UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica em
cromatografia gasosa para o controle de qualidade de *Eucalyptus*
globulus e seus produtos: planta desidratada, extratos, óleo
essencial e xarope de eucalipto**

Paula Carolina Pires Bueno

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica em
cromatografia gasosa para o controle de qualidade de *Eucalyptus*
globulus e seus produtos: planta desidratada, extratos, óleo
essencial e xarope de eucalipto**

Paula Carolina Pires Bueno

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica em
cromatografia gasosa para o controle de qualidade de *Eucalyptus*
globulus e seus produtos: planta desidratada, extratos, óleo
essencial e xarope de eucalipto**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para a obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientada: Paula Carolina Pires Bueno

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Ribeirão Preto

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bueno, Paula Carolina Pires

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica em cromatografia gasosa para o controle de qualidade de *Eucalyptus globulus* e seus produtos: planta desidratada, extratos, óleo essencial e xarope de eucalipto. Ribeirão Preto, 2007.

102p. il.; 30,0 cm

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

1. *Eucalyptus globulus*. 2. Controle de Qualidade. 3. CG. 4. Xarope.

Autora: Paula Carolina Pires Bueno

Título: Desenvolvimento e validação de metodologia analítica em cromatografia gasosa para o controle de qualidade de *Eucalyptus globulus* e seus produtos: planta desidratada, extratos, óleo essencial e xarope de eucalipto

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para a obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho:

À Deus por seu infinito amor.

Aos meus pais Maria Aparecida Pires Bueno e Paulo Antônio Lopes Bueno, pelo amor incondicional, apoio e paciência.

À Ana Maria, Camila e João Pedro, minhas queridas irmãs e meu querido sobrinho, pela alegria de existirem.

*Ao Fernando.
Pela imensa felicidade de estar ao seu lado.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, pela orientação, confiança e amizade.

Aos Senhores Antônio Carlos Meda e Manoel Eduardo Ferreira, diretores da Apis Flora, pela confiança e por terem proporcionado a possibilidade de realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Pierina Sueli Bonato, pela valiosa contribuição na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas e ao Prof. Dr. Fernando Batista da Costa, pelas contribuições e sugestões gentilmente cedidas no decorrer deste trabalho.

Ao Professor Dr. Milton Groppo Júnior, curador do Herbário do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela ajuda na obtenção das espécies de *Eucalyptus*.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, discentes, docentes e funcionários.

Aos Funcionários da Secção de Pós-graduação da FCFRP-USP, pela atenção.

À Izabel Cristina Casanova Turatti, do laboratório de Química Orgânica da FCFRP-USP, pela ajuda na obtenção dos espectros de massas.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacognosia, Walter Lopes, Mário e José Luis, pela ajuda sempre e pela amizade.

Aos seguranças do período noturno da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela amizade, pelos cuidados e pela segurança!

Em especial ao amigo João Paulo Barreto de Souza, exemplo de simplicidade e força de superação: pelos ensinamentos.

Aos amigos da gnosis, pelos ensinamentos, incentivo e amizade: Ademar, Ana Silvia, Elisete, Fábio, Gustavo, João Paulo, Juliana, Karin, Leonardo, Luciano, Luiz Elídio, Marley, Mileide, Niege, Nilton, Paulo, Rejane, Renata, Ricardo, Sérgio Ambrósio, Sérgio Faloni e William.

Aos profissionais da Apis Flora, pela amizade e espírito de equipe: Agostinho, Aline, Alfredo, Alexandre, Ana Rita, Andresa, Celina, Danilo, Darliane, Edna, Fabiana, Felipe, Flávio, Henrique, Israel Leandro, Leandro Ricordi, Lucas, Luis Claudio, Marley, Raul, Shirley, Sônia, Vera Lúcia e Viviane.

À direção e funcionários da Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade (FEENA) pelo apoio na obtenção das espécies de *Eucalyptus*.

Aos amigos Rose, Gobbo, Luciana Lanchote, Flávia e Renata, pela preciosa troca de experiências, amizade e companheirismo.

A todos que, de que alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos.....	i
Lista de Figuras.....	li
Lista de Tabelas.....	iv
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Plantas medicinais.....	2
1.2. Desenvolvimento analítico e validação de métodos.....	3
1.3. Características de desempenho de métodos.....	6
1.3.1 Seletividade e especificidade.....	6
1.3.2. Linearidade.....	7
1.3.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	8
1.3.4. Exatidão.....	9
1.3.5. Precisão.....	10
1.3.6. Robustez.....	12
1.4. Óleos essenciais.....	13
1.5. A família Myrtaceae e o gênero <i>Eucalyptus</i>	14
1.6. A espécie <i>Eucalyptus globulus</i>	16
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL E METODOS.....	21
3.1. Material.....	22
3.1.1. Material vegetal.....	22
3.1.2. Solventes e padrões.....	22

3.2. Equipamentos.....	23
3.3. Obtenção das amostras.....	24
3.3.1. Preparo inicial da amostra de folhas desidratadas de <i>E. globulus</i>	24
3.3.2. Obtenção das amostras de espécies do gênero <i>Eucalyptus</i>	24
3.3.3. Obtenção dos óleos essenciais para posterior obtenção dos <i>fingerprints</i>	24
3.3.4. Obtenção da tintura de <i>E. globulus</i>	25
3.3.5. Obtenção dos extratos fluidos de <i>E. globulus</i>	25
3.3.6. Obtenção da forma farmacêutica “xarope” contendo extrato fluido de <i>E. globulus</i> – xarope de eucalipto.....	26
3.4. Caracterização físico-química da planta desidratada, tintura, extratos fluidos e xarope de eucalipto.....	26
3.4.1. Caracterização físico-química da planta desidratada.....	27
3.4.2. Caracterização físico-química da tintura e extratos fluidos.....	28
3.4.3. Caracterização físico-química do xarope de eucalipto.....	28
3.5. Desenvolvimento do método analítico para quantificação de 1,8-cineol em folhas desidratadas de <i>E. globulus</i> , extrato fluido, óleo essencial e xarope de eucalipto por cromatografia gasosa.....	29
3.5.1. Condições cromatográficas.....	29
3.5.2. Determinação dos índices de retenção (IR) dos principais constituintes do extrato hexânico das folhas de <i>E. globulus</i> e dos óleos essenciais das 12 espécies do gênero.....	30
3.5.3. Escolha dos padrões interno e secundário.....	32
3.5.4. Escolha do melhor método de extração das folhas.....	32
3.5.5. Escolha do melhor método de extração do xarope.....	32
3.5.6. Preparo das amostras para quantificação.....	33
3.6. Validação do método para a quantificação de 1,8-cineol em folhas desidratadas, extrato fluido e óleo essencial de <i>E. globulus</i> e xarope de eucalipto.....	36
3.6.1. Seletividade.....	36
3.6.2. Linearidade.....	37
3.6.3. Limite de Detecção (LDM) e Limite de Quantificação (LQ).....	38

3.6.4. Exatidão.....	39
3.6.5. Precisão.....	41
3.6.6. Robustez.....	41
3.7. Análise estatística.....	44
3.8. Análise qualitativa - obtenção dos <i>fingerprints</i> das 12 espécies do gênero <i>Eucalyptus</i>	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1. Análises físico-químicas das folhas desidratadas de <i>E. globulus</i>	48
4.2. Identificação dos principais componentes presentes na espécie <i>E. globulus</i>	49
4.3. Análise físico-química da tintura e extratos fluidos e escolha do melhor processo de obtenção do extrato.....	53
4.4. Obtenção do xarope de eucalipto.....	56
4.5. Caracterização físico-química do xarope de eucalipto.....	56
4.6. Desenvolvimento do método analítico por CG-DIC.....	57
4.6.1. Escolha dos padrões.....	57
4.6.2. Comparação dos perfis cromatográficos do óleo essencial, folhas e extrato fluido de <i>E. globulus</i>	58
4.7. Escolha do melhor método de extração das folhas.....	60
4.8. Escolha do melhor método de extração do xarope.....	62
4.9. Validação do método para a quantificação de 1,8-cineol em folhas desidratadas, extrato fluido, óleo essencial de <i>E. globulus</i> e xarope de eucalipto.....	62
4.9.1. Seletividade.....	63
4.9.2. Linearidade.....	66
4.9.3. Obtenção das equações para quantificação.....	68
4.9.4. Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	68
4.9.5. Recuperação e Exatidão.....	70
4.9.6. Precisão.....	73
4.9.7. Robustez.....	77

4.10. Análise qualitativa – obtenção dos <i>fingerprints</i> cromatográficos.....	81
4.11. Identificação dos principais constituintes das 12 espécies do gênero <i>Eucalyptus</i>	87
4.12. Aplicabilidade do método quantitativo.....	93
5. CONCLUSÃO.....	96
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%CV	coeficiente de variação
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CG	cromatografia gasosa
CG-DIC	cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
D x	diluição
DP	desvio padrão
H ₀	hipótese nula
H ₁	hipótese alternativa
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
IR	índice de retenção
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	limite de detecção
LDE	limite de detecção do equipamento
LDM	limite de detecção do método
LQ	limite de quantificação
m	massa
M	concentração molar
min	minutos
PM	peso molecular
R	razão
rpm	rotações por minuto
S	desvio padrão relativo
S ²	variância
TMB	1,2,3,4-tetrametilbenzeno
t _r	tempo de retenção
v	volume
WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 01-	Fotografia da árvore <i>E. globulus</i>	17
Figura 02-	Detalhe das folhas e flores de <i>E. globulus</i>	17
Figura 03-	Estruturas químicas dos principais metabólitos identificados no extrato hexânico de <i>E. globulus</i>	51
Figura 04-	Cromatograma do padrão de 1,8-cineol enriquecido com a mistura de hidrocarbonetos por CG-DIC.....	52
Figura 05-	Cromatograma do extrato hexânico das folhas enriquecido com os padrões de hidrocarbonetos por CG-DIC.....	52
Figura 06-	Perfil cromatográfico da tintura de <i>E. globulus</i>	53
Figura 07-	Extrato fluido 1:1 de <i>E. globulus</i> obtido pelo processo A de percolação.....	54
Figura 08-	Extrato fluido 1:1 de <i>E. globulus</i> obtido pelo processo C de percolação.....	55
Figura 09-	Perfil cromatográfico dos três padrões utilizados: 1,8-cineol, TMB e piperonal por CG-DIC.....	58
Figura 10-	Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>E. globulus</i>	59
Figura 11-	Perfil cromatográfico do extrato hexânico das folhas de <i>E. globulus</i>	59
Figura 12-	Perfil cromatográfico do extrato fluido 1:1 de <i>E. globulus</i> obtido pelo processo C de percolação.....	60
Figura 13-	Gráfico representativo da melhor condição de extração das folhas.	61
Figura 14-	Perfil cromatográfico da solução placebo contendo somente o pico do padrão interno (TMB) por CG-DIC.....	65
Figura 15-	Perfil cromatográfico do xarope de eucalipto após procedimento de <i>clean up</i>	65
Figura 16-	Curva analítica do 1,8-cineol apresentando a regressão linear.....	66
Figura 17-	Curva analítica do TMB apresentando a regressão linear.....	67
Figura 18-	Curva analítica do piperonal apresentando a regressão linear.....	68

Figura 19-	Influência de cada fator modificado no teste de robustez para as folhas de <i>E. globulus</i>	77
Figura 20-	Influência de cada fator modificado no teste de robustez para o xarope de eucalipto.....	79
Figura 21-	Perfil químico das 12 espécies do gênero <i>Eucalyptus</i>	86
Figura 22-	Perfis cromatográficos de três espécies de <i>Eucalyptus</i> . Na ordem: <i>E. tereticornis</i> , <i>E. botrioides</i> e <i>E. citriodora</i>	89
Figura 23-	Perfis cromatográficos de três espécies de <i>Eucalyptus</i> . Na ordem: <i>E. resinifera</i> , <i>E. robusta</i> e <i>E. saligna</i>	90
Figura 24-	Perfis cromatográficos de três espécies de <i>Eucalyptus</i> . Na ordem: <i>E. elba</i> , <i>E. microcorys</i> e <i>E. paniculata</i>	91
Figura 25-	Perfis cromatográficos de três espécies de <i>Eucalyptus</i> . Na ordem: <i>E. grandis</i> , <i>E. globulus</i> e <i>E. urophylla</i>	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 01-	Matriz de fatores para a determinação da robustez de um método.....	13
Tabela 02-	Programa de temperatura desenvolvido para o método analítico....	30
Tabela 03-	Parâmetros analíticos variados para a determinação da robustez..	42
Tabela 04-	Parâmetros analíticos variados para a determinação da robustez..	43
Tabela 05-	Distribuição F – 5% de probabilidade.....	45
Tabela 06-	Valores tabelados da distribuição <i>t</i> de Student.....	46
Tabela 07-	Perfil físico-químico da amostra de folhas desidratadas de <i>E. globulus</i> ..	48
Tabela 08-	Índices de retenção dos constituintes majoritários de <i>E. globulus</i> ...	50
Tabela 09-	Resultados da análise físico-química da tintura e extratos fluidos de <i>E. globulus</i> ..	55
Tabela 10-	Resultados da análise físico-química do xarope de eucalipto.....	57
Tabela 11-	Dados obtidos para a determinação do melhor método de extração das folhas.	61
Tabela 12-	Planejamento da etapa de validação do método analítico para a quantificação de 1,8-cineol em folhas desidratadas de <i>E. globulus</i> , extrato fluido, óleo essencial e xarope de eucalipto.....	63
Tabela 13-	Resultados da curva analítica do 1,8-cineol (n=3).....	66
Tabela 14-	Resultados da curva analítica do TMB (n=3).....	67
Tabela 15-	Resultados da curva analítica do piperonal (n=3).....	67
Tabela 16-	Resultados das curvas analíticas elaboradas para cálculo do LD e LQ.....	69
Tabela 17-	Análise estatística básica para a determinação do LD e LQ.....	69
Tabela 18-	Determinação da recuperação em três concentrações nominais (85,03, 162,34 e 297,62 µg/mL) de 1,8-cineol para as folhas ($t_{95\%(n-1)} = 3,182$).....	70

