,5	-	-	35,2	-	37,8	-	18,7	-	12,8	-	16,5	-
óxido cariofileno	43,2	6,9	17,1	2,9	21,4	-	16,2	2,8	11,7	2,3	7,1	3,2	9,5
caur-16-eno	51,6	-	-	0,7	1,5	0,9	4,6	2,8	-	-	-	-	-

Continua...

Tabela 02: Composição química dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii* coletados em uma área conservada (C) e uma antropizada (A) de cerrado, em Crato, CE.

Composto	TR (min)	FEV 2014		MAR 2014		ABR 2014		MAI 2014		JUN 2014		JUL 2014	
		C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
cicloisotaviveno	32,9	-	-	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-	0,6
α -ialangeno	33,0	-	-	3,9	4,4	1,0	1,8	1,1	0,6	0,7	-	0,4	-
α -cubebeno	33,7	-	-	3,1	3,5	0,7	1,1	-	-	0,5	-	0,4	-
β -elemeno	34,2	-	2,7	-	-	-	2,4	6,3	2,6	1,7	4,3	2,8	2,1
β - cariofileno	35,9	45,1	-	39,2	43,3	59,1	45,0	22,8	43,3	53,7	39,2	61,2	53,5
δ -elemeno	36,2	-	-	4,4	6,3	0,9	1,7	2,2	1,1	1,0	1,0	1,0	-
α -copaeno	36,2	-	-	-	-	0,7	-	1,7	1,0	1,0	1,1	0,6	0,7
γ -elemeno	36,4	-	-	-	-	-	-	4,2	-	1,8	3,5	2,2	-
α -bergamonteno	36,5	3,5	-	-	-	-	1,8	-	4,1	-	-	-	-
α -guaieno	36,7	-	-	-	-	-	2,2	2,6	-	-	-	-	-
α - humuleno	37,7	5,3	-	4,0	4,0	7,0	4,7	2,4	5,0	6,2	4,6	7,1	6,6
α -selineno	37,9	-	-	-	-	-	-	3,6	1,2	0,8	4,1	1,2	2,0
α - amorfeno	39,1	4,2	-	7,5	6,0	5,7	6,4	6,9	4,8	4,4	5,5	3,4	3,6
germacreno D	39,4	-	-	12,5	4,5	5,2	2,4	10,1	5,4	5,8	4,8	3,2	1,3
β -selineno	39,7	-	3,1	-	-	0,7	-	6,2	1,5	1,2	4,6	0,9	4,3
δ -guaieno	40,4	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	1,0
β -bisaboleno	40,6	3,8	-	-	-	-	3,0	-	7,8	1,0	2,0	0,7	-
δ -cadineno	41,1	1,6	-	3,1	1,3	4,3	3,8	6,7	4,2	3,6	4,9	2,6	-
aloaromadendreno	42,2	-	-	-	-	-	-	-	1,5	-	2,8	-	-
germacreno B	42,5	-	-	0,2	-	-	-	7,8	5,0	2,7	6,8	1,0	3,3
óxido cariofileno	43,2	21,1	72,6	7,5	16,2	6,5	6,7	1,7	3,6	3,9	2,5	3,6	6,5
junipeno	45,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5
γ -muruleno	46,1	-	-	0,6	-	1,3	3,7	-	-	-	2,4	1,3	1,4
α -muruleno	46,2	-	-	0,5	-	1,1	1,4	-	0,5	0,6	-	-	0,3
δ -muruleno	46,4	-	-	-	-	-	-	3,0	-	-	-	-	-
α -selina-4,(19),11-dieno	47,0	-	-	-	-	-	-	3,2	-	1,3	-	0,7	-
aromadendreno	47,1	-	-	-	-	-	-	2,6	0,9	1,5	2,3	0,5	-
humuladienono	48,3	-	8,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -calacoreno	48,3	-	-	0,6	-	1,1	-	-	-	-	-	-	1,0
caurano-18-al	48,7	-	-	-	1,7	-	1,3	-	-	-	-	-	-
α -cadinol	48,8	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-

Continua...

Tabela 02: Composição química dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii* coletados em uma área conservada (C) e uma antropizada (A) de cerrado, em Crato, CE.

Composto	TR (min)	FEV 2014		MAR 2014		ABR 2014		MAI 2014		JUN 2014		JUL 2014	
		C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
espatulenol	49,0	-	-	0,6	-	-	-	-	0,8	-	0,8	0,2	0,2
isopatuleno	49,5	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-
óxido aromadendreno	49,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-
patchulano	51,0	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cis-cariofileno	51,5	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
epóxido aromadendreno	51,7	-	-	1,2	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-
caureno-16-eno	51,6	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,7	0,4	0,3	0,8

Legenda: TR: Tempo de retenção; (-) Ausente.

Conclusão

Um total de 27 constituintes químicos foram encontradas em ambas áreas de estudo, sendo oito observados na maioria dos meses (β -cariofileno, α -humuleno, α -amorfenol, germacreno D, β -selineno, δ -cadineno, germacreno B, óxido de cariofileno) e 19 menos frequentes, nove foram exclusivos na área 1 e seis na área 2.

O sesquiterpeno β -cariofileno foi o composto majoritário em todo período analisado nas duas áreas, com valores acima de 31,0%, com exceção de fevereiro na área 2 e chegando a 72% em dezembro, durante a fenofase de floração. Este evento propicia a atração de insetos e o contato destes com a planta estimula a produção do β -cariofileno, um dos mecanismos de defesa do vegetal (WANG; LANGENHEIM, 1990). Na área 1, apresentou os maiores teores em agosto/2013 (55%) e julho/2014 (61%), período de queda foliar e estiagem respectivamente, estes percentuais podem provavelmente estar associados a ausência e baixo teor do germacreno B, já que a partir de setembro e outubro este composto foi o elemento majoritário com percentuais de 35,2 e 37,8% respectivamente. A maior porcentagem de germacreno B coincide com a fase brotamento. Após esta fenofase, as porcentagens desse composto diminuíram e o β -cariofileno voltou a ser o composto majoritário. Na área 2 com a presença do germacreno B também houve diminuição do β -cariofileno em maio, junho e julho.

O β -cariofileno é o composto mais encontrado nos óleos-resina das espécies do gênero *Copaifera*: em *C. duckei* (LAMEIRA et al., 2009); *C. reticulata* (ZOGHBI et al., 2009a); *C. pubiflora* (ZOGHBI et al., 2009b); *C. langsdorffii* (GRAMOSA; SILVEIRA, 2005); e *C. multijuga* (CASCON; GILBERT, 2000). Esse composto foi também encontrado nas folhas e frutos de *C. langsdorffii* na Chapada do Araripe com porcentagens de 16,6 e 14,8%, respectivamente (GRAMOSA; SILVEIRA, 2005). Estudo realizado por Souza (2011) mostrou que este volátil é encontrado principalmente em óleos essenciais extraídos dos óleos-resina de *C. langsdorffii* com porcentagem de 76,0% enquanto que no óleo-resina foi de 42%. O maior percentual de β -cariofileno (72,0%) na área 2 foi próximo ao obtido por Souza (2011) mas esse autor não relatou a época de coleta nem a fase fenológica em que a planta se encontrava.

O α -humuleno esteve ausente apenas em fevereiro na área 2. A concentração foi aumentando de agosto a dezembro, com exceção de novembro, e de março a maio com redução em de junho. Nesta área foi encontrado o maior percentual deste composto, com teor de 9,0%, período maior intensidade da floração. A redução em junho pode ter ocorrido devido o aumento da porcentagem do germacreno B. Na área 1, as concentrações do α -

humuleno foram diminuindo de agosto a dezembro, variando de 2,3 a 7,5%. A partir de janeiro houve aumento nos teores, com exceção de março e maio, coincidindo com o aparecimento do germacreno B.

A diminuição das porcentagens do α -humuleno e β -cariofileno ocorreu concomitantemente com o aumento das concentrações do germacreno B, talvez porque os vegetais, através de mecanismos de controle da rota biossintética, beneficiem a produção de determinados compostos, dependendo de suas necessidades (CHENG et al., 2007). É importante ressaltar que não foram encontrados estudos que comprovassem as produções destes compostos.

O α -humuleno é um dos principais sesquiterpenos presente nos óleos-resina (ROMEIRO, 2007; SOUZA, 2011). De acordo com Souza (2011), este composto foi identificado em maior concentração no óleo essencial (8,7%) extraído do óleo-resina de *C. langsdorffii*, do que no próprio exsudato (6%). Os resultados mostram que a época mais propícia para obtenção de maiores teores deste composto é durante o pico de floração. Informações deste caráter são importantes para o desenvolvimento de padrões de coleta para uso medicinal, já que esse constituinte possui atividades biológicas já confirmadas (FERNANDES et al., 2007 ; MEDEIROS et al., 2007).

Outro composto que esteve presente todos os meses nas duas áreas, com exceção de outubro na área 1, foi o óxido cariofileno que apresentou maiores concentrações na área 2, variando de 2,5 a 21,4%, enquanto que na área 1 variaram de 1,7 a 21,1%. Segundo Cascon; Gilberto (2000) o óxido de cariofileno pode ser um produto natural presente no óleo-resina da espécie *Copaifera guianensis*. Em fevereiro, na área 2, foi observado um teor bastante elevado (72,0%), bem maior que nos outros meses. Segundo Veiga Junior et al.(1997), o cariofileno é sensível a luz solar, sendo facilmente oxidado, transformando-se em óxido de cariofileno. Na área 2 as plantas estão mais expostas a radiação, sendo esse provavelmente o principal fator para a oxidação do β -cariofileno (RAMOS, 2006). É importante destacar que o óxido de cariofileno atua diretamente na inibição de fungos em plantas (LANGENHEIM, 1990), embora não tenham sido observadas infestações destes microrganismos na árvore selecionada.

Os constituintes que apresentaram maiores teores na área 1 no período chuvoso foram o germacreno D, δ -cadineno, α -selineno, δ -guaiano, aromadendreno, γ -elemeno, α -calacoreno, β -selineno e α -guaiano enquanto que na área 2 foram oito compostos (γ e α -muruleno, espatulenol, δ -elemeno, α -ialangeno, α -cubebeno, α -bergamonteno e o β -

bisaboleno). Durante o período de estiagem o γ -cadineno, α -amorfenos possuíram maiores concentrações na área 2 e o valenceno na área 1. As concentrações desses voláteis podem estar relacionadas com os índices pluviométricos. Vários são os fatores que podem interferir na produção de compostos químicos, sendo necessários às análises de mais variáveis ambientais para possíveis conclusões (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

Em relação aos diterpenos, o caur-16-eno e Caurano-18-al tiveram maiores teores na no período chuvoso na área 2 sendo o segundo composto exclusivo dessa área. Os esqueletos diterpênicos tipo caurano são considerados como quimiomarcadores no óleo de *C. langsdorffii*, pelo fato de análises instrumentais sempre mostrar algum constituinte representante dessa classe de composto (VEIGA JUNIOR, 1997).

Os compostos exclusivos da área 1 que ocorreram na estação chuvosa foram α -cadinol, patchulano, cis-cariofileno, δ -muruleno, isopatuleno, epóxido aromadendreno e o α -selina-4,(19),11-dieno. O composto 3,7(11)-selinadieno e aristoleno ocorreram apenas no período de estiagem.

Aloaromadendreno, cicloisovativeno, humuladienone, óxido de aromadendreno, junipeno foram os compostos exclusivos da área 2 com maiores percentuais observados no período chuvoso.

4.4 Valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii*

As amostras obtidas nas duas áreas nas diferentes fenofases tanto no período chuvoso como no de estiagem apresentaram atividade antibacteriana, com exceção dos óleos testados contra *P. aeruginosa* e os óleos obtidos no período chuvoso contra *E. coli* 27, que não apresentaram potencial antibacteriano clinicamente relevante, com CIMs \geq 1024 (Tabela 3).

Na estação chuvosa, os óleos essenciais obtidos na área 1 e na área 2 apresentaram as melhores resultados contra a Gram-negativa *E. coli*, com CIMs de 64 e 256 μ g/mL, respectivamente. No período de estiagem, resultados relevantes contra *S. mutans* e a multirresistente *E. coli* 27, foram obtidos com os óleos da área 1 (256 μ g/mL) e 2 (64 μ g/mL).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii* coletados em uma área conservada (C) e uma antropizada (A) no período chuvoso e de estiagem.

Bactérias	Período chuvoso		Período de estiagem	
	C (FV) CIM (µg/mL)	A (FLO) CIM (µg/mL)	C (QF) CIM (µg/mL)	A (FRU) CIM (µg/mL)
<i>S. aureus</i> ATCC 12692	512	512	512	512
<i>E. coli</i> ATCC 25922	64	256	512	512
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25922	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
<i>S. mutans</i> ATCC 0046	512	512	256	64
<i>S. aureus</i> 358	512	512	512	512
<i>E. coli</i> 27	≥ 1024	≥ 1024	256	64

FV: fase vegetativa; FLO: floração; QF: queda foliar; FRU: frutificação

A diferença da atividade antibacteriana entre áreas e períodos deve estar associada à composição química do óleo essencial, bem como às variações das concentrações dos compostos (Tabela 2). Na área 1, durante a estação chuvosa foram obtidos teores de 27,3 e 12,8% de β -cariofileno e germacreno B, respectivamente, enquanto na área 2 esses mesmos constituintes apresentaram concentrações de 72,2 e 9,1%. Embora Goren et al. (2011) tenham relatado que o β -cariofileno possui importante atividade antibacteriana contra *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumonia* e *P. aeruginosa*, no presente estudo este composto em menor porcentagem no óleo provindo da área 1 (27,0%), na estação chuvosa, e da área 2 (53,5%), no período de estiagem, apresentaram melhor atividade em relação aos óleos obtidos nas áreas 1 (61,2%) e 2 (72,2%) nos meses de dezembro e julho, respectivamente, nos quais foram encontrados as maiores concentrações deste composto. Segundo Leandro et al. (2012) compostos presentes no exsudato podem interagir sinergicamente na promoção da atividade antibacteriana.

A atividade antibacteriana possivelmente foi influenciada pela presença do germacreno B, já que os óleos que apresentaram melhores atividades possuíam maiores teores desse composto. É possível que a atividade atribuída aos majoritários seja modulada pelos minoritários presentes no óleo, pois segundo Bakkali et al. (2008) esta associação atua na penetração, distribuição celular e fixação destes nas paredes e membranas.