Tabela 19-	Determinação da recuperação do TMB nas concentrações: 68,03, 64,93 e 59,52 µg/mL.....	71
Tabela 20-	Determinação da exatidão em três concentrações nominais (0,25, 0,50 e 1,00 mg/g) de 1,8-cineol no xarope. ($t_{95\%(n-1)} = 3,182$).....	72
Tabela 21-	Resultados obtidos para determinação da precisão do método de quantificação do 1,8-cineol após extração do marcador das folhas desidratadas de <i>E. globulus</i> (n=6).....	73
Tabela 22-	Análise estatística dos dados obtidos para a precisão do método de quantificação de 1,8-cineol após extração das folhas desidratadas de <i>Eucalyptus</i> (n=6).....	74
Tabela 23-	Resultados obtidos para determinação da precisão intermediária do método de quantificação do 1,8-cineol após extração do marcador das folhas desidratadas de <i>E. globulus</i> (n=6).....	74
Tabela 24-	Análise estatística dos dados obtidos para a precisão intermediária do método de quantificação de 1,8-cineol após extração das folhas desidratadas de <i>Eucalyptus</i> (n=6).....	74
Tabela 25-	Resultados obtidos para determinação da precisão do método de quantificação de 1,8-cineol após extração do marcador 1,8-cineol do xarope (n=6).....	75
Tabela 26-	Análise estatística dos dados obtidos para a precisão do método de quantificação de 1,8-cineol após extração do marcador 1,8-cineol do xarope (n=6).....	75
Tabela 27-	Resultados obtidos para determinação da precisão intermediária do método de quantificação de 1,8-cineol após extração do marcador 1,8-cineol do xarope (n=6).....	76
Tabela 28-	Análise estatística dos dados obtidos para a precisão intermediária do método de quantificação de 1,8-cineol após extração do marcador 1,8-cineol do xarope (n=6).....	76
Tabela 29-	Valores numéricos obtidos para cada parâmetro alterado na determinação da robustez para as folhas.....	77
Tabela 30-	Teor de 1,8-cineol obtido em cada conjunto de modificações realizadas no teste de robustez para as folhas.....	78
Tabela 31-	Valores numéricos obtidos para cada parâmetro alterado na determinação da robustez para o xarope.....	79
Tabela 32-	Teor de 1,8-cineol obtido em cada conjunto de modificações realizadas para determinação da robustez para o xarope.....	80

Tabela 33-	Principais constituintes presentes no óleo essencial de <i>E. grandis</i> .	81
Tabela 34-	Principais constituintes presentes no óleo essencial de <i>E. elba</i>	81
Tabela 35-	Principais constituintes presentes no óleo essencial de <i>E. botryoides</i>	82
Tabela 36-	Principais constituintes presentes no óleo essencial de <i>E. tereticornis</i>	82
Tabela 37-	Principais constituintes presentes no óleo essencial de <i>E. resinifera</i>	82
Tabela 38-	Principais constituintes presentes no óleo essencial de <i>E. robusta</i>	83
Tabela 39-	Principais constituintes presentes no óleo essencial de <i>E. saligna</i>	83
Tabela 40-	Principais constituintes presentes no óleo essencial de <i>E. citriodora</i>	83
Tabela 41-	Principais constituintes presentes no óleo essencial de <i>E. microcorys</i>	83
Tabela 42-	Principais constituintes presentes no óleo essencial de <i>E. paniculata</i>	84
Tabela 43-	Principais constituintes presentes no óleo essencial de <i>E. urophylla</i>	84
Tabela 44-	Principais constituintes presentes no óleo essencial de <i>E. globulus</i>	84
Tabela 45-	Concentração relativa dos principais constituintes encontrados nos óleos essenciais das 12 espécies de <i>Eucalyptus</i> estudadas. Os resultados estão expressos em porcentagem de área.....	85
Tabela 46-	Teor de 1,8-cineol encontrado nas folhas, tintura, extrato fluido e óleo essencial de <i>E. globulus</i> e xarope de eucalipto.....	94

RESUMO

Bueno, P. C. P. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica em cromatografia gasosa para o controle de qualidade de *Eucalyptus globulus* e seus produtos: planta desidratada, extratos, óleo essencial e xarope de eucalipto.** 2007. 102f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

O gênero *Eucalyptus*, família Myrtaceae, é composto por mais de 400 espécies, das quais a maioria é nativa do continente australiano. Dentre as espécies mais conhecidas, o *Eucalyptus globulus* tem sido tradicionalmente utilizado pela população no tratamento de doenças respiratórias devido a seus efeitos expectorante, fluidificante e antisséptico. Assim, como para todos fitoterápicos, durante o desenvolvimento de um novo produto é imprescindível que os parâmetros de segurança, eficácia e qualidade sejam devidamente certificados e assegurados. Para tanto, é necessário desenvolver e validar metodologias analíticas para o controle de qualidade e, desta forma, assegurar o efeito terapêutico desejado. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia analítica capaz de quantificar com exatidão o teor de 1,8-cineol em óleo essencial, planta desidratada e extratos de *E. globulus*, bem como em xarope à base de extrato fluido desta espécie. O método analítico foi desenvolvido e validado em cromatógrafo de fase gasosa da marca Hewlett Packard – Agilent Technologies, Inc, modelo 6890N, equipado com injetor *split/splitless* e detector de ionização em chama. O injetor operou no modo *split* (razão 20:1), à temperatura de 250 °C, enquanto o detector operou à temperatura de 270 °C. Como gás de arraste utilizou-se hidrogênio, com fluxo de 2,2 mL/min. Para as análises utilizou-se coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5% fenil-metil-siloxano) de dimensões: 30,0 m x 320,0 µm x 0,25 µm. O programa de temperatura do forno iniciou-se em 75 °C e foi concluído a 200 °C, no período de 20 minutos. A identificação dos principais componentes presentes na espécie foi realizada utilizando-se cromatografia gasosa com detecção de massas (CG-EM). Para a análise qualitativa foram obtidos *fingerprints* de 12 espécies de *Eucalyptus*, a citar: *E. botryoides*, *E. citriodora*, *E. elba*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. microcorys*, *E. paniculata*, *E. resinifera*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. tereticornis* e *E. urophylla*. O cromatograma do óleo de *E. globulus* apresenta um pico majoritário em 5,23 minutos, correspondente ao 1,8-cineol. Já os cromatogramas das outras espécies, possuem diferenças e semelhanças significativas, tanto na presença de metabólitos quanto na quantidade de cada um, o que permite a identificação preliminar de cada espécie por este método. Além da seletividade e linearidade alcançadas, a porcentagem de recuperação ficou situada em 99,8% para as folhas de eucalipto e 100,5% para o xarope. A precisão, determinada pelo desvio padrão relativo de sextuplicatas à concentração do teste para as folhas e xarope foi de 1,86% e 0,92% respectivamente, ou seja, dentro do limite estabelecido pela ANVISA que é de, no máximo 5%. Finalmente, foram determinados os limites de detecção (4,79 µg/mL) e quantificação (14,51 µg/mL) e avaliada a influência dos principais parâmetros modificados deliberadamente na determinação da robustez, através do teste de *Yuden*. Sendo assim, o método desenvolvido, utilizando padronização interna, se mostrou adequado para a quantificação do marcador 1,8-cineol não só nas folhas, extratos e óleo essencial de *E. globulus*, mas também em xarope contendo o extrato desta espécie, garantindo a rastreabilidade de todo o processo produtivo.

Palavras chave: *Eucalyptus globulus*, Controle de Qualidade, CG, Xarope.

ABSTRACT

BUENO, P. C. P. Development and validation of analytical methodology by gas chromatography for the quality control of *Eucalyptus globulus* and products: raw material, extracts, essencial oil and eucalyptus syrup. 2007. 102f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

The genus *Eucalyptus*, family Myrtaceae, is composed of more than 400 species, most of them native to Australia. From the most known species, *Eucalyptus globulus* has been traditionally used for the treatment of respiratory diseases because of its expectorant, mucolytic and antiseptic effects. As occurs for all phytomedicines, during the development of a new product, it is indispensable to guarantee and to certify the security, efficacy and quality parameters. For this reason, it is necessary to develop and validate analytical methodologies for the quality control system and to assure the desired therapeutic effect. Therefore, the aim of this work was to develop and validate an analytical methodology capable to quantify, with accuracy, the 1.8-cineol content in *E. globulus* essencial oil, dried leaves, extracts and syrup. The analytical procedure was developed and validated using a Hewlett-Packard 6890N gas chromatograph (Agilent Technologies, Inc.) equipped with a split/splitless injector inlet and a flame ionization detector. The injector operated in the split mode (20:1), at 250 °C, while the detector operated at 270 °C. Hydrogen at a flow rate of 2.2 mL/min was employed as carrier gas. An HP-5 capillary column (30 m of length x 0.32 mm of internal diameter x 0.25 µm of film thickness) was used for the analysis and the non linear increasing temperature gradient was: 75 °C to 200 °C, in 20 min. The identification of the main compounds of *E. globulus* was made using GC-MS. For the qualitative analysis the fingerprints of 12 *Eucalyptus* species were obtained: *E. botryoides*, *E. citriodora*, *E. elba*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. microcorys*, *E. paniculata*, *E. resinifera*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. tereticornis* and *E. urophylla*. The chromatogram of *E. globulus* shows the main peak (1.8-cineol) at 5.23 minutes. The chromatograms of the other species have some significant differences and similarities in the presence and quantity of metabolites, a fact that allows a preliminary identification of each specie by this method. Besides the selectivity and linearity achieved, the recovery was at 99.8% for the leaves and 100.5% for the syrup. The repetability, determined by the relative standard deviation in six replicates at test concentration, was 1.86% and 0.92%, respectively. This result is in agreement with the Brazilian regulamentation (the maximum value established for ANVISA is 5%). The detection limit was 4.79 µg/mL while the quantification limit was 14.51 µg/mL. Finally, the influence of the main modified parameters for the robustness was determined using the Yuden test. The developed method, with internal standardization, proved to be reliable for the quantification of 1.8-cineol, not only in eucalyptus leaves, extracts and essential oils, but also in syrup formulations containing this plant extract, avowing the rastreability of the entire manufacturing process.

Key words: *Eucalyptus globulus*, Quality control, GC, Syrup.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas medicinais

A utilização de plantas medicinais como fonte de medicamentos para o tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana remonta à idade antiga (CALIXTO, 2000; ROUSSEAU & SCHACHTER, 2003; HARVEY, A. 2000), sendo que representaram, por muito tempo, a única fonte de agentes terapêuticos para o homem (HOSTETTMANN et al., 2003). As informações sobre os usos das plantas medicinais e suas virtudes terapêuticas foram sendo acumuladas durante séculos e muito desse conhecimento empírico encontra-se disponível atualmente (DI STASI, 1996).

Das 250.000 espécies de plantas superiores, cerca de 300 são utilizadas para a alimentação e de pouco mais de uma centena obtiveram-se princípios ativos puros para o tratamento de doenças (PINTO et al., 2002).

No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas constituíram a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (HOSTETTMANN et al., 2003; VIEGAS, et al., 2006). Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, sendo que 25% destas são oriundos de plantas (CALIXTO, 2001; SCHULTZ et al. 1998).

Sendo este o único recurso terapêutico de grande parcela da população brasileira e de mais de 2/3 da população do planeta, o mercado mundial de fitoterápicos movimenta mais de U\$ 22 bilhões ao ano (PINTO et al., 2002; DI STASI, 1996). No entanto, o Brasil, possuidor da maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55 mil espécies catalogadas, (SIMÕES et al., 2003) é deficitário neste item (PINTO et al., 2002). Neste contexto, muitas das plantas freqüentemente utilizadas ainda não foram estudadas

e os seus princípios ativos ainda não foram identificados para validá-las como medicamentos ou para aproveitá-las economicamente (BERG, 1993).

A comercialização de fitoterápicos e a possibilidade de exportação destes produtos são afetadas pela falta de certificação de eficácia, segurança e qualidade, parâmetros estes que devem ser prioritariamente analisados segundo métodos modernos os quais são imprescindíveis para produção de medicamentos (PINTO et al., 2002, BARNES, et al., 2003b).

1.2. Desenvolvimento analítico e validação de métodos

O desenvolvimento tecnológico de um produto fitoterápico requer estudos prévios tais como: estudos botânicos, agrônômicos, químicos e pesquisas sobre sua atividade biológica, o que o diferencia das plantas medicinais e das preparações utilizadas na medicina popular. Os estudos necessários para a obtenção de um novo medicamento a partir de uma planta medicinal potencial podem ser divididos nas etapas botânica (identificação do material em estudo), farmacêutica (preparo e garantia da qualidade do produto), ensaios biológicos pré-clínicos (ensaios farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos) e finalmente etapa clínica (estudos realizados em humanos) (SIMÕES et al., 2003). Atendo-se somente à etapa farmacêutica, mais precisamente no ponto de vista da qualidade, verifica-se que, para garantir um produto uniforme e eficaz é necessário que todos os insumos intermediários (planta *in natura*, tinturas, extratos secos, etc), bem como o produto final, sejam caracterizados através de seus constituintes químicos, e/ou atividades farmacológicas (DI STASI, 1996; SIMÕES et al., 2003). Sendo assim, em muitos casos, o produto final pode ser padronizado por meio da quantificação de marcadores, que podem ser compostos químicos característicos de certa espécie, ou compostos presentes em grandes quantidades (BARNES, 2003a). No

entanto, a padronização, que é um importante procedimento quando os princípios ativos são conhecidos, nem sempre é realizada para muitas plantas.

Geralmente, a identidade de uma matéria-prima vegetal e a qualidade do fitoterápico obtido são analisadas através da presença de marcadores químicos, os quais podem ou não ser os responsáveis pelo efeito farmacológico. No entanto, este procedimento nem sempre garante a autenticidade do material, principalmente nos casos de falsificação em que um produto pode ser adicionado de um marcador isolado (SCHANEBERG et al., 2003). Uma alternativa para a determinação da identidade de um material vegetal, além da identificação botânica (SIMOES et al., 2003) é a utilização do *fingerprint* cromatográfico (SCHANEBERG et al., 2003).

O *fingerprint* (impressão digital) de um produto natural, mais precisamente de uma planta medicinal, é uma técnica cromatográfica padrão que relaciona características químicas e farmacológicas comuns dos componentes de uma amostra vegetal evidenciando suas semelhanças e diferenças (GONG, et al. 2003). Para obtenção dessas informações devem-se considerar fatores relacionados com a separação cromatográfica, com o número e com a concentração dos compostos presentes, fazendo com que haja segurança e confiabilidade nos resultados (OBRADOVIC, et al., 2007).

Com esta finalidade, metodologias desenvolvidas utilizando-se técnicas cromatográficas, como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) têm sido largamente utilizadas tanto para o estudo fitoquímico, quanto na química analítica para o controle de qualidade de plantas medicinais, uma vez que proporciona vantagens como a alta eficiência e rapidez (RIBANI et al., 2004; CELEGUINI et al., 2001; SIMÕES et al., 2003).