Durante a floração, o óleo colhido no período chuvoso, na área 2, teve o menor potencial antibacteriano contra as cepas multirresistentes (*S. aureus* 358 e *E. coli* 27), enquanto na estiagem durante a frutificação, foi mais eficaz contra *E. coli* 27. Os resultados obtidos são relevantes quando comparados com de alguns estudos com óleos-resina de *C. multijuga*, *C. officinalis* e *C. reticulata*, *C. langsdorffii*, *C. lucens*, *C. paupera*,

C. martii, *C. cearenses* que não apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* (PACHECO et al., 2006; PACKER; LUZ, 2007; SANTOS et al, 2008). Já em outros trabalhos (Mendonça; Onofre, 2009; Pieri et al. 2011), houve inibição de bactérias gram-negativas, *E. coli* e *P. aeruginosa* pelo óleo-resina de algumas espécies de *Copaifera*. No primeiro estudo houve inibição no crescimento de *E. coli* ATCC-25922 e *P. aeruginosa* ATCC-9027, enquanto que no outro estudo foram testadas oito cepas de *E. coli* com óleo-resina de *C. langsdorffii* o qual foi eficaz na inibição de dois isolados. Essa divergência pode estar relacionada à influência de fatores ambientais e fenológicos podem afetar substancialmente a qualidade e/ou a quantidade de compostos bioativos (SZAKIEL et al., 2011; PAVARANI et al., 2012).

Em trabalho realizado por Pavaneli e Garcia (2013), utilizando o óleo essencial de *C. langsdorffii*, o halo de inibição de *E. coli* foi 25mm, o mesmo obtido pelo controle, constituído pelo antimicrobiano penicilina, podendo ser considerado um antimicrobiano eficaz. Não há relatos de atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. langsdorffii* contra cepas multirresistentes como a *E. coli* 27.

A obtenção de produtos vegetais capazes de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas é importante, uma vez que a membrana externa constitui uma barreira adicional à entrada de substâncias como antibióticos (VOET et al., 2008). Este fato tem sido mais preocupante em termos de infecções por *E. coli*, conhecida por possuir uma grande capacidade de adquirir resistência, a vários antibióticos. O uso de medicamentos à base de plantas pode reduzir o aparecimento destas bactérias resistentes, dada a possibilidade de vários compostos ativos que atuam em locais ou vias diferentes nas células bacterianas.

Estudos preliminares, porém promissores levam à intensificação de estudos clínicos complementares, e à avaliação da ação sinérgica e/ou antagônica destes fitoconstituintes quando usados em associação com outros produtos antimicrobianos, principalmente contra bactérias multirresistentes (MENDONÇA; ONOFRE, 2009).

4.5 Atividade moduladora do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii*

Para avaliar o óleo como potencializador da resistência de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (neomicina, gentamicina e ampicilina) foram utilizadas as linhagens bacterianas que obtiveram CIMs $\leq 512 \mu\text{g/mL}$.

Na associação do óleo essencial com os antibióticos aminoglicosídeos em concentrações subnibitórias (MIC 1/8), houve atividade sinérgica e antagônica. O valor mais representativo para a atividade sinérgica foi observado contra a cepa *E. coli*, com redução da CIM da amicacina de 156 µg/mL para 9,7 µg/mL, resultante das conjugações com óleos provindos das duas áreas tanto do períodos de estiagem quanto de chuva. Em relação ao efeito antagônico, destaca-se um aumento na CIM da gentamicina de 39µg/mL para 78,1µg/mL com a adição do óleo de *C. langsdorffii* obtido no período de estiagem na área 2 contra *S. mutans* (Tabela 4 e 5).

Os óleos essenciais potencializaram os efeitos do antibiótico neomicina contra a maioria das bactérias, com exceção das CIMs obtidas para as cepas, *P. aeruginosa* (área 1), *E. coli* 27 e *S. mutans* (área 2) pois, o óleo essencial adquirido no período de estiagem, em associação com o antibiótico mantiveram a mesma CIM obtida pelo controle (19,5µg/mL). Os óleos extraídos na estação chuvosa associados com neomicina foram mais eficazes contra *P. aeruginosa* (área 1), *S. mutans* e as multirresistentes *E. coli* 27 e *S. aureus*, apresentando para estas cepas CIM de 2,5µg/mL enquanto que o controle obteve CIM de 19,5µg/mL.

Sabe-se que as composições químicas dos óleos analisados têm diferenças qualitativas e quantitativas (Tabela 2), que podem ser responsáveis pelos diferentes resultados. A atividade biológica não é atribuída a um único mecanismo de ação, uma vez que a grande variedade de grupos químicos presentes permite que haja vários alvos na célula (Burt 2004). Identificar os componentes específicos do óleo essencial de *C. langsdorffii* que são responsáveis pela atividade sinérgica do óleo essencial em associação com os aminoglicosídeos está além do escopo deste estudo. No entanto é possível afirmar que óleo obtido na área 1, durante o período chuvoso, constituído principalmente do β-cariofileno (27,3%) e germacreno B (12,8%), em associação com o neomicina apresenta melhor atividade sinérgica contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e cepas multirresistentes.

As capacidades de inibição do crescimento bacteriano dos óleos essenciais frente às linhagens gram-negativas são um resultado relevante, uma vez que normalmente é descrito na literatura a atividade contra gram-positiva, que são mais sensíveis aos antibióticos. As bactérias gram-negativas apresentam particularidades estruturais que dificultam a penetração dos aminoglicosídeos, como a camada externa de lipopolissacarídeos que

determina propriedades de superfície, tais como permeabilidade e susceptibilidade a antibióticos (YOKOTA, FUJII, 2007).

Tabela 4. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) de aminoglicosídeos na ausência e presença do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii* provindos da área conservada (C) e antropiza (A) no período chuvoso

Antibióticos	<i>S. aureus</i> ATCC 12692				<i>E. coli</i> ATCC 25922				<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442			
	C		A		C		A		C		A	
	CON	COM	CON	COM	CON	COM	CON	COM	CON	COM	COM	COM
Amicacina	19,5	9,7	19,5	9,7	156,2	9,7	156,2	9,7	19,5	19,5	-	-
Gentamicina	19,5	4,9	19,5	4,9	39	9,7	39	9,7	19,5	9,7	-	-
Neomicina	9,7	2,5	9,7	2,5	19,5	4,9	19,5	4,9	19,5	2,5	-	-
Antibióticos	<i>S. multans</i>				<i>S. aureus</i> 358				<i>E. coli</i> 27			
	C		A		C		A		C		A	
	CON	COM	CON	COM	CON	COM	CON	COM	CON	COM	COM	COM
Amicacina	39	2,5	39	19,5	9,7	4,9	9,7	4,9	78,1	39	-	-
Gentamicina	39	2,5	39	2,5	19,5	2,5	19,5	9,7	19,5	4,9	-	-
Neomicina	19,5	2,5	19,5	2,5	19,5	2,5	19,5	2,5	19,5	2,5	-	-

CON: controle; COM: combinado; (-) não foi analisado.

Tabela 5. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) de aminoglicosídeos na ausência e presença do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii* provindos da área conservada (C) e antropizada (A) no período de estiagem

Antibióticos	<i>S. aureus</i> ATCC 12692				<i>E. coli</i> ATCC 25922				<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442			
	C		A		C		A		C		A	
	CON	COM	CON	COM	CON	COM	CON	COM	CON	COM	COM	COM
Amicacina	19,5	9,7	19,5	2,5	156,2	9,7	156,2	9,7	19,5	4,9	-	-
Gentamicina	19,5	9,7	19,5	2,5	39	4,9	39	4,9	19,5	4,9	-	-
Neomicina	9,7	2,5	9,7	2,5	19,5	4,9	19,5	4,9	19,5	19,5	-	-
Antibióticos	<i>S. multans</i>				<i>S. aureus</i> 358				<i>E. coli</i> 27			
	C		A		C		A		C		A	
	CON	COM	CON	COM	CON	COM	CON	COM	CON	COM	COM	COM
Amicacina	39	39	39	39	9,7	4,9	9,7	4,9	78,1	78,1	78,1	78,1
Gentamicina	39	19,5	39	78,1	19,5	4,9	19,5	4,9	19,5	19,5	19,5	4,9
Neomicina	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	4,9	19,5	4,9	19,5	19,5	19,5	4,9

CON: controle; COM: combinado; (-) não foi analisado.

5 CONCLUSÃO

Espécimes de *Copaifera langsdorffii* em áreas de cerradão conservada e antropizada tiveram comportamentos fenológicos distintos, com ausência de floração e frutificação na área conservada.

Os rendimentos dos óleos essenciais extraídos dos óleos-resina de *C. langsdorffii* variaram nos diferentes períodos sazonais, sendo maiores na época chuvosa.

Houve alteração qualitativa e quantitativa na composição química dos óleos essenciais provindos dos diferentes ambientes, entre os períodos de estiagem e chuvoso, nas diferentes fases fenológicas. Sempre predominaram os sesquiterpenos. O germacreno B pode ter interferido na biossíntese de α -humuleno e β -cariofileno.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais variou no tempo sendo maior no período de frutificação, durante o período seco.

Os óleos essenciais, provindos do período chuvoso, associados com o antibiótico neomicina apresentaram potencial modelador, com relevância clínica frente as cepas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing, Carol Stream, IL. 2001.

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.16, p.273-285, 2002.

ALBURQUEQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Plantas medicinais da caatinga (semi-árido) vegetação de NE Brasil: uma abordagem quantitativa. **Journal Etnofarmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.

ALENCAR, J. C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne Leguminosae, na Amazônia Central. Interpretação de dados fenológicos em relação aos elementos climáticos. **Acta Amazonica**, v. 18, n.3/4, p.198-209, 1988.

ALENCAR, J.C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne-Leguminosae, na Amazônia Central. 2 - Produção de óleo-resina. **Acta Amazonica**. v.12, n.1, p.75-89,1982.

ALMEIDA, L.F.R.; PORTELA, R.O.; FACANALI, R.; MARQUES, M. O. M.; FREI, F. Dry and wet seasons set the phytochemical profile of the *Copaifera langsdorffii* Des. essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 4, p. 292-300, 2014.

ALMEIDA, S. P., PROENÇA, CEB.; SANO, SM.; RIBEIRO, J.F. 1998, Cerrado: espécies vegetais úteis. **Planaltina: EMBRAPA-CPAC**, 464p.

ALVES, A. R., RIBEIRO, I. B., SOUSA, J. R. L., BARROS, S. S, SOUS, P. N. DA SILVA. Análise da estrutura vegetacional em uma área de caatinga no município de Bom Jesus, Piauí. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 4, p. 99 – 106, 2013.

AMOROSO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.16, n.2, p.189-203, 2002.

ARAÚJO JÚNIOR, F.A; BRAZ, M. N.; ROCHA NETO, O. G. DA; COSTA, F. D'A; 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.

AZEVEDO, I. F. P.; NUNES, Y. R. F.; A´VILA, M. A.; SILVA; D. L.; FERNANDES, G. W.; VELOSO, R. B. Phenology of riparian tree species in a transitional region in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Botany**. v. 37, n.1, p. 47-59, 2014.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D. & IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-475, 2008.

BARBOSA, C. S. P., MEDEIROS S. R., SAMPAIO T. B. P., VIEIRA, G., WIEDEMANN S. M. L. AND VEIGA JUNIO, V. F. Influence of abiotic factors on the chemical composition of Copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): soil composition, seasonality and diameter at breast height. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p.1823-1833, 2012.

BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. O. E HEINZMANN, B. M. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p.861-867, 2009.

BATALHA, M.A., ARAGAKI, S. & MANTOVANI, W. Variações fenológicas das espécies do cerrado de Emas - Pirassununga, SP. **Acta Botanica Brasilica** v.11, p.61-78, 1997.

BAYLAC, S.; RACINE, P. A inibição da 5-lipoxigenase por óleos essenciais e outros extratos aromatizantes naturais. **International Journal Aromatherapy**, v.13, p.138-142, 2003

BLANK, A.F.1; FONTES, S.M.; CARVALHO FILHO, J.L.S.; ALVES, P.B.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M.C.; ARRIGONI BLANK, M.F.; RODRIGUES, M.O. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.1, p.73-78, 2005.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3. ed. Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 256 p. (Coleção Mossoroense, 11), 1976.

BRITO, E. R., MARTINS, S. V., OLIVEIRA FILHO, A. T. DE, SILVA, E., SILVA, A. F. Estrutura fitossociológica de um fragmento natural de floresta inundável em área de Campo Sujo, Lagoa da Confusão, Tocantins. **Acta Amazônica**, vol. 38, n.3, 379 – 386, 2008.

BRITO, M. V. H.; MOREIRA, R. J.; TAVARES, M. L. C.T; SANTOS, M. C.; CARBALLO; CARNEIRO, T. X.; SANTOS, A. A. S. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. **Acta Cirurgica Brasileira**. v.20, n.3, p.243-246, 2005.

BRITO, NMB; BRITO, MVH; CARVALHO, RKV; MATOS, LTMB; LOBATO, RC; CORREA, SC; BRITO, RB. O efeito do óleo de copaíba no carcinoma de Walker 256 inoculado em vagina e colo de útero de ratas. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.25, p.176-180, 2010.

BRITO, N.M.B.; SIMÕES, M.J.; PESSOA, A.F.; MELO, M.C.F. Efeitos do óleo de copaíba na cicatrização de feridas cutâneas de ratos abertas. **Revista Paraense de Medicina**, n.12, p.28-32, 1998.

BRITO, N.M.B.; SIMÕES, M.J.; GOMES, P.O.; PESSOA, A.F.; MELO, M.C.F. Aspecto microscópicos da cicatrização de feridas cutâneas abertas tratadas com óleo de copaíba em ratos. **Revista Paraense de Medicina.**, v.13 , p.12-17, 1999.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CARVALHO, J. O. P.; CARVALHO, M. S. P.; BAIMA, A. M. V.; MIRANDA, I. L.; SOARES, M. H. M. Informações básicas sobre ecologia e silvicultura de cinco espécies arbóreas da Amazônia brasileira. Belém: EMBRAPA, Amazônia Oriental. **Documento**, 101, 2001.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**. v. 55, p.773-78, 2000.

CAVALCANTI, B.C., COSTA LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; CUNHA, K. M. A.; RAO, V. S. N.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p.388-92, 2006.

CASTRILLO, A.; HERAS, B.; HORTELANO, S; RODRIGUEZ, B; VILLAR, A; BOSCA, L. Inhibition of the nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway by tetracyclic kaurene diterpenes in macrophages. Specific effects on NF- κ B-inducing kinase activity and on the coordinate activation of ERK and p38 MAPK. **Journal of Biological Chemistry**. 276, 15854–15860, 2001.

CAVALCANTI, F. S. Estudo agrônomo exploratório do candeieiro (*Vanillosmopsis arborea* Baker). Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 101p. Dissertação Mestrado–1994.