De forma geral, o desenvolvimento de metodologias analíticas para o controle de qualidade ou pesquisa de um produto envolve a avaliação e otimização de vários parâmetros, desde o preparo da amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação (CAUSON, 1997), sendo que estes devem ser intensivamente estudados e intrinsecamente relacionados com o metabólito de interesse.

Uma outra etapa imprescindível é a validação das metodologias analíticas desenvolvidas, visando garantir que o método atenda corretamente aos objetivos a que foi proposto (THOMPSON et al., 2002) e possa ser implementado nos protocolos de controle de qualidade do produto, assegurando assim sua ação terapêutica e a segurança na sua utilização (SIMÕES et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

A validação de métodos analíticos, além de ser necessária para a confiabilidade dos resultados na implementação do sistema da qualidade, é justificada por razões legais, técnicas e comerciais, apesar de não existir uma norma específica estabelecida nacional e internacionalmente. Órgãos como IUPAC, ISO, ANVISA, INMETRO e ICH, apesar de possuírem diferenças em suas normas, fornecem diretrizes e recomendações para a execução do procedimento de validação, requisito fundamental para o processo de demonstração de competência técnica (RIBANI et al., 2004; GREEN, 1996).

De acordo com WHO (1992), o termo validação é definido como a avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que este está sob as condições nas quais ele deve ser aplicado. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária preconiza que a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

Neste contexto, a validação de um método analítico, bem como os estudos rigorosos da segurança e qualidade são imprescindíveis para o registro de novos produtos (RIBANI et al., 2004; ROUSSEAU & SCHACHTER, 2003).

1.3. Características de desempenho de métodos

Os parâmetros analíticos para a validação de métodos, conhecidos também como parâmetros de desempenho analítico são normalmente encontrados como: seletividade, linearidade, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, limite de detecção e exatidão (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004; TOHMPSON et al., 2002).

1.3.1. Seletividade e Especificidade

Uma definição consistente para o termo seletividade foi estabelecida pela IUPAC, como se segue: “Seletividade de um método refere-se à capacidade deste em distinguir um determinado analito presente em uma matriz complexa, sem interferência de outros componentes da mistura” (VESSMAN et al., 2001).

Muitos autores utilizam os termos seletividade e especificidade como sinônimos; no entanto, estes diferem entre si de acordo com o tipo de resposta que produz. Um método é dito específico quando consegue fornecer uma resposta para somente um analito (VESSMAN, 2001). Quando o método desenvolvido consegue produzir resposta para diversos analitos, distinguindo-os entre si, é chamado seletivo (INMETRO, 2003).

Em química analítica, a seletividade é baseada nos parâmetros de separação e detecção, sendo que as técnicas cromatográficas hifenadas a detectores seletivos, como o espectômetro de massas, têm sido utilizadas em determinações de altíssima qualidade (VESSMAN, 2001). Além disso, em técnicas cromatográficas, outros parâmetros de separação devem ser determinados e otimizados, tais como: resolução,

fator de separação, fator de retenção, fator assimetria e número de pratos teóricos (INMETRO, 2003).

1.3.2. Linearidade

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003), sendo obtida por padronização interna ou externa. A fórmula matemática que relaciona as duas variáveis, concentração *versus* resposta é a equação da reta:

$$y = a x + b$$

Em que:

y: resposta medida (absorvância, altura ou área do pico, etc)

x: concentração

a: inclinação da curva de calibração (ou coeficiente angular)

b: intersecção com o eixo y, quando $x = 0$ (ou coeficiente linear)

A linearidade pode ser determinada através dos resultados de regressão linear de uma curva analítica, sendo que um valor maior que 0,90 é requerido (INMETRO, 2003). Além disso, a curva deve conter, no mínimo, seis ou mais valores de concentração do padrão, os quais devem ser distribuídos próximos à concentração de teste. Dependendo da amostra, a faixa de concentrações deve compreender de 0 a 150% da concentração teórica do teste, ou de 50 a 150%. As análises devem ocorrer pelo menos em duplicata, preferencialmente em triplicata (THOMPSON et al., 2002).

1.3.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção de um método é definido como a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI et al., 2004). A terminologia limite de detecção pode ser aplicada a dois procedimentos diferentes. O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão ruído/sinal do equipamento. Diferentemente, o limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero, sendo que o procedimento para sua determinação pode variar com o tipo de amostra (THOMPSON et al., 2002).

Das diferentes maneiras de se determinar o limite de detecção, o método baseado em parâmetros da curva analítica é o mais adequado, por ser estatisticamente mais confiável. Para se calcular estes dados, uma curva analítica deverá ser feita utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção. Determina-se, então, a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação da reta (S_b) e o desvio padrão do coeficiente angular (S_a) desta, os quais serão aplicados na fórmula (RIBANI et al., 2003):

$$LD = 3,3 \times \frac{S_b}{S_a}$$

Já o limite de quantificação representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão (THOMPSON et al., 2002), sendo que para sua determinação podem ser adotados os mesmos critérios de LD, no entanto, utilizando a relação (RIBANI et al., 2004):

$$LD = 10 \times \frac{Sb}{Sa}$$

1.3.4. Exatidão

Também chamada de Tendência, ou *BIAS*, a exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão quando aplicada a uma série de resultados de ensaio implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos – tendência – a qual é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos, podendo ser expressa como recuperação analítica (valor observado / valor esperado). Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, dentre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INNMETRO, 2003; THOMPSON et al., 2002). A fórmula para o cálculo do *BIAS* é dada a seguir:

$$\% \text{ BIAS} = \frac{[(\text{valor medido} - \text{valor teórico})]}{\text{valor teórico}} \times 100$$

Geralmente, os métodos de análise envolvem a transferência do analito de matrizes complexas para soluções mais simples, possibilitando, assim, a determinação instrumental. No entanto, este procedimento resulta, na maioria das vezes, em perda do analito ou em retenção de porções deste na própria matriz depois da extração, levando a uma quantificação errônea (THOMPSON et al., 1999). Para tanto, a recuperação do método deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de

interesse, o que pode ser feito adicionando a substância – ou marcador – em pelo menos três diferentes concentrações (RIBANI et al., 2004), podendo ser calculada pela seguinte expressão (CAUSON, 1997):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

1.3.5. Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas, sendo geralmente expressa como estimativa do desvio padrão (S) ou desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (%CV) (INMETRO, 2003, RIBANI et al., 2004).

$$\text{Desvio padrão: } S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

$$\text{Coeficiente de variação: } \% CV = \frac{(S \times 100)}{\bar{X}}$$

Em que:

S : desvio padrão

X_i : valor individual de uma medição

$\bar{X}$: média aritmética de um pequeno número de determinações

n : número de medições

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: precisão intermediária, repetitividade e reprodutibilidade.

a) Repetitividade

Repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade, ou seja: mesmo procedimento, mesmo observador, mesmo instrumento sob a mesma condição, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo (INMETRO, 2003). A ANVISA recomenda a verificação da repetitividade a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (três níveis, três repetições de cada um) ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado (BRASIL, 2003;). Já o INMETRO (2003) recomenda sete ou mais repetições.

É importante lembrar que a repetitividade não deve ser confundida com precisão instrumental, que é a medida seqüencial da mesma amostra (geralmente 10 repetições), seguida pela área ou altura do pico e determinação da estimativa do desvio padrão relativo (RIBANI et al., 2004).

b) Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais condições devem variar, como por exemplo: diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos (INMETRO, 2003), sendo que a obtenção, análise e expressão dos resultados podem ser feitas da mesma forma que para a repetitividade (RIBANI et al., 2004).

c) Reprodutibilidade

A reprodutibilidade refere-se aos resultados obtidos em estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser realizada em casos em que a padronização de procedimentos analítica deva ser incluída em, por exemplo, compêndios e farmacopéias (RIBANI et al., 2004), sendo que estes dados não são necessários para a concessão de registro (BRASIL, 2003).

1.3.6. Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações (INMETRO, 2003; HEYDEN, 2006). Este teste é geralmente inserido no contexto de validação com o objetivo de prevenir problemas em ensaios interlaboratoriais e identificar os potenciais fatores. Para tanto, devem ser estabelecidos e definidos os níveis dos fatores a serem testados, selecionando-se o *design* do experimento. Em seguida, deve ser definido um protocolo experimental, o qual deve ser executado para a determinação dos fatores de resposta. Finalmente, calculam-se os efeitos, estatisticamente ou graficamente, ordenando e analisando os possíveis fatores relevantes (HEYDEN et al., 2006).

Para se determinar a robustez de um método pode-se recorrer ao teste de *Yuden*, que permite avaliar a robustez de um método e ordenar a influência de cada uma dessas variações. Neste método são realizados oito ensaios, separados para se determinar os efeitos da variação de sete diferentes etapas, no procedimento analítico. A **Tabela 01** a seguir ilustra exatamente a matriz de fatores do procedimento (INMETRO, 2003):

Tabela 01- Matriz de fatores para a determinação da robustez de um método.

Valor do fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Os fatores nominais são codificados por letras maiúsculas de A a G, e a variação pelas letras minúsculas correspondentes. Se a combinação número 1 for ensaiada o resultado será s, e assim por diante, até que todas as combinações tenham sido ensaiadas. Para determinar a variação de um fator basta encontrar os quatro valores correspondentes às letras maiúsculas e às quatro minúsculas e comparar as médias dos dois grupos. Por exemplo, ao calcular as alterações de C, o cálculo do fator de C/c será:

$$\text{Efeito C/c} = \frac{s + u + w + y}{4} - \frac{t + v + x + e}{4}$$

Após a análise crítica e ordenada dos resultados obtidos, podem-se inferir algumas medidas para se fazer o controle mais rigoroso dos fatores de maior influência. Caso não haja influência significativa, calcula-se a média e o desvio padrão dos oito resultados, de s até z, sendo que o desvio padrão é uma estimativa realista da precisão do método (INMETRO, 2003).

1.4. Óleos essenciais

Os óleos voláteis, também chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou simplesmente essências compreendem produtos obtidos de partes de plantas através

de destilação por arraste a vapor d'água, bem como produtos obtidos por expressão de pericarpos de frutos cítricos, constituindo misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas. Dentro deste grupo podem ser encontrados mais de 200 componentes, pertencentes às mais variadas classes químicas, como por exemplo hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, cetonas, aldeídos, éteres, ésteres, peróxidos, lactonas, cumarinas, ácidos orgânicos, etc., sendo que, geralmente, cada espécie possui um componente majoritário e os outros em menores quantidades (SIMÕES et al., 2003).

Do ponto de vista químico, a grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados de fenilpropanóides (principalmente fenóis e seus éteres) ou de terpenóides (principalmente os monoterpenos e sesquiterpenos), os quais predominam (SIMÕES et al., 2003; ROBBERS et al., 1997).

Apesar da constituição química deste grupo de metabólitos ser bastante complexa e variada, algumas características físico-químicas peculiares permitem sua diferenciação. Possuem odores característicos e altos índices de refração, sendo que a maioria é opticamente ativa. Quanto à solubilidade, de forma geral, são imiscíveis em água, porém solúveis em etanol, éter e em solventes orgânicos (ROBBERS et al., 1997).

1.5. A família Myrtaceae e o gênero *Eucalyptus*

Originário da Austrália e Tasmânia, *Eucalyptus* constitui um grande e importante gênero da família Myrtaceae. Composto por mais de 600 espécies catalogadas é encontrado em diversos lugares do planeta, principalmente nas regiões subtropicais da Europa, África, Ásia e América, devido à sua grande adaptabilidade e importância econômica (CORREA, 1984; AHMAD et al., 2002), constituindo um dos mais importantes gêneros do planeta (HE et al., 2000a).

Dentre as espécies de eucaliptos descritas, pouco mais de 200 foram examinadas com relação ao teor de óleo essencial e menos que 20 têm sido citadas como matéria-prima para utilização comercial (VITTI & BRITO, 2003). Dentre as que mais se destacam, além de *E. globulus*, está *E. citriodora*, extensivamente cultivada e utilizada na construção civil, na indústria de papel e celulose e na extração de óleo essencial (principalmente citronelal e geraniol), sendo este destinado a diversas finalidades (CORREIA, 1984), destacando-se o uso como repelente de insetos (AHMAD et al., 2002). Óleos essenciais de várias espécies de *Eucalyptus* também têm sido extensivamente utilizados na indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica, devido às inúmeras propriedades aromáticas de seus constituintes químicos (SILVA et al., 2003; FADEL, et al., 1999; GUENTER, 1977).

Do ponto de vista terapêutico, extratos aquosos obtidos a partir das folhas desidratadas de espécies do gênero são tradicionalmente utilizados contra infecções respiratórias e no tratamento de seus sintomas, devido às suas propriedades analgésicas, antiinflamatórias e antipiréticas (SILVA et al., 2003).

Estudos de SILVA et al. (2003) sustentam o uso popular das espécies *E. citriodora*, *E. globulus* e *E. tereticornis* no tratamento de afecções do trato respiratório, além de demonstrar as atividades analgésica e antiinflamatória do óleo essencial destas espécies. Pesquisas realizadas com o extrato hidroalcoólico de 26 espécies de eucaliptos demonstraram o alto potencial antimicrobiano frente a bactérias gram-positivas, principalmente das espécies *E. globulus*, *E. maculata* e *E. viminalis* (TAKAHASHI et al., 2004). Além disso, muitas plantas pertencentes a este gênero possuem outras atividades biológicas relatadas, como por exemplo as atividades antifúngica e alelopática (AHMAD et al., 2002).

1.6. A espécie *Eucalyptus globulus*

O nome científico *Eucalyptus* deriva do grego *calyptra*, cujo significado mais aproximado é “poço com tampa” - uma alusão à forma cerrada do fruto - e *globulus*, referenciando à forma arredondada do mesmo (ALONSO, 2004).

A espécie *E. globulus* é uma árvore grande, com cerca de 70 m de altura, diâmetro proporcional, ramos cilíndricos, pouco foliosos, casca lisa, acinzentada ou castanha, desprendendo-se em grandes placas e lâminas. As folhas são alternas, pecioladas, falciforme lanceoladas de até 35 cm de comprimento por 10 cm de largura, verticais ou oblíquas sobre os ramos adultos, agudas, coriáceas, igualmente verde-fuso nas duas páginas, luzídias possuidoras de numerosas glândulas óleo-resinosas, ricas em óleo essencial (basicamente eucaliptol) e taninos. As flores são grandes, brancas e vistosas, com corola de estrutura singular que, ao desabrocharem as flores, caem unidas com a forma de uma pequena tampa. O fruto descreve-se como uma cápsula turbinada, quadrangular, verrucosa, grande, com 4 a 6 valvas exsertas e convergentes. A madeira é clara, compacta e elástica (CORRÊA et al., 1984).

Introduzida nas Américas em 1792, é considerada umas das árvores mais conhecidas no mundo, uma vez que além da grande rusticidade e rápido crescimento, é também do mais alto valor sob vários aspectos, tais como: reflorestamento, grande adaptabilidade e extensivo uso medicinal. Sob este último aspecto, dados relatam que, devido às suas propriedades medicinais, o óleo essencial desta espécie passa a ser produzido industrialmente na Austrália em 1860. As folhas de *E. globulus* têm sido empregadas topicamente para a cura de feridas, úlceras e outras enfermidades dos tecidos e pele, além de seu uso sob a forma de infusões contra afecções das vias respiratórias e do trato digestivo (ALONSO, 2000; CORRÊA et al., 1984).

Figura 01- Fotografia da árvore *E. globulus*.

Figura 02- Detalhe das folhas e flores de *E. globulus*.

A principal característica medicinal de *E. globulus* é sua ação terapêutica sobre o sistema respiratório, a qual se dá em função de seu óleo essencial, o qual possui atividade expectorante, anti-séptica das vias aéreas e fluidificante da secreção bronquial (ALONSO, 1998), além da ação desinfetante (DAYAL & AYYAR, 1986; BETTS, 2000), antimalárica (CORRÊA, 1984), analgésica, antiinflamatória, (SILVA et al., 2003) e antimicrobiana (CIMANGA et al., 2002).

Estudos de OSAWA et al. (1995) com extratos hidroalcoólicos e frações em acetato de etila (OSAWA et al., 1996) das folhas de *E. globulus*, demonstraram uma apreciável atividade antibacteriana contra bactérias cariogênicas. Seus resultados sugerem ser o sesquiterpeno eucaliptona o responsável por esta atividade. Da mesma forma, estudos de TAKAHASHI et al. (2004) demonstraram o potencial efeito antimicrobiano de extratos das folhas desta planta, principalmente contra bactérias gram-positivas.

Do ponto de vista fitoquímico, é bastante expressivo o número de estudos evidenciando a grande diversidade de micromoléculas presentes em *E. globulus*. Pesquisas com o óleo essencial desta espécie permitiram a identificação de pelo menos 30 componentes, sendo que os majoritários são: 1,8-cineol, canfeno, α -pineno, globulol, limoneno, β -pineno, *p*-cimeno, aromadendreno, mirceno, γ -terpineno, α -terpineol e limoneno (CIMANGA et al., 2002; GUO & YANG, 2006; DAYAL & AVYAR, 1986). Das folhas, foram identificados os monoterpenos sabineno, α -felandreno, terpinoneno e 1,2,4-trimetilbenzeno (HE et al., 2000a) além daqueles também encontrados no óleo essencial e outros terpenóides (SANTOS et al., 1997), como por exemplo a eucaliptona (OSAWA et al., 1995), flavonóides e taninos. Do caule desta espécie foram isolados os triterpenóides β -amirina, eritrodiol, uvaol, ácido acetiloleanóico, ácido acetilbetulínico e ácido acetilursólico, além de outros triterpenóides. Dos frutos, finalmente, vale a pena destacar a presença da cipelocarpina C, um glicosídeo fenólico esterificado com ácido oleuropêico, que constitui um potente agente antitumoral (GUO & YANG, 2006).

Assim, neste trabalho buscou-se o desenvolvimento e a aplicação de metodologia analítica para a quantificação do 1-8-cineol por cromatografia de fase gasosa visando contribuir para o controle de qualidade de *E. globulus*, desde a matéria-prima até o produto acabado.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- a) Desenvolver e validar um método analítico para o doseamento de 1,8-cineol por cromatografia gasosa, capaz de quantificar com exatidão o marcador 1,8-cineol nas folhas desidratadas de *Eucalyptus globulus*, extratos, óleo essencial e xarope de eucalipto;
- b) Identificar os principais constituintes presentes nos óleos essenciais de espécies do gênero *Eucalyptus* e relacioná-los com sua concentração relativa;
- c) Desenvolver um procedimento simples e eficaz para a análise qualitativa da espécie *E. globulus* para comprovação de sua identidade e diferenciação de outras espécies do gênero;
- d) Aplicar a metodologia desenvolvida no controle de qualidade de toda a cadeia produtiva do fitoterápico em questão, desde a obtenção da matéria-prima até a forma farmacêutica final.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Material Vegetal

- Folhas desidratadas de *E. globulus* – amostra gentilmente cedida e identificada por Quimer Comércio de Ervas, lote 033 de agosto de 2003.
- Folhas frescas de *E. botryoides*, *E. citriodora* e *E. grandis* – coletadas no jardim da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras do Campus da USP de Ribeirão Preto (FFCLRP).
- Folhas frescas de *E. elba*, *E. microcorys*, *E. paniculata*, *E. resinifera*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. tereticornis* e *E. urophylla* – coletadas na Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade (FEENA) de Rio Claro (SP).

3.1.2. Solventes e padrões

- 1,2,3,4-tetrametilbenzeno – padrão Merck.
- 1,8-cineol - padrão Sigma-Aldrich 11K2500 (CAS 470-82-6).
- Água purificada em sistema MILLI-Q-PLUS da MILLIPORE (Bedford, USA).
- Etanol, metanol, acetato de etila e *n*-hexano grau analítico da marca Synth.
- Metanol, acetato de etila e *n*-hexano grau cromatográfico da marca J. T. Baker.
- *n*-alcanos da marca Alltech: *n*-nonano (C9), *n*-decano (C10), *n*-undecano (C11), *n*-tridecano (C13), *n*-tetradecano (C14), *n*-pentadecano (C15), *n*-hexadecano (C16), *n*-heptadecano (C17), *n*-octadecano (C18), *n*-nonadecano (C19) e *n*-eicosano (C20).
- Piperonal - padrão Sigma-Aldrich.

3.2. Equipamentos

- Aparelho de Clevenger.
- Balança analítica Shimadzu AY 220.
- Coluna capilar de sílica fundida HP-1 (Hewlett Packard), metil-siloxano de dimensões: 30,0 m x 320 μ m x 0,25 μ m.
- Coluna capilar de sílica fundida HP-5 (Hewlett Packard), 5% fenil-metil-siloxano de dimensões: 30,0 m x 320 μ m x 0,25 μ m.
- Coluna capilar HP-5 MS (Hewlett Packard), de dimensões: 30,0 m x 250,0 μ m x 0,25 μ m.
- Colunas percoladoras – escala laboratorial.
- Cromatógrafo de fase gasosa equipado com detector de ionização em chama (CG-DIC) modelo 6890N - Hewlett Packard – Agilent Technologies, Inc, operando com o software HP *ChemStation*.
- Cromatógrafo de fase gasosa equipado com detector seletivo de massas da Shimadzu (CG-MS) modelo GCMS – QP 2010.
- Destilador MILLI Q – MILLIPORE.
- Estufa – Fanen 315 SE.
- Microcentrífuga Sanyo, Micro Centaur.
- Mufla – Fornitec 2043.
- Phmetro – Micronal B 474.
- Refratômetro ABBE – PZO RL3.
- *Shaker* (agitador) - Innova 4300.
- Vidrarias volumétricas e pipetas automáticas com calibração RBC.

3.3. Obtenção das amostras

3.3.1. Preparo inicial da amostra de folhas desidratadas de *E. globulus*

Aproximadamente 200,0 g de folhas de *E. globulus* foram finamente trituradas em moinho e o tamanho de partículas padronizado em tamiz malha 30 mesh. O pó obtido foi utilizado durante todo o processo de validação do método analítico desenvolvido, bem como para a obtenção dos subprodutos óleo essencial, tintura, extratos fluidos e xarope.

3.3.2. Obtenção das amostras de espécies do gênero *Eucalyptus*

As amostras de folhas frescas de *E. botryoides*, *E. citriodora* e *E. grandis* foram coletadas no campus da USP de Ribeirão Preto e identificadas pelo Prof. Dr. Milton Groppo Júnior, da FFCLRP. Um exemplar de cada espécie foi depositado no herbário SPFR da FFCLRP, sob os respectivos códigos SPFR 1122, SPFR 1220, SPFR 1221. Para a espécie *E. globulus* utilizou-se a amostra descrita no item 3.1.1.

Já as espécies identificadas *E. elba*, *E. microcorys*, *E. paniculata*, *E. resinifera*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. tereticornis* e *E. urophylla* foram coletadas na Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade (FEENA) localizada no município de Rio Claro, estado de São Paulo. Um exemplar de cada espécie foi depositado no herbário SPFR da FFCLRP sob os respectivos códigos: F.B.COSTA #151, #158, #157, #155, #154, #152, #156 e #153.

3.3.3. Obtenção dos óleos essenciais para posterior obtenção dos *fingerprints*

Os óleos essenciais das espécies do gênero *Eucalyptus* foram obtidos pelo método de hidrodestilação utilizando-se o aparelho de Clevenger. Para um balão de fundo redondo de 500,0 mL foram transferidos cerca de 50,0 g do material vegetal

desidratado e 350,0 mL de água destilada, procedendo-se à extração por cinco horas. Os óleos obtidos foram recolhidos e armazenados em freezer ao abrigo da luz.

3.3.4. Obtenção da tintura de *E. globulus*

Uma tintura não heróica foi preparada empregando-se o Processo Geral M, conforme descrito na Farmacopéia Brasileira 1ª edição (1926). Vinte gramas das folhas de *E. globulus*, trituradas e tamizadas, foram maceradas em álcool 70% v/v por oito dias, com agitação ocasional, à temperatura ambiente. Em seguida filtrou-se em papel de filtro, lavando-se o resíduo até a obtenção de 100,0 mL de tintura.

3.3.5. Obtenção dos extratos fluidos de *E. globulus*

Foram preparados dois extratos fluidos (proporção de 1:1), empregando-se o processo A e o processo C de percolação, ambos descritos na Farmacopéia Brasileira 1ª edição (1926).

Como descrito no processo A, foram umedecidas 100,0 g de folhas secas e pulverizadas com uma mistura de etanol e água (3:1) e deixou-se em repouso por seis horas. Em seguida percolou-se utilizando o mesmo solvente extrator até se obter 20,0 mL de extrato, o qual foi reservado. Em seguida esgotou-se a droga com quantidade suficiente do solvente extrator e evaporou-se em banho-maria a 40 °C com o auxílio de ar comprimido, até a obtenção de um resíduo xaroposo. Finalmente, este foi dissolvido à porção posta à parte, completando-se o volume do extrato para 100,0 mL.

De acordo com o processo C, 100,0 g das folhas desidratadas e pulverizadas foram divididos em três porções de, respectivamente, 50,0 g, 30,0 g e 20,0 g.

Umedeceu-se a primeira porção com a mistura de etanol e água (3:1) e deixou-se em maceração por seis horas. Em seguida percolou-se vagorosamente reservando-se

os primeiros 20,0 mL e recolhendo-se mais cinco frações de 30,0 mL, enumeradas de 1 a 5. Em seguida, umedeceu-se a segunda porção da droga com a primeira fração de 30,0 mL e macerou-se por seis horas. Da mesma forma percolou-se vagorosamente empregando-se as frações obtidas da primeira coluna, separando-se e reservando-se os primeiros 30,0 mL e recolhendo-se mais quatro frações de 20,0 mL. A terceira porção da droga foi umedecida com a primeira fração de 20,0 mL e macerou-se por seis horas. Empregando-se as frações obtidas da segunda coluna, percolou-se vagorosamente até se obterem 50,0 mL de extrato, o qual foi adicionado às duas frações reservadas anteriormente, obtendo-se, finalmente, um volume de 100,0 mL de extrato fluido 1:1.

3.3.6. Obtenção da forma farmacêutica “xarope” contendo extrato fluido de *E. globulus* – xarope de eucalipto

Para um béquer de capacidade de 500,0 mL transferiram-se 20,0 g do extrato fluido obtido pelo processo C de percolação. Em seguida completaram-se 200,0 g com um xarope-base constituído de açúcar líquido invertido, mel (10% m/m) e sorbato de potássio. Homogeneizou-se e transferiu-se para um frasco âmbar.

3.4. Caracterização físico-química da planta desidratada, tintura, extratos fluidos e xarope de eucalipto

Para a planta desidratada foram avaliados os seguintes parâmetros: perda por dessecação, porcentagem de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido clorídrico e teor de óleo essencial; para a tintura e extratos fluidos foram determinados o teor resíduo seco, densidade relativa e teor alcoólico, todos os métodos constantes na Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1988). Finalmente, para o xarope avaliaram-se a densidade relativa, o resíduo seco, pH, acidez livre e o índice de refração (BRASIL, 2005).

3.4.1. Caracterização físico-química da planta desidratada

a) Perda por dessecação

Cerca de 2,0 g da planta desidratada foram transferidos para pesa-filtro seco e tarado e este foi mantido em estufa a 100 °C por cinco horas. Após este tempo, pesou-se e retornou-se o pesa-filtro para a estufa até que a diferença no peso entre duas pesagens consecutivas fosse menor ou igual a 0,002 g. Calculou-se desta forma a porcentagem de voláteis presentes na amostra, incluindo a água.

b) Determinação de cinzas totais

Para um cadinho de porcelana, previamente pesado, transferiu-se 1,0 g da amostra e incinerou-se a 450 °C. O resultado foi expresso em % m/m.

c) Determinação de cinzas insolúveis em ácido

Ao cadinho utilizado na determinação de cinzas totais, contendo o resíduo, foram adicionados 25,0 mL de ácido clorídrico (70 g/L). Ferveu-se a mistura por cinco minutos e filtrou-se em papel de filtro quantitativo lavando-o com água quente. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original e incinerado a 800 °C até peso constante. O resultado foi expresso em % m/m.

d) Determinação do teor de óleo essencial

O teor de óleo essencial de *E. globulus* foi determinado por hidrodestilação. Para um balão de fundo redondo de 1000,0 mL foram transferidos 50,0 g do material vegetal desidratado e 500,0 mL de água destilada, procedendo-se à extração por cinco horas. óleo recolhido em tubo graduado foi medido e o teor calculado em mililitros de óleo essencial por 100,0 g da droga vegetal.