CERQUEIRA, M. D.; MARQUES, E. J.; MARTINS, D.; ROQUE, N. F., CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. S. Variação sazonal da composição química do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg, (myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.

CONCEIÇÃO, G. M.; CASTRO A. A. J. F. Fitossociologia de uma área de cerrado marginal, Parque Estadual do Mirador, Mirador, Maranhão. **Scientia Plena**, v.5, n.10, p.1-16, 2009.

COMELLI-JÚNIOR, E. .; SKINOVSKI, J. .; SIGWALT, M.F.; BRANCO, A.B.; LUZ, S.R.; BAULE, A C.P. Análise de ponto de ruptura da cicatrização da anastomose intestinal em ratos sob a ação de óleo de copaíba puro (*Copaifera langsdorfii*). **Acta Cirurgica Brasileira**, v.25 , p.362-367, 2010.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/ IBDF, p.707, 1984.

COSTA JUNIOR, R. F., FERREIRA, R. L. C., RODAL M. J. N., FELICIANO, A. L. P., MARANGON L. C., SILVA, W. C. Estrutura fitossociológica do componente arbóreo de um fragmento de floresta ombrófila densa na mata sul de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 2, p. 173-183, 2008.

COSTA, I. R.; ARAÚJO, F. S.; LIMA-VERDE, L. W. Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de Cerrado na Chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n.4, p. 759-770, 2004.

CHEN-CHEN, L; SENA, MA. Atividade toxica e mutagênica do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desfon) em Camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.5, p.37-40, 2002.

CHENG, AI-XIA; YONG-GEN LOU, YING-BO MAO; SHAN LU; LING-JIAN WANG; XIAO-YA CHEN. Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.49 n.2 p.179–186, 2007.

DIAS, H.C.T. e OLIVEIRA-FILHO, A. T. Fenologia de quatro espécies arbóreas de uma floresta estacional semidecídua em Lavras, MG. **Cerne**, v.2, p.66-88, 1996.

DUARTE M.C.T.; FIGUEIRA G.M.; PEREIRA B.; MAGALHÃES P. M., DELARMELINA, C. Atividade antimicrobina de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.14, n.1, p. 6-8. 2004.

DUARTE, A. R.; SANTOS, S. C. ; JOSÉ C.; SERAPHIN, J. C.; PEDRO H. FERRI, PEDRO H. Environmental influence on phenols and essential oils of *Myrciaria cauliflora* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, n.9, p. 1672-1680, 2010.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v.21, n.4, p.308-323, 2007.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKY, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)- trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 27, n. 569, p. 228-236, 2007

FERNANDES, J. M., GARCIA, F. C. P., AMOROZO, M. C. DE M., SIQUEIRA, L. C. DE, MAROTTA C. P. B., CARDOS, I. M. Etnobotânica de Leguminosae entre agricultores agroecológicos na Floresta Atlântica, Araponga, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v.65, n.2, p. 539-554, 2014.

FIGUEIREDO, L. S.; BONFIM, F.P.G.; SIQUEIRA, C. S.; FONSECA, M. M.; SILVA, A. H.; MARTINS, E. R. Efeito da época de colheita na produção de fitomassa e rendimento de óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n. 2, p. 154-158, 2009.

FOURNIER, L.A.; CHARPANTIER, C. El tamaño de la muestra y la frecuencia de las observaciones en el estudio de las características fenológicas de los árboles tropicales. **Turrialba**, v.25, n.1, p.45-48, 1975.

FOURNIER, L.A. Observaciones fenológicas en el bosque húmedo premontano de San Pedro de Montes Oca, Costa Rica. **Turrialba** n.26, p.54-59, 1976.

FREITAS, V. C.; OLIVEIRA, P. E. Biología reproductiva de *Copaifera langsdorffii* Des. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.3, p. 311-321, 2002.

FRIZZO, C. D.; LORENZO, D.; DELACASSA, E. Composition and seasonal variation of the essential oils from two mandarin cultivars of Southern Brasil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.3036-3041, 2004.

FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS. Gráficos de Chuvas dos postos pluviométricos. Disponível em: <www.funcceme.br/index.php/areas/tempo/calendariodaschuvas> Acesso em: 20 set. 2014.

GERSHENZON, J. & DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology** v.3, n. 7, p. 408-41, 2007.

GERSHENZON, J.; LINCOLN, D.E. & LANGENHEIN, J. H. The effect of moisture stress on monoterpenoid yield and composition in *Satureja douglasii*. **Biochemical Systematics Ecology**, v.6, n.1 p.33-43, 1978.

GOBBO-NETO, L. E LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 374-381, 2007.

GOMES, NM; REZENDE, CM; FONTES, SP; HOVELL, AMC; LANDGRAF, RG; MATHEUS, ME; PINTO, AC; FERNANDES, PD. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Jornal Ethnopharmacology**. v.119 , p.179-184, 2008.

GOMES, NM; REZENDE, CM; FONTES, SP; MATHEUS, ME; FERNANDES, PD. Atividade antinociceptivo da copaíba da Amazônia. **Journal Ethnopharmacology**. v. 109 , p.486-492, 2007.

GOUNGUENÉ, S.P.; TURLINGS, T.C.J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiology**, v.129, p.1296-1307, 2002.

GOREN, AC; PIOZZI, F.; AKCICEK, E.; KILIÇ, T .; ÇARIKÇI, S .; MOZIOGLU, E.; SETZER, WN Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. **Phytochemistry Letters**, v.4, p.448-453, 2011.

GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of *Copaifera langsdorffii* from the Brazilian Northeast. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, n.1, p.130-132, 2005.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v.68, n. 22-24, p. 2831-2846, 2007.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HIRUMA-LIMA C.A.; SANTOS L.C.; KUSHIMA H.; PELLIZZON C.H.; SILVEIRA G.G.; VASCONCELOS P.C.P.; VILEGAS W.; SOUZA BRITO, A.R.M. *Qualea grandiflora*, a Brazilian “Cerrado” medicinal plant presents an important antiulcer activity. **Journal Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p.207-214, 2006.

INÁCIO, M. C. **Fatores ambientais e fenológicos na atividade antimicrobiana e produção de ativos em *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.** São Paulo: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas, p. 94, Tese de Doutorado, 2013.

JORGE RM; LEITE JPV; OLIVEIRA AB; TAGLIATI CA. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal Ethnopharmacol** v.94, n.1, p. 93-100, 2004.

KUNZ, S. H., IVANAUSKAS, N. M. E MARTINS, S. V. Estrutura fitossociológica de uma área de cerrado em Canarana, Estado do Mato Grosso, Brasil, Brasil, **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 3, p. 255-261, 2009.

KUTCHAN, T.M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 58-60, 2001.

LAGO, J.H.G., ROMOFF, P., PIRANI, J.R. & ROQUE, N.F. Essential oil from *Guarea macrophylla* Vahl var. *tuberculata* Vellozo (Meliaceae) leaves – variation in the chemical component proportions. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n.4, p. 338-341, 2007.

LAHLOU, M. Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. **Flavour and Fragrance Journal**, v.19, n.2 p.159-165, 2004.

LANGENHEIM, J. H. Plant resins. **American Scientist**, v.78, n.1, p.16-24, 1990.

LANGENHEIM, J.H.; FEIBERT, E.B. Leaf resin variation in *Copaifera langsdorffii*: relation to irradiance and herbivory. **Phytochemistry**, v.27, n.8, p.2527-32, 1988.