3.4.2. Caracterização físico-química da tintura e extratos fluidos

a) Determinação do resíduo seco

Para um pesa-filtro seco e tarado, transferiram-se cerca de 3,0 g da tintura e este foi colocado em estufa a 100 °C por três horas. Após este tempo, pesou-se e retornou-se o pesa-filtro para a estufa até que a diferença no peso entre duas pesagens consecutivas fosse menor ou igual a 0,002 g. Calculou-se porcentagem de sólidos solúveis presentes na tintura.

b) Determinação do teor alcoólico

O teor alcoólico da tintura foi determinado com o auxílio de um alcoômetro, à temperatura de 20 °C. O resultado foi expresso em % v/v.

c) Determinação da densidade relativa

A densidade relativa foi determinada pelo método do picnômetro, à temperatura de 25°C.

3.4.3. Caracterização físico-química do xarope de eucalipto

a) Determinação do resíduo seco

Para um vidro de relógio seco e tarado, foram transferidos cerca de 0,5 g do xarope e 1,0 mL de água destilada. Em seguida deixou-se em estufa a 100 °C por três horas. Após este tempo, pesou-se e retornou-se o vidro de relógio limpo para a estufa até que a diferença no peso entre duas pesagens consecutivas fosse menor ou igual a 0,002 g. Calculou-se desta forma a porcentagem de resíduo seco presente na amostra.

b) Determinação do pH

Para a determinação do pH preparou-se uma solução a 1,0% da amostra em água destilada. As leituras foram realizadas a 25 °C.

c) Determinação da acidez livre

A determinação da acidez livre foi determinada utilizando-se a amostra preparada para a determinação do pH. Com o auxílio de uma bureta de 10,0 mL titulou-se a amostra com uma solução padronizada de hidróxido de sódio 0,1 M até atingir-se o ponto de viragem indicado com fenolftaleína. O resultado foi obtido em % m/m expressos em ácido fórmico.

d) Determinação do índice de refração

O índice de refração foi determinado realizando-se leitura direta utilizando-se o refratômetro de ABBE, a 20 °C.

e) Determinação da densidade relativa

A densidade relativa foi determinada pelo método do picnômetro, à 25 °C.

3.5. Desenvolvimento do método analítico para quantificação de 1,8-cineol em folhas desidratadas de *E. globulus*, extrato fluido, óleo essencial e xarope de eucalipto por cromatografia gasosa**3.5.1. Condições cromatográficas****3.5.1.1. Cromatografia de fase gasosa acoplada ao detector de ionização em chama (CG-DIC)**

O método analítico foi desenvolvido em cromatógrafo de fase gasosa, operando com o software HP *ChemStation*. O injetor operou no modo *split* (20:1), à temperatura de 250 °C, enquanto o detector de ionização em chama operou à

temperatura de 270 °C. Como gás de arraste utilizou-se hidrogênio, com fluxo de 2,2 mL/min.

Para as análises utilizou-se a coluna capilar de sílica fundida (HP-5, 5% fenil-metil-siloxano, de dimensões: 30,0 m x 320 µm x 0,25 µm). Finalmente, o programa de temperatura do forno foi estabelecido de acordo com a **Tabela 02**, a seguir.

Tabela 02- Programa de temperatura desenvolvido para o método analítico.

Rampa (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Tempo total (min)
inicial	75	6,0	6,0
15	90	1,0	7,0
10	200	1,0	20,0
final	75	-	-

3.5.1.2. Cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A análise em CG-EM foi realizada em cromatógrafo de fase gasosa equipado com detector seletivo de massas. Os espectros foram obtidos no modo impacto eletrônico. As condições cromatográficas foram idênticas às descritas na **Tabela 02**. A comparação dos tempos de retenção obtidos nos dois equipamentos utilizados nesse trabalho foi feita após a determinação do índice de retenção (IR) dos principais constituintes.

3.5.2. Determinação dos índices de retenção (IR) dos principais constituintes do extrato *n*-hexânico das folhas de *E. globulus* e dos óleos essenciais das 12 espécies do gênero

Para a determinação dos principais compostos presentes nas folhas de *E. globulus* e para, posteriormente, a determinação da seletividade do método, a amostra

utilizada para a determinação dos índices de retenção foi preparada a partir de um extrato hexânico das folhas desta espécie obtido de acordo com o Item 3.5.6. A 1,0 mL deste extrato foi adicionado 1,0 mL de solução composta de 11 hidrocarbonetos (C9, C10, C11, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19 e C20), todos na concentração de 145,0 µg/mL. Em seguida, injetaram-se 1,0 µL dessa mistura e 1,0 µL da solução de hidrocarbonetos, tanto em CG-DIC quanto em GC-EM.

Finalmente, com os tempos de retenção obtidos, calculou-se o índice de retenção (IR) para cada pico do cromatograma, de acordo com a equação descrita por CLEMENT (1990):

$$IR = \left\{ \frac{100 \times \log (tr_x - tr_{cn-1})}{\log (tr_{cn} - tr_{cn-1})} \right\} + 100 \times C_{n-1}$$

Em que:

tr_x = tempo de retenção do analito

tr_{cn} = tempo de retenção do n -alcano posterior ao analito

tr_{cn-1} = tempo de retenção do n -alcano anterior ao analito

C_n = número de carbonos do n -alcano posterior

C_{n-1} = número de carbonos do n -alcano anterior

O mesmo procedimento foi realizado para a determinação do IR dos principais constituintes do óleo essencial das 12 espécies do gênero *Eucalyptus*. Para tanto, injetou-se 1,0 µL da solução amostra (preparada de acordo com o item 3.5.6) acrescida de 1,0 µL da solução de hidrocarbonetos, tanto em CG-DIC quanto em GC-EM.

3.5.3. Escolha dos padrões interno e secundário

A escolha dos padrões foi feita avaliando-se a solubilidade dos possíveis padrões em *n*-hexano e também se verificando a não coincidência dos picos destes com os picos da amostra. Foram avaliados os seguintes compostos: piperonal, veratraldeído, cumarina, hidroxycumarina, trimetoxibenzaldeído, vanilina, tetrametilbenzeno e benzofenona, todos preparados na concentração de 100,0 µg/mL em *n*-hexano grau cromatográfico.

3.5.4. Escolha do melhor método de extração das folhas

Inicialmente, a escolha do melhor método de extração foi feita comparando-se a eficiência da extração dos componentes majoritários das folhas desidratadas de *E. globulus* frente a três solventes diferentes, a saber: *n*-hexano, acetato de etila e etanol. As amostras foram preparadas empregando-se 0,5 g das folhas trituradas e 20,0 mL de cada solvente. Verificou-se a amplitude do pico de 1,8-cineol, sendo que o solvente de escolha foi o *n*-hexano.

Em seguida, determinou-se o melhor tempo de extração em condições de temperatura e agitação já definidas. Para tanto, 0,5 g da amostra foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 125,0 mL, juntamente com 20,0 mL de *n*-hexano contendo 100,0 µg/mL de TMB. O frasco foi vedado e colocado em agitador mecânico (Innova 4300), com agitação constante de 150 rpm a temperatura de 40 °C. Alíquotas de 50,0 µL foram retiradas de 30 em 30 minutos e elaborou-se uma curva relacionando tempo de extração *versus* área do pico de 1,8-cineol.

3.5.5. Escolha do melhor método de extração do xarope

A escolha do melhor método para a extração do marcador 1,8-cineol do xarope de eucalipto foi realizada empregando-se uma amostra de xarope com concentração

conhecida de 1,8-cineol padrão. Exaustivos experimentos foram realizados quando de variaram os solventes *n*-hexano e acetato de etila, a quantidade da amostra, diferentes volumes do solvente extrator, diferentes frequências de agitação e diferentes temperaturas e tempos de extração. A eficiência de cada procedimento foi determinada calculando-se a taxa de recuperação do padrão, e a melhor condição fixada para posterior validação.

3.5.6. Preparo das amostras para quantificação

a) Folhas desidratadas

Para um frasco Erlenmeyer de 125,0 mL transferiu-se 0,5 g das folhas de *E. globulus* finamente trituradas e tamizadas. Em seguida, adicionaram-se, com pipeta volumétrica, 20,0 mL de solução de TMB (100,0 µg/mL). Vedou-se o frasco e procedeu-se à extração à 40 °C, com agitação de 150 rpm, por duas horas. Após este tempo, filtrou-se o extrato obtido, e centrifugou-se uma alíquota de 1,0 mL por três minutos à 13.000 rpm. Em seguida, injetou-se no cromatógrafo 1,0 µL do sobrenadante.

b) Óleos essenciais

Os óleos essenciais de diferentes espécies de *E. globulus* foram preparados empregando-se a diluição em *n*-hexano, contendo o padrão interno. Para um balão volumétrico de 50,0 mL transferiram-se 25,0 mg da amostra e completou-se o volume com a solução de *n*-hexano, contendo 100,0 µg/mL de TMB. Homogeneizou-se e injetou-se 1,0 µL no cromatógrafo.

c) Tintura

Para um balão volumétrico de 50,0 mL, transferiu-se, utilizando-se uma pipeta volumétrica, 5,0 mL da tintura completando-se o volume com uma solução de metanol contendo 100,0 µg/mL de TMB ($D \times 10$). Homogeneizou-se e injetou-se 1,0 µL no cromatógrafo.

d) Extratos fluidos

Para um balão volumétrico de 50,0 mL, transferiu-se, utilizando-se pipeta volumétrica, 1,0 mL dos extratos fluidos, completando-se o volume com uma solução de metanol contendo 100,0 µg/mL de TMB ($D \times 50$). Homogeneizou-se e injetou-se 1,0 µL no cromatógrafo.

e) Xarope de eucalipto

Para um frasco Erlenmeyer de 125,0 mL, transferiram-se cerca de 10,0 g do xarope de eucalipto, 5,0 mL de água destilada e 50,0 mL de uma solução de *n*-hexano contendo 100,0 µg/mL de TMB. Homogeneizou-se, vedou-se o frasco e deixou-se sob agitação por 60 minutos em *Shaker* a 150 rpm, a uma temperatura de 42 °C. Em seguida, resfriou-se o frasco a temperatura ambiente, centrifugou-se e injetou-se 1µL no cromatógrafo.

f) Amostra placebo

Para um béquer de 100,0 mL, pesaram-se os componentes da formulação xarope, exceto o extrato fluido de eucalipto. Homogeneizou-se e reservou-se para os estudos de recuperação.

g) Solução de TMB 100,0 µg/mL

Para um balão volumétrico de 1000,0 mL, transferiram-se 100,0 mg do padrão de 1,2,3,4-tetrametilbenzeno e completou-se o volume com *n*-hexano grau cromatográfico. Homogeneizou-se. Esta solução foi mantida estocada em refrigerador.

h) Curva analítica para as quantificações de rotina

A curva analítica foi preparada em triplicata a partir de três soluções-mãe e com diluições sucessivas destas, utilizando, para tanto, pipeta automática calibrada de 1,0 mL.

Para balão volumétrico de 50,0 mL transferiram-se 20,0 mg do padrão de 1,8-cineol e 20,0 mg do TMB, completando-se o volume com *n*-hexano grau cromatográfico (solução-mãe 1). Em seguida, prepararam-se as soluções de referência transferindo-se alíquotas da solução-mãe 1 para tubos de ensaio com tampa esmerilhada, do acordo com o que se segue, de forma a se obterem as seguintes concentrações:

- 200,0 µg/mL: transferiu-se 1,0 mL de *n*-hexano e 1,0 mL da solução-mãe 1. Homogeneizou-se.
- 100,0 µg/mL: transferiu-se 1,0 mL de *n*-hexano e 1,0 mL da solução 200,0 µg/mL. Homogeneizou-se.
- 50,0 µg/mL: transferiu-se 1,0 mL de *n*-hexano e 1,0 mL da solução 100,0 µg/mL. Homogeneizou-se.
- 25,0 µg/mL: transferiu-se 1,0 mL de *n*-hexano e 1,0 mL da solução 50,0 µg/mL. Homogeneizou-se.
- 150,0 µg/mL: transferiu-se 2,5 mL de *n*-hexano e 1,5 mL da solução-mãe 1. Homogeneizou-se.
- 75,0 µg/mL: transferiu-se 1,0 mL de *n*-hexano e 1,0 mL da solução 150,0 µg/mL. Homogeneizou-se.

3.6. Validação do método para a quantificação de 1,8-cineol em folhas desidratadas, extrato fluido e óleo essencial de *E. globulus* e xarope de eucalipto

3.6.1. Seletividade

A seletividade foi determinada da mesma forma para as folhas, extrato fluido e óleo essencial de *E. globulus* de duas maneiras diferentes.

Primeiramente injetaram-se o solvente extrator *n*-hexano, uma solução contendo 100,0 µg/mL de 1,8-cineol em *n*-hexano e as amostras (folhas, óleo essencial e extrato fluido), preparadas de acordo com o item 3.5.6, com o objetivo de se verificar a pureza dos picos. Determinou-se também a resolução, com a finalidade de se verificar a separação do pico do 1,8-cineol do pico do limoneno, de acordo com a equação (USP, 2005):

$$R = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{(W_{b1} + W_{b2})}$$

Em que:

R = resolução

t_r = tempo de retenção

W_b = largura da base

Num segundo momento foi feita uma análise por cromatografia de fase gasosa utilizando-se como detector um espectrômetro de massas (CG-EM), com a finalidade de certificar a pureza do pico do marcador.

Para o xarope de eucalipto, a especificidade foi determinada de forma semelhante às folhas, extrato fluido e óleo essencial. Primeiramente, injetaram-se o solvente extrator *n*-hexano, uma solução contendo cerca de 100,0 µg/mL de 1,8-cineol,

TMB e piperonal em *n*-hexano e uma amostra do xarope preparada e extraída conforme 3.5.6 com o objetivo de se verificar a pureza dos picos.

Num segundo momento foi feita uma segunda análise injetando-se uma amostra do placebo com a finalidade de se verificar a não co-eluição de componentes da matriz com o marcador 1,8-cineol.

3.6.2. Linearidade

Para a determinação da linearidade foram elaboradas curvas analíticas a partir de diluições seriadas de soluções-mãe contendo o marcador 1,8-cineol, o padrão interno TMB e o padrão secundário piperonal.