LAMEIRA, O.A.; MARTINS-DA-SILVA,R.C.; ZOGHBI, M.G.B.; OLIVEIRA, E.C.P. Seasonal variation in the volatiles of *Copaifera duckei* dwyer growing wild in the state of Pará, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.21, n.2, p. 105-107, 2009.

LEANDRO, L. M. L.; VARGAS, F. S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J.K.O.; SILVA, J.A. E VEIJA JUNIOR, V. F. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 4, p.3866-3889, 2012.

LIMA MRF; XIMENES CPA; LUNA JS; SANT'ANA, AEG. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacogogia**, v.16, n.3, p.300-306, 2006.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V.M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v.10, n.2, p.71-77, 2003.

LIMA, CS; MEDEIROS, B. J. L.; FAVACHO T. E. M.; SANTOS, K. C.; OLIVEIRA, B. R.; TAGLIALEGNA, J. C.; COSTA, E. V. M.; CAMPOS, K. J.; CARVALHO, J.C.T. Validação pré-clínica de um creme vaginal contendo óleo de copaíba (estudo de toxicologia reprodutiva). **Phytomedicine** v.18 , p. 1013-1023, 2011.

LOCATELLI, E.; MACHADO, I.E. Fenologia das espécies arbóreas de uma mata serrana (Brejo de Altitude) em Pernambuco, Nordeste do Brasil. In: PORTO, K.C.; CABRAL, J.P.J; TABARELLI, M. (Orgs.). **Brejos de altitudes em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004. p.255-276.

LOKAR, L. C.; MAURICH, V.; MELLERIO, G.; MONEGHINI, M.; POLDINI, L. Variation in terpene composition of *Artemisia alba* in relation to environmental conditions. **Biochemical Stematics Ecology**, v.15, n.3, p.327-333,1987.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, ed. Nova Odessa São Paulo, Instituto Plantarum, v.1, 152p. 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 352 p. 1992.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. **Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 512 p, 2002.

MACÊDO, D. G. **Bioprospecção, disponibilidade e conservação de plantas medicinais em um enclave de cerrado na Chapada do Araripe, Nordeste do Brasil**. Crato: Universidade Regional do Cariri, p. 131. Dissertação de Mestrado, 2013.

MACÊDO, M. S. **Análise estrutural da vegetação de Cerradão em áreas conservada e em regeneração no Nordeste do Brasil**. Crato: Universidade Regional do Cariri, 57p. Dissertação de Mestrado, 2014.

MACHADO, B. M.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E.H.A. Seasonal variation in the composition of the essential oil from the leaves, thin branches and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p.338-341, 2003.

MACIEL, M. A.M.; PINTO, A C.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n.3, p. 429-438, 2002.

MAISTRO, EL; CARVALHO, JCT; CASCON, V.; KAPLAN, MAC. Avaliação da caracterização do potencial mutagênico *in vivo* e fitoquímica de oleorresina de *Copaifera duckei* Dwyer. Genet. **Journal of Molecular Biology**. v. 28 ,p. 833-838, 2005.

MARCATI, C.R.; ANGYALOSSY- ALFONSO, V.; BENETATI, L. Anatomia comparada do lenho de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae - Caesalpinioideae) de floresta e cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**. v.24, n.3, p.311-20, 2001.

MASSON, D. S. **Atividades cicatrizante e antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em úlceras cutâneas**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Tese de doutorado, 215p. 2011.

MEDEIROS R.; PASSOS G.F.; VITOR C.E.; KOEPP J.; MAZZUCO T.L.; PIANOWSKI L.F.; CAMPOS M.M.; CALIXTO J.B. Effect of two active compounds obtained from the oil of *C. verbenacea* on the acted inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 5, p. 618-627, 2007.

MENDONÇA F. A.C.; SILVA, K.F.S.; SANTOS, K.K. , RIBEIRO JÚNIOR, K.A.L.; SANT'ANA, A.E.G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, n.7-8, p. 629-636, 2005.

MENDONÇA, D. E ONOFRE, S. B. "Antimicrobial activity of the oil-resin produced by copaiba *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae).". **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p.577-581, 2009.

MORAES, V. H. F.; BASTOS, T. X. Viabilidade e limitações climáticas para as culturas permanentes, semi permanentes e anuais, com possibilidades de expansão na Amazônia. **Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte**, 1972.

MORI, S. A.; BONN, B. M.; CARVALHO, A. M.; SANTOS, T. S. Southern Bahian forests. **Botanical Review**, v.49, p.155-232, 1989.

MURAKAMI, C. **Estudo da composição química e atividades biológicas de óleos voláteis de *Chromolaena laevigata* (Lam.)King & Rob. em diferentes fases fenológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, p. 95, Dissertação de Mestrado, 2009.

NASCIMENTO, M. E. **Caracterização anatômica em diferentes ambientes e óleos essenciais de cinco espécimes de *Copaifera langsdorffii* Desf.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 166p. Tese de Doutorado, 2010.

NASCIMENTO, M. E. ; ZOGHBI, M. G. B.; PINTO, J. E. B. P. ; BERTOLUCCI, S. K. V. B. Chemical variability of the volatiles of *Copaifera langsdorffii* growing wild in the Southeastern part of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p. 1-6, 2012.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow**

aerobically; Approved standard—Sixth Edition. Villanova, NCCLS. v.23, n.2, 2003. (Document M7-A6).

NOGUEIRA-NETO, J.; LINDOSO, MJS; COELHO, LF; CARVALHO, RAF; RODRIGUES, TGPM; ARAÚJO, AGP; GIRÃO, MJBC; SCHOR, E. Mudanças no volume e histologia de focos de endometriose em ratos tratados com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*). **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, p.20-24, 2011.

OHSAKI AYUMI; YAN LU TONG; SHIGERU ITO; HAJIME EDATSUGI; DAIJI IWATA; YASUO KOMODA. The isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* desfon. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.4, n.24, p. 2889–2892, 1994.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; ZOGHBI, M. G. B. Identificação da época de coleta do óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) do município de Mojú-PA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n.3, p. 14-23, 2006.

OLIVEIRA, F.C.S.; BARROS, R.F.M.; MOITA NETO, J.M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiens. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.3, p.282-301, 2010.

OLIVEIRA, M. I. **Crescimento, características estruturais e teor de óleo essencial de *Artemisia vulgaris*, submetidas a diferentes espectros luminosos.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 85p. Dissertação de Mestrado, 2006.

OLIVEIRA, D.C.; MENDONÇA JR. M.S.; MOREIRA; A.S.F.P.; LEMOS-FILHO, J.P.; ISAIAS, R.M.S. Water stress and phenological synchronism between *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae) and multiple galling insects: formation of seasonal patterns, **Journal of Plant Interactions**, v.8, n.3, p.225-233, 2013.

OPLER, P.A., FRANKIE, G.W.; BAKER, H.G. Rainfall as a factor in the release, timing and synchronization of anthesis by tropical trees and shrubs. **Journal of Biogeography**, v.3, n.3, p.231-236, 1976.

PACHECO, TARC; BARATA, LES; DUARTE, MCT Atividade antimicrobiana de copaíba (*Copaifera* spp.) bálsamos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.8, p.123-124, 2006.

PAIVA, L. A. F. **Estudo do potencial antiinflamatório do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* e seu constituinte diterpênico ácido kaurenóico em modelos experimentais de inflamação intestinal.** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 120 p. Tese de Doutorado, 2004.

PAIVA, L.A.F.; CUNHA, K. M. A.; SANTOS, F. A.; GRAMOSIA, N. V.; SILVEIRA.E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.62, p.73-8, ago. de 1998.