Para um balão volumétrico de 50,0 mL, transferiram-se, respectivamente, 40,0 mg de 1,8-cineol, 40,0 mg de piperonal e 20,0 mg de TMB. Adicionou-se *n*-hexano, dissolvendo-se os padrões com o auxílio de um ultra-som e completou-se o volume com este mesmo solvente. Desta forma foram preparadas três soluções-mãe, as quais precederam uma série de diluições fornecendo as seguintes concentrações, em µg/mL, para a cada padrão:

- 1,8-Cineol: 640,0; 400,0; 320,0; 200,0; 160,0; 100,0; 80,0; 50,0 e 40,0.
- Piperonal: 640,0; 400,0; 320,0; 200,0; 160,0; 100,0; 80,0; 50,0 e 40,0.
- TMB: 320,0; 200,0; 160,0; 100,0; 80,0; 50,0; 40,0; 25,0 e 20,0.

Finalmente, um volume de 1,0 µL de cada solução (contendo os três padrões utilizados neste estudo) foi injetado no cromatógrafo, fornecendo, desta forma, as áreas para a elaboração das curvas analíticas.

A linearidade foi obtida através do coeficiente de correlação linear (R^2) da média das três curvas, para os três padrões. Já as fórmulas para a quantificação do marcador foram deduzidas a partir das equações da reta de cada padrão.

3.6.3. Limite de Detecção (LDM) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção do método (LDM ou LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados através da análise estatística de dados de três curvas analíticas elaboradas à uma concentração próxima ao limite de detecção/quantificação.

Primeiramente, injetaram-se concentrações decrescentes e conhecidas de uma solução padrão, até que a integração do pico pelo aparelho não fosse mais possível. Em seguida, após ser detectado um pico cuja área pudesse ser integrada, prepararam-se três curvas analíticas, a partir de diluições sucessivas de uma solução padrão-mãe, preparada em *n*-hexano, de forma a obterem-se os seguintes pontos: 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 25 µg/mL. Injetou-se 1,0 µL para cada um dos pontos e plotaram-se as curvas analíticas, as quais forneceram as equações da reta ($y = ax + b$) para a obtenção dos dados que, posteriormente, foram aplicados às fórmulas:

$$LD = 3,3 \times \frac{Sb}{Sa}$$

$$LD = 10 \times \frac{Sb}{Sa}$$

Em que:

Sb = estimativa do desvio padrão do coeficiente linear (b) obtido a partir de três curvas analíticas

Sa = estimativa do desvio padrão do coeficiente angular (a) obtido a partir de três curvas analíticas.

3.6.4. Exatidão

3.6.4.1. Folhas desidratadas de *E. globulus*

A exatidão foi determinada avaliando-se a recuperação do marcador das folhas quando estas eram submetidas ao processo de extração.

Os estudos de recuperação foram feitos com fortificação da amostra em três níveis de concentração diferentes, ou seja, alto, médio e baixo, em quadruplicata.

Aproximadamente 20,0 g de folhas desidratadas de *E. citriodora* foram finamente trituradas e o tamanho de partícula uniformizado com o auxílio de um tamiz. Em seguida, com a finalidade de se extrair os compostos majoritários para posterior enriquecimento, o material vegetal foi extraído exaustivamente em aparelho Soxhlet durante 36 horas, com 150,0 mL de *n*-hexano. Finalizado o processo, o material esgotado foi seco em estufa a 40 °C. Para a confirmação da não existência de 1,8-cineol nas folhas, uma amostra foi preparada e analisada, de acordo com o item 3.5.6.

Em seguida, para 12 frascos Erlenmeyer de 125,0 mL, pesaram-se 0,5 g da planta esgotada, sendo que estes foram divididos em três grupos. No primeiro grupo (quatro replicatas correspondentes à concentração baixa) adicionou-se 1,0 mL de uma solução padrão a 2,5 mg/mL de 1,8-cineol em *n*-hexano; no segundo grupo (concentração média) adicionaram-se 2,0 mL da solução padrão; finalmente no terceiro grupo (concentração alta) adicionaram-se 4,0 mL da solução padrão. Após homogeneização adicionaram-se, em cada frasco 20,0 mL de uma solução de TMB 100,0 µg/mL em *n*-hexano e procedeu-se à extração utilizando-se agitador mecânico a 150 rpm, por duas horas, a 40 °C.

Terminado o processo de extração a amostra foi filtrada e alíquotas de 5,0 mL foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2,0 mL de uma solução de piperonal

0,560 µg/mL, totalizando-se as seguintes concentrações finais de 1,8-cineol: 85,03 µg/mL, 162,34 µg/mL e 297,62 µg/mL.

Os padrões interno e secundário tiveram concentrações finais de 68,03 µg/mL, 64,93 µg/mL e 59,62 µg/mL para o TMB e 160,0 µg/mL para o piperonal, respectivamente. Foram injetadas no cromatógrafo alíquotas de 1,0 µL.

A porcentagem de recuperação foi determinada de acordo com a expressão:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Valor teórico} - \text{Valor}}{\text{Valor Real}} \times 100$$

3.6.4.2. Xarope de eucalipto

A exatidão foi determinada avaliando-se a recuperação do marcador do xarope de eucalipto quando estes eram submetidos ao processo de extração.

Os estudos de recuperação foram feitos com fortificação da amostra em três níveis de concentração diferentes, ou seja, alto, médio e baixo, em quadruplicata.

Para 12 frascos Erlenmeyer de 125,0 mL, pesaram-se 10,0 g da base do xarope (placebo), sendo que estes foram divididos em três grupos. No primeiro grupo (quatro replicatas correspondentes à concentração baixa) adicionou-se 0,5 mL de uma solução padrão de 1,8-cineol na concentração de 5,0 mg/mL em *n*-hexano já contendo 100 µg/mL de TMB; no segundo grupo (concentração média) adicionou-se 1,0 mL da solução padrão; finalmente no terceiro grupo (concentração alta) adicionaram-se 2,0 mL da solução padrão. Em seguida adicionaram-se, em cada frasco 10,0 mL de água destilada, 20,0 mL de uma solução de TMB 100,0 µg/mL em *n*-hexano e procedeu-se à extração utilizando-se agitador mecânico a 150 rpm, por uma hora, a 42 °C. Terminado o processo de extração a amostra foi filtrada e alíquotas de 5,0 mL foram transferidas

para tubos de ensaio contendo 2,0 mL de uma solução de piperonal 0,560 µg/mL, totalizando-se as seguintes concentrações finais de 1,8-cineol: 35,36 µg/mL, 70,03 µg/mL e 137,36 µg/mL. Os padrões interno e secundário tiveram concentrações finais de 71,43 µg/mL, para o TMB e 160 µg/mL de piperonal. Foram injetadas no cromatógrafo alíquotas de 1,0 µL.

3.6.5. Precisão

A precisão do método foi determinada em dois níveis para as folhas desidratadas de *E. globulus* e para o xarope de eucalipto.

a) Repetitividade (precisão intra-ensaio)

Para a determinação da repetitividade preparam-se seis replicatas de cada amostra de acordo com o item 3.5.6, injetando-se um volume de 1,0 µL. O resultado foi expresso em função da estimativa do desvio padrão relativo das injeções (n=6).

b) Precisão Intermediária

Da mesma forma, como descrito no item acima, a precisão intermediária foi determinada sob as mesmas condições experimentais, porém em dias diferentes.

3.6.6. Robustez

3.6.6.1. Folhas desidratadas de *E. globulus*

A robustez foi determinada utilizando-se as folhas desidratadas através da aplicação do teste de *Yuden*. Para tanto, construiu-se uma matriz de testes variando-se os parâmetros de acordo com a **Tabela 03** a seguir:

Tabela 03- Parâmetros analíticos variados para a determinação da robustez.

Código	Fator	Nominal	Variação
A ou a	Tempo de agitação	2 horas	1,5 hora
B ou b	Temperatura de extração	40 °C	30 °C
C ou c	Frequência de agitação	150 rpm, const	100 rpm
D ou d	Vazão do gás	2,2 mL/min	2,1 mL/min
E ou e	Temperatura de injeção	250 °C	240 °C
F ou f	Temperatura de detecção	270 °C	260 °C
G ou g	Tamanho da amostra	500,0 mg / 20,0 mL	250,0 mg / 10,0 mL

Aplicando-se as combinações conforme a matriz (**Tabela 01**), obtiveram-se as seguintes combinações:

s- nenhuma variação

t- mudança na frequência de agitação, temperaturas de detecção e injeção e tamanho da amostra

u- mudança na temperatura de extração, vazão do gás, temperatura de detecção e tamanho da amostra

v- mudança na temperatura de extração, frequência de agitação, vazão do gás e temperatura de injeção

w- mudança no tempo de agitação, vazão do gás, temperatura de injeção e tamanho da amostra

x- mudança no tempo de agitação, frequência de agitação, vazão do gás e temperatura de detecção

y- mudança no tempo de agitação, temperatura de extração, temperatura de injeção e detecção

z- mudança no tempo de agitação, temperatura de extração, frequência de agitação e tamanho da amostra

3.6.6.2. Xarope de eucalipto

Para o xarope de eucalipto a robustez foi determinada através da aplicação do teste de *Yuden*, da mesma forma que para as folhas desidratadas de *E. globulus*. Para tanto, construiu-se uma matriz de testes variando-se os parâmetros de acordo com a **Tabela 04** a seguir:

Tabela 04- Parâmetros analíticos variados para a determinação da robustez.

Código	Fator	Nominal	Variação
A ou a	Tamanho da amostra	10,0 g	5,0 g
B ou b	Quantidade de solvente	50,0 mL	25,0 mL
C ou c	Temperatura de extração	42 °C	30 °C
D ou d	Frequência de agitação	150 rpm	100 rpm
E ou e	Tempo de agitação	60 min	30 min
F ou f	Quantidade de água	5,0 mL	0,0 mL

Aplicando-se as combinações conforme a **Tabela 01**, obtiveram-se as seguintes combinações:

s- nenhuma variação

t- mudança na temperatura de extração, tempo de agitação e ausência de água.

u- mudança na quantidade de solvente, frequência de agitação e ausência de água.

v- mudança na quantidade de solvente, temperatura de extração, frequência e tempo de agitação.

w- mudança no tamanho da amostra, frequência de agitação e tempo de agitação.

x- mudança no tamanho da amostra, temperatura extração, frequência de agitação e ausência de água.

y- mudança no tamanho da amostra, quantidade de solvente, tempo de agitação e ausência de água

z- mudança no tamanho da amostra, quantidade de solvente, temperatura de extração.

3.7. Análise estatística

Inicialmente, para todos os parâmetros determinados na etapa de validação, o tratamento dos dados foi feito através dos cálculos da média ($\bar{X}$), desvio padrão (S) e coeficiente de variação ($\%CV$), de acordo com as expressões a seguir (RIBANI, 2004):

$$\text{Média: } \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

$$\text{Desvio padrão: } S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

$$\text{Coeficiente de variação: } \%CV = \frac{(S \times 100)}{\bar{X}}$$

A precisão e a precisão intermediária foram determinadas através dos resultados obtidos pelo cálculo do coeficiente de variação ($\%CV$) e comparadas pelo Teste F. Neste teste determinou-se a variância (S^2) dos diferentes conjuntos de medidas e aplicou-se a equação (LEITE, 2002; INMETRO, 2003):

$$F = \frac{\text{Maior}_{\text{variância}}}{\text{Menor}_{\text{variância}}}$$

Em seguida comparou-se o valor numérico obtido com o valor tabelado correspondente ao número de graus de liberdade do teste (n-1) de acordo com a **Tabela**

05:

Tabela 05- Distribuição F – 5% de probabilidade

Graus de liberdade menor variância	Graus de liberdade maior variância									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9
2	18,5	19,0	19,2	19,2	19,3	19,3	19,4	19,4	19,4	19,4
3	10,1	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	3,79	4,15	4,10	4,06
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	4,21	3,73	3,68	3,64
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98

Finalmente observou-se:

- se o resultado da equação foi menor que o valor tabelado, pode-se dizer que não houve diferença significativa entre as duas precisões no nível de 5%.
- se o resultado foi maior que o valor tabelado, pode-se dizer que a diferença entre as duas precisões é significativa.

A análise estatística da exatidão foi feita com um modelo estatístico baseado em uma hipótese, submetendo os resultados das recuperações ao Teste *t* de *Student*, no intervalo de confiança de 95%. Primeiramente formulou-se a hipótese nula H_0 : recuperação = 100% e como hipótese alternativa H_1 : recuperação $\neq$ 100%. Verificou-se a hipótese de acordo com a seguinte equação:

$$t = (\bar{X} - 100\%) \times \frac{\sqrt{n}}{S}$$

Em que:

t = valor calculado

$\bar{X}$ = média das recuperações

S = desvio padrão obtido de n

n = número de replicatas (neste caso = 4)

Em seguida verificou-se: se $t_{\text{calculado}}$ for menor que t_{tabelado} aceita-se a hipótese de que não existem diferenças sistemáticas entre o valor médio do resultado analítico e o valor médio desejado (100%). Os cálculos foram feitos utilizando-se a **Tabela 06**:

Tabela 06- Valores tabelados da distribuição t de *Student*

GL	Nível de confiança	
	95%	99%
1	12,706	63,657
2	1,303	9,925
3	3,182	5,841
4	2,776	4,604
5	2,571	4,032
6	2,447	3,707
7	2,365	3,499
8	2,306	3,355
9	2,262	3,250
10	2,228	3,169
11	2,201	3,106
12	2,179	3,055
13	2,160	3,012
14	2,143	2,977
15	2,131	2,947
16	2,120	2,921
17	2,110	2,898
18	2,101	2,878
19	2,093	2,861
20	2,086	2,845
∞	1,960	2,580

* GL = graus de liberdade

3.8. Análise qualitativa - obtenção dos *fingerprints* das 12 espécies do gênero *Eucalyptus*

As amostras dos 12 óleos essenciais referentes às espécies utilizadas neste estudo foram preparadas de acordo com o item 3.5.6 e submetidas a análise cromatográfica por CG-DIC e também por CG-EM, com o objetivo de se identificarem os principais componentes de cada espécie e relacioná-los com sua concentração relativa, através dos espectros de massas obtidos por CG-EM e comparação com banco de dados da Biblioteca Wiley.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises físico-químicas das folhas desidratadas de *E. globulus*

Durante todo o processo de desenvolvimento e validação analítica foi utilizada a mesma amostra de *E. globulus* visando diminuir possíveis interferentes durante a execução dos protocolos. Além disso, todos os insumos analisados (óleo essencial, tintura e extratos fluidos) procederam desta mesma amostra, fornecendo também dados para a rastreabilidade do processo.