PAIVA L.A.F., GURGEL L.A., SILVA R.M., TOMÉ A.R., GRAMOSA N.V., SILVEIRA E.R., SANTOS F.A. & RAO V.S.N. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**. v.39, n.1, p.303-307, 2002a.

PAIVA, L. A. F.; ALENCAR CUNHA, K. M.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, S. N. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**,v. 16, n.8, p.737-739, 2002b.

PAIVA, L.A.F.; GURGELA, L.A., SOUSAB, E.T. DE, SILVEIRAB, E.R., SILVA, R.M., SANTOSA, F.A; RAOA, V.S.N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.93, p.51-6, 2004.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem animal. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**., v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007

PASA, M. C.; SOARES, J. J.; GUARIM-NETO, G. Estudo etnobotânico na comunidade de Conceição-Açu (alto da bacia do rio Aricá Açu, MT, Brasil). **Acta Botanica Brasilica**, v.19, n.2, p. 195-207, 2005.

PAVANELLI, M. F., GARCIA R. Avaliação antibacteriana e antifúngica do óleo essencial de quatro espécies vegetais. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**. v.8 n.3, 2013.

PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1-4, p. 5- 16, 2012.

PEDRONI F.; SANCHES, M.; SANTOS, F. A.M. Fenologia de Copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf.- Leguminosae, Caesalpinioideae) em uma área floresta semidecídua no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.2, p.183-194, 2002.

PIERI, FA; JOSÉ, RM; GALVÃO, NN; NERO, LA; MOREIRA, MAS A atividade antimicrobiana do óleo de copaíba autoclavado e não autoclavado sobre *Listeria monocytogenes*. **Ciencia Rural** v.40, p.1797-1801 2010a.

PIERI, FA; MUSSI, MC; FIORINI, JE; SCHNEEDORF, JM. Efeitos clínicos e microbiológicos do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dentária em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.62 , p.578-585, 2010b.

PIERI, F. A.; SOUZA, C. F.; COSTA, J. C. M.; BARRERO, M. A. O.; ESPESCHIT, I. F.; SILVA, V. O.; MOREIRA, M. A. S. Inibição de *Escherichia coli* de leite mastítico pelo óleo de copaíba. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n.1, p. 1929-1934, 2011.

PIERI, F.A; SILVA V.O.; SOUZA, C.F.; COSTA, J.C.M.; SANTOS, L.F; MOREIRA, M.A.S. Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**. v.64, n.1, p.241-244, 2012a.

PIERI, F. A., MUSSI, M. C. M., FIORINI, J. E., MOREIRA, M. A. S., & SCHNEEDORF, J. M. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. **Brazilian dental journal**, v.23, n.1, p.36-38, 2012b.

PLOWDEN, C. The ethnobotany of copaíba (*Copaifera*) oleoresin in the amazoil. **Economic Botany**, v. 58, n. 4, p.729-73, 2004.

PINTO, A. C.; BRAGA, W. F.; REZENDE, C. M.; GARRIDO, F. M.S.; VEIGA JR V. F.; BERGTER L.; PATITUCCI, B. 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**, v. 11, n. 4, p.355-360, 2000.

PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Gráfica e Editora Midiograf. Londrina, p.328, 2001.

PROPHIRO, JS; SILVA, MAN; KANIS, L.; ROCHA, LCBP; DUQUE-LUNA, JE; SILVA. First report on susceptibility of wild *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) using *Carapa guianensis* (Meliaceae) and *Copaifera* sp.(Leguminosae). **Parasitology Research**, v.110, p.699-705, 2012.

QUIQUI E. M. D., MARTINS, S. S., SILVA, I. C., BORGHI, W. A., SILVA, O.H., SAKURAGUI, C. M. E PACHECO, R. B. Estudo fitossociológico de um trecho da floresta estacional semidecidual em Diamante do Norte, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 29, n. 2, p. 283-290, 2007.

RAMOS, M.F.S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica**. , Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. 132p, Tese de Doutorado - 2006.

REZENDE, W. P.; BORGES, L. L.; ALVES N.M.;FERRI, P. H., PAULA, J.R. **Chemical variability in the essential oils from leaves of *Syzygium jambos***. v.23, n.3, p. 433-440, 2013.

REICH, P. B.; BORCHERT, R. Water stress and tree phenology in a tropical dry forest in the lowlands of Costa Rica. **Journal of ecology**, Oxford, v.72, p.61-74, 1984.

RIBEIRO, D. A.; OLIVEIRA, L. G. S.; MACÊDO, D. G.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; SILVA, M. A. P.; LACERD, S. R.; SOUZA, M. M. A. Promising medicinal plants for bioprospection in a cerrado area of Chapa do Araripe, Northe rastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1522-1533, 2014.

RIGAMONTE AZEVEDO; O. C.; WADT, P. G. S.; WADT, L. H. O. **Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina**. Rio Branco: EMBRAPA, MAPA, 2004.

ROMEIRO, A. L., **Contribuição ao conhecimento químico do óleo-resina de copaíba: configuração absoluta de terpenos.** Universidade Estadual de Campinas, 203p. Dissertação (Mestrado), 2007.

SAGDIC, O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and Oregano hydrosols. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, vol., 36, p. 467-473, 2005.

SACHETTI, CG; FASCINELI, ML; SAMPAIO, JA; LAMEIRA, OA; CALDAS, E.D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p.937-941, 2009.

SACHETTI, CG; CARVALHO, RR; PAUMGARTTEN, F.J.R; LAMEIRA, O.A; CALDAS, E.D. Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v.49 , p.1080-1085, 2011.

SALGADO, M. A. S.; REZENDE, A. V.; FELFILI, J. M.; FRANCO, A. C.; SILVA, J. C. S. Crescimento e repartição de biomassa em plântulas de *Copaifera langsdorffii* Desf. submetidos a diferentes níveis de sombreamento em viveiro. **Revista Brasil Florestal**, n. 70, p. 13-21, 2001.

SALVAT A, ANTONACCI L, FORTUNATO RH, SUAREZ EY, GODOY HM. Screening of some plants from northern Argentina for their antimicrobial activity **Lett Applied Microbiology.**, v. 32,p. 293-297, 2001.

SAMPAIO, P. T. B. **Copaíba.** In: Clay, W; SAMPAIO, P. T.; CLEMENT, C. R. Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização. Manaus: INPA, P.207-215, 2000.

SANTANA, H. C. D. **Caracterização química do óleo essencial de Baccharis reticularia DC. (Asteraceae) em função de diferentes procedências e da sazonalidade no Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 73 p. Dissertação de Mestrado, 2013.

SANTOS, A; PADUAN, R. H.; GAZIN, Z. C.; JACOMASSI, E.; OLIVEIRA, P. S.; CORTEZ, D. A. G.; CORTEZ, L. E. R. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2, p.436-441, 2009.

SANTOS, A. O; UEDA, NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P; VEIGA, VF, JR.; PINTO, AC; NAKAMURA, C. V. Atividade antimicrobiana de óleos de copaíba brasileiros obtidos de diferentes espécies do gênero *Copaifera*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 103, 277-281, 2008.

SANTOS, R.C.V.; ALVES, C.F. DOS S.; SCHNEIDER, T.; LOPES, L. Q. S.; AURICH, C.; GIONGO, L. J.; BRANDELLI, A.; VAUCHER, R. A. Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.109, n.3, p. 265–268, 2012.