Na **Tabela 07** a seguir se resume o perfil físico-químico da amostra de *E. globulus* utilizada durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Tabela 07- Perfil físico-químico da amostra de folhas desidratadas de *E. globulus*.

Testes	Resultados
Perda por dessecação (% m/m)	6,27
Cinzas Totais (% m/m)	4,52
Cinzas Insolúveis (% m/m)	0,64
Teor de óleo essencial (% v/m)	1,25

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (1996) não são apresentados valores de referência para a perda por dessecação. No entanto, para uma planta desidratada, o valor encontrado de 6,27% m/m é considerado muito bom, visto que com esse valor consegue-se evitar degradação dos constituintes químicos por enzimas, além de se prevenir o desenvolvimento de fungos e bactérias. Geralmente o valor especificado em farmacopéias varia de 8,0 a 14,0% m/m (SIMÕES et al., 2003).

Para cinzas totais, o valor esperado para folhas desidratadas de eucalipto é de, no máximo, 5,0% m/m. O teor encontrado (4,52% m/m), reflete um baixo nível de impurezas inorgânicas e não voláteis. Além disso, a análise de cinzas insolúveis indica a baixíssima contaminação por resíduos de areia e terra.

Finalmente, determinou-se o teor de óleo essencial. De acordo com a metodologia farmacopéica preconizada, as folhas desidratadas de eucalipto devem apresentar, no mínimo, 0,8% de óleo essencial. A amostra analisada apresentou 1,25% v/m, verificando a conformidade com valores preconizados.

Estes testes físico-químicos, além de permitirem uma análise padronizada da qualidade da amostra, permitem monitorar as condições de produção, estocagem, secagem e armazenamento, visando minimizar diferenças sazonais e geográficas, além de se garantir a qualidade do produto final.

4.2. Identificação dos principais componentes presentes na espécie *E. globulus*

A identificação dos principais componentes presentes na espécie foi realizada utilizando-se equipamento de CG-EM. Para tanto, foi necessário determinar o índice de retenção dos principais picos presentes na amostra, para que se pudesse estabelecer uma comparação entre o perfil cromatográfico de uma análise em CG-DIC e outra em CG-EM.

A amostra utilizada foi o extrato hexânico das folhas, por apresentar maior complexidade. O marcador 1,8-cineol foi identificado primeiramente por meio da comparação com o padrão autêntico. Para os demais compostos a identificação foi realizada através da obtenção dos espectros de massas e comparação dos tempos de retenção com dados da Biblioteca Wiley, sendo que foi possível identificar com segurança os picos com similaridade maior que 95,0%. Desta forma na **Tabela 08** resumem-se os principais metabólitos identificados na amostra.

Tabela 08- Índices de retenção dos constituintes majoritários de *E. globulus*.

Constituintes	t _r 1(min)	t _r 2(min)	IR ₁	IR ₂	PM
α -pineno	3,163	3,95	931	929	136
β - pineno	3,913	5,058	976	975	136
<i>p</i> -cimeno	5,016	6,523	1024	1028	134
limoneno	5,136	6,661	1028	1035	136
1,8-cineol	5,225	6,760	1031	1036	154
α -terpineol	9,701	11,100	1206	1208	154
α -gurjuneno	13,610	14,833	1313	1312	204
calareno	13,930	15,192	1437	1438	204
aromadendreno	14,024	15,294	1444	1445	204
aloaromadendreno	14,326	15,600	1466	1467	204
epiglobulol	15,598	16,967	1567	1571	222
globulol	15,898	17,267	1591	1594	222

t_r1e IR1: tempo de retenção e índice de retenção dos compostos provenientes da análise por CG-DIC;
t_r2 e IR2: tempo de retenção e índice de retenção dos compostos provenientes da análise por CG-EM.
PM: peso molecular.

Além das substâncias descritas na **Tabela 08**, foi possível identificar, porém com baixa similaridade por estar contida em traços, uma outra substância, o α -felandreno. É interessante ressaltar que a presença deste composto nos óleos essenciais de eucaliptos é indesejável devido à sua atividade tóxica (GUENTHER, 1977).

Na **Figura 03**, a seguir, são apresentadas as estruturas químicas dos principais componentes encontrados no extrato hexânico das folhas.

Figura 03- Estruturas químicas dos principais metabólitos identificados no extrato hexânico de *E. globulus*.

Nas **Figuras 04 e 05**, a seguir, apresentam-se, respectivamente, os perfis cromatográficos dos padrões de hidrocarbonetos enriquecidos com 1,8-cineol e o perfil cromatográfico do extrato *n*-hexânico das folhas enriquecido com os padrões de hidrocarbonetos ambos obtidos por CG-DIC.

Figura 04- Cromatograma do padrão de 1,8-cineol enriquecido com a mistura de hidrocarbonetos por CG-DIC.

Figura 05- Cromatograma do extrato hexânico das folhas enriquecido com os padrões de hidrocarbonetos por CG-DIC.

4.3. Análise físico-química da tintura e extratos fluidos e escolha do melhor processo de obtenção do extrato

A partir das folhas de eucalipto desidratadas foi possível a obtenção de dois tipos de extratos vegetais: uma tintura (1:5) e dois extratos fluidos (1:1) obtidos por processos de percolação diferentes. Tanto a tintura como os extratos fluidos são produtos intermediários para a indústria na produção de fitoterápicos. No entanto, é importante atentar-se ao método de obtenção de insumos, especialmente para plantas que cujos componentes ativos são óleos essenciais. Para a tintura, o procedimento empregado permite a extração mais eficiente dos constituintes químicos, uma vez que a proporção de solvente é maior do que para o extrato fluido. No entanto, a teor de 1,8-cineol é menor neste tipo de extração, visto que, comparativamente ao extrato fluido, este é cinco vezes mais diluído.

Figura 06- Perfil cromatográfico da tintura de *E. globulus*.

O extrato fluido obtido pelo processo de percolação A - percolação exaustiva com concentração a quente das frações - mostrou-se, como previsto, ineficiente, pois, mesmo com o aquecimento brando, ocorre perda do monoterpeno 1,8-cineol, marcador e constituinte ativo. Já o extrato fluido obtido pelo processo C - percolação fracionada - apresentou melhores resultados com relação ao teor do marcador, visto que não há aquecimento das frações, conservando o monoterpeno de interesse. Logo, este último extrato foi escolhido para a preparação do xarope, visto que apresentou maior teor de 1,8-cineol.

Nas Figuras 07 e 08 a seguir mostram-se as diferenças nos perfis cromatográficos dos extratos fluidos obtidos por diferentes processos. Nota-se, no extrato obtido pelo processo A de percolação, a prevalência de compostos de maior peso molecular, como é o caso do epiglobulol (tR = 15,901) e aromadendreno (tR = 14,026) e a inexistência do monoterpeno α -pineno (tR = 3,169).

Figura 07- Extrato fluido 1:1 de *E. globulus* obtido pelo processo A de percolação.

Figura 08- Extrato fluido 1:1 de *E. globulus* obtido pelo processo C de percolação.

Em relação à análise físico-química dos extratos, verificam-se significativas diferenças principalmente entre a tintura e os extratos fluidos, principalmente no resíduo seco e no teor de 1,8-cineol. Já o extrato fluido obtido pelo processo C, apesar de apresentar menor resultado de resíduo seco (que reflete a eficiência do processo de extração) possui maior teor do princípio ativo. Na **Tabela 09** resumem-se os resultados obtidos.

Tabela 09- Resultados da análise físico-química da tintura e extratos fluidos de *E. globulus*.

Testes Físico-químicos	Tintura	Extrato fluido Processo A	Extrato fluido Processo C
Resíduo seco (% p/v)	3,82	26,4	11,5
Densidade (g/L)	0,909	0,982	0,914
Teor alcoólico (% v/v)	56,0	54,0	59,0
Teor de 1,8-cineol (mg/mL)	1,02	4,19	5,03

4.4. Obtenção do xarope de eucalipto

Além da utilização popular de *E. globulus* na forma de chás e tinturas, compêndios oficiais, tais como *The Complete German Commission E Monographs* (BLUMENTHAL, 1998) e o *The PDR for Herbal Medicines* (GRUENWALD et al., 2000) indicam a possível utilização do óleo de eucalipto com dosagem média diária de 0,45 mL. ALONSO (2004), sugere a incorporação de extrato fluido 1:1 em xarope, na proporção de 10,0%, alternativa que corrobora com a Resolução RE 089 da ANVISA, que preconiza uma dosagem de 14,0 a 42,5 mg de 1,8-cineol, via oral, por dia (BRASIL, 2004).

Sendo assim, para o desenvolvimento do fitoterápico xarope de eucalipto considerou-se uma dosagem teórica de 5,0 mg de 1,8-cineol por dose (copo dosador de 10,0 mL) administrada três vezes por dia, perfazendo uma dose mínima de 15,0 mg do princípio ativo por dia. Portanto, optou-se por incorporar ao xarope-base, o extrato fluido 1:1 de *E. globulus* na proporção de 10,0 % m/m, visando garantir a dosagem esperada e minimizando-se possíveis erros de preparo. A formulação apresentou-se límpida, viscosa, com sabor e aroma pronunciados, característicos de eucalipto.

4.5. Caracterização físico-química do xarope de eucalipto

A caracterização físico-química do xarope foi realizada avaliando-se parâmetros que aplicáveis a líquidos viscosos, sendo que os métodos utilizados são simples e estão referenciados em protocolos oficiais. Estas metodologias são úteis para melhor conhecimento do produto e, como foi verificado para o xarope, podem ser implementadas na rotina do controle de qualidade de sucessivos lotes de produção.

Na **Tabela 10**, a seguir, resumem-se os resultados obtidos.

Tabela 10- Resultados da análise físico-química do xarope de eucalipto.

Testes Físico-químicos	Resultados
Resíduo seco (% m/m)	72,1
Densidade (g/L)	1,322
Índice de refração	1,47
pH (solução a 1% p/v)	4,64
Acidez livre (% m/m)	0,026

4.6. Desenvolvimento do método analítico por CG-DIC

A cromatografia de fase gasosa empregando-se colunas capilares, padronização interna e detecção de ionização em chama (CG-DIC) para a análise de compostos voláteis tem sido empregada com sucesso na análise quantitativa de compostos presentes em óleos essenciais. No entanto, com esse tipo de detecção, a análise qualitativa dos compostos separados somente é possível com a comparação dos tempos de retenção de padrões de referência dos marcadores. Já com a utilização da mesma técnica, porém com a detecção por espectrometria de massas (CG-EM) consegue-se, além da separação dos compostos a identificação dos mesmos (SIMÕES, 2003).

Do ponto de vista quantitativo, como a maior parte deste trabalho foi desenvolvida em CG-DIC, foi necessária a utilização da padronização interna, visto que, desta forma, muitos erros experimentais são minimizados. Já para identificação dos principais compostos presentes nas amostras analisadas e nos óleos essenciais as espécies do gênero *Eucalyptus*, e posterior análise qualitativa, utilizou-se a CG-EM e cálculos dos índices de retenção dos compostos majoritários.

4.6.1. Escolha dos padrões

Para a escolha dos padrões interno e secundário foram realizadas injeções de diversos compostos avaliando-se os tempos de retenção dos mesmos, os quais não

deveriam coincidir com nenhum pico das amostras, a saber: o extrato hexânico das folhas, extratos e o óleo essencial. Além disso, o padrão interno deveria possuir excelente solubilidade em *n*-hexano, já que este é o melhor solvente para a extração do 1,8-cineol. Finalmente, foram escolhidos os dois padrões necessários, sendo que o TMB foi o padrão interno de escolha, bem como o piperonal o padrão secundário.

Na **Figura 09**, a seguir, apresenta-se o perfil cromatográfico dos três padrões de trabalho e seus tempos de retenção.

Figura 09- Perfil cromatográfico dos três padrões utilizados: 1,8-cineol, TMB e piperonal por CG-DIC.

4.6.2. Comparação dos perfis cromatográficos do óleo essencial, das folhas e do extrato fluido de *E. globulus*

Com o objetivo de se verificar a aplicabilidade do método para a análise das diferentes amostras de *E. globulus* (óleo essencial, extrato hexânico das folhas e extrato fluido) injetaram-se as amostras preparadas de acordo com o item 3.5.6. Os perfis cromatográficos podem ser analisados nas **Figuras 10, 11 e 12**, a seguir. É interessante observar que tanto no extrato hexânico das folhas, quanto no extrato fluido e no óleo

essencial, o perfil é bastante semelhante, sendo que o componente majoritário é o 1,8-cineol. Observam-se, também, mais outros três componentes em quantidades apreciáveis, os quais são, na ordem de eluição, o α -pineno, aromadendreno e globulol.

Figura 10- Perfil cromatográfico do óleo essencial de *E. globulus*.

Figura 11- Perfil cromatográfico do extrato hexânico das folhas de *E. globulus*

Figura 12- Perfil cromatográfico do extrato fluido 1:1 de *E. globulus* obtido pelo processo C de percolação.

4.7. Escolha do melhor método de extração das folhas

De acordo com a literatura, (SIMÕES et al., 2003), um dos melhores solventes para a extração de óleos essenciais é o *n*-hexano. Em laboratório, essa afirmação foi comprovada após constatação de que extratos das folhas obtidos com *n*-hexano fornecem maiores teores de 1,8-cineol, quando comparados a extratos obtidos com etanol e acetato de etila.

Sendo assim, com o solvente previamente definido, testes foram realizados para se determinar qual a melhor temperatura de extração. Verificou-se que a temperatura ideal para se trabalhar com este solvente era 40 °C, visto que a extração se procede com maior eficiência. Temperaturas maiores que 40 °C não são desejáveis para se trabalhar com *n*-hexano, já que ocorre, neste caso, ebulição do solvente. Após a definição do solvente e da temperatura selecionou-se o melhor tempo de extração, avaliando-se a razão da área do 1,8-cineol pela área do TMB de acordo com o tempo. Verificou-se que, exatamente após duas horas de extração, em agitador mecânico a 150 rpm, não houve mudança significativa na razão em estudo. Na **Tabela 11** e na **Figura**

13, a seguir, é apresentado o comportamento do processo de extração de acordo com o tempo.