SCHWOB, I., BESSIERE, J.-M., MASOTTI, V. & VIANO, J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n.8, p. 735-745, 2004.

SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A.; CARTWRIGHT, R. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility test and bioassay In: LENNETTE, E. H.; BALLOWS, A.; HAUSLERS JR. V.; SHADOMY, H. J. (Eds). Manual of clinical microbiology. 4. ed. **Washington: American Society of Microbiology**, p.991-999, 1985.

SILVA, E. B. P.; SOARES, M.G; MARIANE, B.; VALLIM, M. A.; PASCON,R. C.; SARTORELLI, P.; LAGO, J.H. The seasonal variation of the chemical composition of essential oils from *Porcelia macrocarpa* R. E. Fries (Annonaceae) and their antimicrobial activity. **Molecules**, v.18, p.13574-13587, 2013.

SILVA, F.G.; OLIVEIRA, C. B. A.; PINTO, J. E. B. P.; NASCIMENTO,V. E.; SANTOS, S. C.; SERAPHIND, J. C. AND FERRI, P. H. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated baccharis trimera. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n.5, p. 990-997, 2007.

SILVA, M. C. C. **Fenologia, maturação fisiológica e aspectos da germinação de sementes de *Phatymiscium floribundum* Vog. No Parque Estadual, Alberto Lofgren, Instituto florestal, São Paulo-SP.** São Carlos, Universidade Federal de São Carlos. Tese de Doutorado 2005.

SILVA, I. G.; ZANON , V.O.M.; SILVA, H.H.G. Larvicidal activity of *Copaifera reticulata* Ducke Oil-Resin against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) **Neotropical Entomology**. v.32, n.4, p.729-732 2003.

SNOW, D.W. A possible selective factor in the evolution of fruiting seasons in tropical forest. **Oikos**, v.15, n.2, p.274-281, 1965.

SOUZA, J. P. B. ***Copaifera langsdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal.** Ribeirão Preto: Faculdade de ciências Farmacêuticas, 179p, Tese de Doutorado, 2011.

SOUZA JÚNIOR, O. G.; GUIMARÃES NETO H.P.; PINTO N.T.; SANTOS MT, CARVALHO R. A. Achados macroscópicos na cavidade peritoneal de ratos, após aplicação do óleo de copaíba. **Revista Paraense de Medicina**. v.16, n.1, p.14-8, 2002.

SOUZA, F. D. R.; HIGUCHI, N. O manejo da copaíba pelas etnias Arara e Gavião na Terra Indígena Igarapé Lourdes, Rondônia, Norte do Brasil. **Revista Ceres**, v. 61, n.1, p. 028-034, 2014.

SOUZA, O. E.; COLARES, A. V., RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; LIMA, G. S., COSTA, J. G. M. Effect of collection time on essential oil composition of *Lantana camara* Linn (Verbenaceae) growing in Brazil Northeastern. **Records of Natural Products**, v.4, n.1, p. 31-37, 2010.

SZAKIEL, A.; PACZKOWSKI, C.; HENRY, M. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 4, p. 471-491, 2011

TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, J. F. G.; LIMA, A. C. S.; MAZZEI, J. L.; RAMOS, M. F. S. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de Copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v.27, n.2, p. 236-240, 2004.

TAVARES, E.S.; JULIÃO, L.S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, p.1-5, 2005.

TRINDADE, F. T.T.; STABELI, R. G.; PEREIRA, A. A.; FACUNDO, V. A.; SILVA, A. A. *Copaifera multijuga* ethanolic extracts, oil-resin, and its derivatives display larvicidal activity against *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.23 n.3, 2013.

TOREZAN-SILINGARDI, H. M. **A influência dos herbívoros florais, dos polinizadores e das características fenológicas sobre a frutificação das espécies da família Malpighiaceae em um cerrado de Minas Gerais**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, p.172. Tese de doutorado, 2007.

VALENTINI, C. M. A.; SILVA, L. E.; MACIEL, E. N.; FRANCESCHINI, E.; SOUZA JR, P. T.; DALL'OGGIO, E. L.; COELHO, M. F. B. Variação anual do rendimento e composição química dos componentes voláteis da *Siparuna guianensis* Aublet. **Química Nova**, vol. 33, n. 7, p. 1506-1509, 2010.

VASCONCELOS, A.F.F.; GODINHO, O.E.S. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. **Química Nova**, v.25, n.6B, p.1057-1060, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Controle da autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v.20, n.6, p.612-615,1997.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v.25, n.2, p.273-286, 2002.

VEIGA, V.F., J.R.; ZUNINO, L.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C.; CALIXTO J.B. A The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.58, p.1405-1410, 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M. V.; HENRRRIQUES, H.G.M.O.; PINTO, A. C. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology** v.112 p.248–254, 2007.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 2º edição. Artmed, 2008.

VIEIRA, R.C.; BOMBARDIERE, E.; OLIVEIRA, J.J.; LINO-JÚNIOR, R.S.; BRITO, L.A.B.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica na presença de corpo estranho. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.28 , p.358-366, 2008.

WANG, J.L.; LANGENHEIM, J. H. Seasonal and diurnal variations in leaf sesquiterpenes of greenhouse-grown saplings of *Hymenaea* and *Copaifera*. **Acta Botanica Yunnanica**, v.12, n.1, p.85-91, 1990.

WESTPHAL, FL; LIMA, LC; GUIMARÃES, RA; SOUZA, RFS; COUTO, SB; NAKAJIMA, SR Avaliação das alterações pleuropulmonares após uma injeção de óleo de resina de copaíba, extrato aquoso de crajiru e polivinilpirrolidona iodado (PVPI) na pleura e parênquima pulmonar de ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v. 34, 170-176, 2007.

WRIGHT. S. S.; VAN SCHAİK, C.P. Light and the phenology of tropical trees. **American naturalis**, v.143, n.1, p.192-199, 1999.

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

YOKOTA, S., FUJII, N. Contribuições do núcleo externo lipopolissacarídeo oligossacarídeos região sobre as propriedades da superfície celular de *Pseudomonas aeruginosa*. **Comparativos Imunologia, Microbiologia e Doenças Infecciosas** , v.30, n.2, p.97-10, 2007.

ZIECH, R. E.; FARIAS, L. D.; BALZAN, C.; ZIECH, M.F.; HEINZMANN, B.M.; LAMEIRA, O. A.; VARGAS, A. C. Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera reticulata*) against coagulase positive *Staphylococcus* of canine otitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, n.7, p.909-913, 2013.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H.A.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.; TRIGO, J.R. Chemical variation in the volatiles of *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae) growing wild in the states of Pará and Amapá Brasil. **Journal of Essential Oil Research**, v.21, n.6, p.501-503, 2009a.

ZOGHBI, M. G. B.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.; TRIGO, J.R. Volatiles of oleoresins of *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer, *C. piresii* Dwyer and *C. pubiflora* Benth. (Leguminosae). **Journal of Essential Oil Research**, v.21, n.5, p.403-404, 2009b.

ANEXOS

ANEXO A

Documento de Autorização para Atividades com Finalidade Científica



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 40171-1	Data da Emissão: 02/07/2013 08:13	Data para Revalidação*: 01/08/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Liana Geraldo Souza de Oliveira	CPF: 026.860.463-09
Título do Projeto: comportamento fenológico e variações dos constituintes químicos de espécies de Cerrado, Nordeste Brasil.	
Nome da Instituição : Universidade Regional do Cariri	CNPJ: 06.740.864/0001-26