Tabela 11- Dados obtidos para a determinação do melhor método de extração das folhas

Tempo (h)	Razão área 1,8-cineol/TMB			Média	S	% CV
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3			
0,5	0,719	0,721	0,676	0,705	0,025	3,60
1,0	0,765	0,750	0,734	0,750	0,016	2,07
2,0	0,788	0,841	0,782	0,804	0,032	4,04
3,0	0,797	0,818	0,803	0,806	0,011	1,34

Figura 13- Gráfico representativo da melhor condição de extração das folhas

4.8. Escolha do melhor método de extração do xarope

O xarope de eucalipto desenvolvido para este trabalho foi constituído essencialmente de açúcar líquido invertido, mel, extrato fluido de eucalipto e conservante. Devido à alta concentração de açúcares em solução aquosa, a análise deste xarope por cromatografia gasosa exigiu um rigoroso preparo da amostra, para que não ocorresse sua caramelização no injetor e para que o marcador 1,8-cineol pudesse ser quantificado com segurança. Para tanto, a escolha do método de extração do 1,8-cineol da formulação foi feita considerando-se a polaridade do açúcar líquido invertido e sua imiscibilidade em solventes orgânicos, diferentemente da alta afinidade existente entre o monoterpene e solventes desta natureza. Sendo assim, empregou-se o método de partição líquido-líquido em sistema fechado, com a amostra diluída em água e com a utilização do *n*-hexano como solvente extrator.

No desenvolvimento do processo de extração do marcador do xarope, definiram-se a temperatura de extração, fixada em 42°C, o tempo de extração e a frequência de agitação, os quais não foram fatores limitantes, visto que o marcador já se encontrava em solução na própria formulação.

4.9. Validação do método para a quantificação de 1,8-cineol em folhas desidratadas, extrato fluido, óleo essencial de *E. globulus* e xarope de eucalipto.

Um dos objetivos principais deste trabalho foi o desenvolvimento de um único método cromatográfico para a quantificação do marcador 1,8-cineol nas folhas desidratadas, extrato fluido e óleo essencial de *E. globulus*, bem como no xarope de eucalipto. Uma vez estabelecidas as condições cromatográficas e o preparo das amostras, a etapa de validação foi planejada em conjunto para todos os produtos, como pode ser observado na **Tabela 12** a seguir.

Tabela 12- Planejamento da etapa de validação do método analítico para a quantificação de 1,8-cineol em folhas desidratadas de *E. globulus*, extrato fluido, óleo essencial e xarope de eucalipto.

Parâmetro	Padrão de 1,8-cineol	Extrato fluido	Óleo essencial	Planta desidratada	Xarope de eucalipto
Especificidade	x	x	x	x	x
Linearidade	x				
Limite de Detecção	x				
Limite de quantificação	x				
Precisão (intra)				x	x
Precisão (inter)				x	x
Exatidão (recuperação)				x	x
Robustez				x	x

A especificidade foi determinada para o extrato fluido, óleo essencial, folhas desidratadas e xarope de eucalipto separadamente. A linearidade, o limite de quantificação e o limite de detecção foram determinados através do tratamento de dados da curva analítica preparada com a solução padrão de 1,8-cineol. A precisão (intra e inter ensaio), a exatidão, os estudos de recuperação e a robustez foram determinados para as folhas desidratadas e para o xarope de eucalipto, uma vez que somente estes requereram a extração do marcador 1,8-cineol da matriz da amostra antes da injeção no cromatógrafo. Esta etapa é determinante para uma eficiente quantificação pelo método desenvolvido.

4.9.1. Seletividade

A seletividade foi determinada através da constatação visual da separação do pico do 1,8-cineol nos cromatogramas, cálculo da resolução do pico de interesse e análise por CG-EM.

Primeiramente, com a injeção de uma solução 100 µg/mL de um padrão autêntico de 1,8-cineol verificou-se o tempo de retenção deste no método desenvolvido, que foi de 5,224 minutos. Em seguida, injetando-se o extrato hexânico das folhas, o extrato fluido e o óleo essencial de *E. globulus*, foi possível verificar a presença do marcador e sua separação cromatográfica em todas as amostras, bem como calcular a resolução entre o pico do 1,8-cineol e do limoneno. Os valores encontrados foram, respectivamente, de 2,25, 2,29 e 2,22.

De acordo com a Farmacopéia Brasileira IV (1988), o ideal é que a resolução seja maior que um para a cromatografia gasosa. Os valores encontrados, portanto, estão de acordo com o preconizado. Apesar dos picos do 1,8-cineol e do limoneno situarem-se bastante próximos, foi possível obter a separação desejada, uma vez que a resolução calculada para as amostras foi a melhor que se pode conseguir durante todo o desenvolvimento analítico, mesmo em testes com a coluna HP-1 (metil-siloxano). Verifica-se que o método foi capaz de selecionar o composto de interesse, fato confirmado através das análises por CG-EM, que comprovam a pureza do pico correspondente ao 1,8-cineol.

Uma vez verificada a especificidade do método para a quantificação do 1,8-cineol nas folhas, extrato e óleo essencial de eucalipto, a determinação da especificidade para a análise do xarope de eucalipto foi feita verificando-se a eficiência da extração do 1,8-cineol da matriz do xarope. Inicialmente, preparou-se uma solução placebo e extraiu-se utilizando o mesmo procedimento utilizado para o xarope contendo o extrato de eucalipto. Foi possível verificar que o procedimento de extração permitiu um *clean up* eficiente, visto que nenhum pico apareceu no cromatograma além do pico do padrão interno, como pode ser observado na **Figura 14** a seguir:

Figura 14- Perfil cromatográfico da solução placebo contendo somente o pico do padrão interno (TMB) por CG-DIC.

Em seguida, verificou-se a adequação do método na separação dos componentes provenientes do extrato fluido de eucalipto contido no xarope, como era esperado, como pode ser observado na **figura 15** a seguir:

Figura 15- Perfil cromatográfico do xarope de eucalipto após procedimento de *clean up*.

4.9.2. Linearidade

A obtenção das curvas analíticas a partir de diluições seriadas das soluções-mãe permitiu a obtenção de coeficientes de correlação linear bastante satisfatórios para os três padrões utilizados neste estudo (1,8-cineol, $R = 0,9986$; TMB, $R = 0,9989$; piperonal, $R = 0,9976$). A seguir são apresentados os dados obtidos para cada curva de analítica, correspondentes aos três padrões utilizados neste estudo.

Tabela 13- Resultados da curva analítica do 1,8-cineol (n=3).

Concentração de 1,8-cineol ($\mu\text{g/mL}$)	Área média	<i>S</i>	% CV
40,00	35,765	1,383	3,87
50,00	48,362	6,794	14,05
80,00	102,671	2,512	2,45
100,00	121,596	1,829	1,50
160,00	193,179	7,551	3,91
200,00	236,419	2,505	1,06
320,00	365,566	4,692	1,28
400,00	449,979	6,105	1,36
640,00	741,482	7,178	0,97

Figura 16- Curva analítica do 1,8-cineol apresentando a regressão linear.

Tabela 14- Resultados da curva analítica do TMB (n=3).

Concentração de TMB (µg/mL)	Área média	S	% CV
20,00	25,321	2,307	9,11
25,00	31,218	4,163	13,33
40,00	64,868	1,559	2,40
50,00	75,919	2,522	3,32
80,00	122,485	2,583	2,11
100,00	153,419	7,279	4,74
160,00	231,305	2,637	1,14
200,00	298,288	7,350	2,46
320,00	486,632	7,420	1,52

Figura 17- Curva analítica do TMB apresentando a regressão linear.**Tabela 15 –** Resultados da curva analítica do piperonal (n=3).

Concentração de piperonal (µg/mL)	Área média	S	% CV
40,00	26,498	1,195	4,51
50,00	34,055	2,225	6,53
80,00	66,912	1,805	2,70
100,00	82,274	4,742	5,76
160,00	120,918	5,712	4,72
200,00	149,541	6,804	4,55
320,00	225,156	4,049	1,80
400,00	282,353	11,180	3,96
640,00	474,817	8,254	1,74

Figura 18- Curva analítica do piperonal apresentando a regressão linear.

4.9.3. Obtenção das equações para quantificação

Após a obtenção das curvas de calibração para os três padrões foi possível desenvolver as fórmulas para quantificação de 1,8-cineol com o emprego do padrão interno. Desta forma, para efeito de cálculos, trabalha-se com a razão das áreas 1,8-cineol/tmb. Sendo assim temos que:

$$R = \frac{\text{Área 1,8-cineol}}{\text{Área TMB}} \quad x_c = \frac{R \times (1,5158x_t - 2,0847) - 0,2522}{1,1521}$$

Para a quantificação do padrão interno, TMB, deduziu-se a fórmula de acordo com a curva de calibração do piperonal. Sendo assim temos que:

$$R = \frac{\text{Área TMB}}{\text{Área piperonal}} \quad x_c = \frac{[R \times (0,7265x_p + 1,8652) + 2,0847]}{1,5158}$$

4.9.4. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

A determinação dos limites de detecção e quantificação foi baseada em parâmetros de uma curva analítica elaborada próximo ao limite de detecção. Após ser determinada a menor concentração do analito em que fosse possível a integração da

área do pico, realizou-se uma série de três diluições próximas a esse valor (em triplicata) e, com os dados obtidos da equação da reta, calcularam-se o LD e o LQ.

Para o limite de detecção o valor encontrado foi de 4,79 µg/mL, enquanto que para o limite de quantificação o valor obtido foi de 14,51 µg/mL.

Tabela 16- Resultados das curvas analíticas elaboradas para cálculo do LD e LQ

Concentração de 1,8-cineol (µg/mL)	Área			Média
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	
6,25	10,253	11,698	13,955	11,969
12,5	19,055	21,152	24,705	21,637
25,0	39,794	36,735	45,563	40,697

Tabela 17- Análise estatística básica para a determinação do LD e LQ

Curva	Coeficiente linear	Coeficiente angular
1	-0,117	1,5875
2	3,907	1,3226
3	3,526	1,6833
Média	2,439	1,5311
S	2,221	1,5875

$$LD = 3,3 \times (2,221/1,5311) = 4,79 \text{ µg/mL}$$

$$LQ = 10 \times (2,221/1,5311) = 14,51 \text{ µg/mL}$$

É importante salientar que este método fornece o resultado mais confiável para a dedução do LD e LQ, já que estes são estimativas do tamanho da amostra que pode ser detectada e quantificada com precisão (RIBANI et al., 2004).

4.9.5. Recuperação e Exatidão

4.9.5.1. Folhas desidratadas de *E. globulus*

O procedimento para a determinação da exatidão do método foi realizado através dos estudos de recuperação do analito. Uma amostra de *Eucalyptus* previamente esgotada em aparelho de Soxhlet foi fortificada com concentrações diferentes de 1,8-cineol e, em seguida, submetida ao procedimento de extração e quantificação, o que permite avaliar o quanto do marcador é possível recuperar durante o procedimento analítico subsidiando os cálculos para a determinação da exatidão do método.

Analisando os resultados obtidos (**Tabela 18**) observa-se que o método permitiu uma ótima recuperação do marcador, visto que a porcentagem de recuperação média foi de 99,8%, com coeficiente de variação de 1,38%. Este resultado é reflexo do criterioso procedimento de extração, ressaltando a escolha do solvente extrator, tempo e temperatura de extração.

Tabela 18- Determinação da recuperação em três concentrações nominais (85,03, 162,34 e 297,62 µg/mL) de 1,8-cineol para as folhas. ($t_{95\%(n-1)} = 3,182$)

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração obtida (µg/mL)	Recuperação (%)	Análise estatística			
			Média	S	% CV	t 95%
85,03 (baixa)	84,356	99,21	99,50	1,249	1,26	0,801
	83,373	98,05				
	84,733	99,65				
	85,943	101,07				
162,34 (média)	166,432	102,52	101,31	1,590	1,57	1,648
	161,916	99,74				
	162,585	100,15				
	166,933	102,83				
297,62 (alta)	293,924	98,76	98,61	0,637	0,65	4,364
	295,607	99,32				
	291,017	97,78				
	293,388	98,58				

Observa-se que o valor de $t_{\text{calculado}}$ foi menor que o valor de t_{tabelado} nos níveis de ensaio baixo e médio, o que permite concluir que o método apresentou exatidão no intervalo de confiança de 95% somente para estes níveis. Para concentrações mais altas de ensaio, a exatidão fica comprometida.

Uma vez que, o método analítico foi desenvolvido com padronização interna, verificou-se a necessidade de se quantificar a porcentagem de recuperação do padrão interno TMB, após o procedimento de preparo da amostra. Por este motivo foi adicionada à amostra, antes da injeção no cromatógrafo, uma solução de piperonal em quantidade conhecida, para que se pudesse avaliar a porcentagem de recuperação do TMB. Na **Tabela 19** resumem-se os resultados.

Tabela 19- Determinação da recuperação do TMB nas concentrações: 68,03, 64,93 e 59,52 $\mu\text{g/mL}$.

Concentração real de TMB ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Análise estatística		
			Média	S	% CV
68,03	71,804	105,55	104,33	1,471	1,41
	71,235	104,71			
	69,521	102,19			
	71,344	104,87			
	67,043	103,25			
64,93	66,233	102,01	103,00	0,720	0,70
	66,887	103,01			
	67,339	103,71			
	62,594	105,16			
59,52	62,586	105,15	103,70	1,683	1,62
	60,802	102,15			
	60,911	102,34			

Os resultados encontrados permitem observar que a porcentagem de recuperação média do TMB foi de 103,7%, com coeficiente de variação de 0,64%, o que permite certificar que o padrão interno TMB não interfere negativamente nos resultados encontrados para o doseamento do 1,8-cineol nas folhas de *E. globulus*.

4.9.5.2. Determinação da exatidão para o xarope de eucalipto

Da mesma forma que para as folhas desidratadas de *E. globulus*, a exatidão do método de extração do xarope de eucalipto foi determinada através dos experimentos de recuperação com fortificação da amostra. O procedimento realizado consistiu em adicionar quantidades conhecidas de uma solução de 1,8-cineol à base do xarope, em três níveis: baixo, médio e alto. Na **Tabela 20**, a seguir evidenciam-se os resultados obtidos.

Tabela 20- Determinação da exatidão em três concentrações nominais (0,25, 0,50 e 1,00 mg/g) de 1,8-cineol no xarope. ($t_{95\%(n-1)} = 3,182$)

Concentração teórica de 1,8-cineol (mg/g)	Concentração obtida (mg/g)	Recuperação (%)	Análise estatística			
			Média	S	% CV	$t_{95\%}$
0,25 (baixa)	0,24	95,6	97,88	2,264	2,31	1,872
	0,25	100,02				
	0,24	95,51				
	0,24	98,12				
0,50 (média)	0,50	100,15	101,44	0,943	0,93	3,054
	0,51	102,4				
	0,51	101,72				
	0,51	101,49				
1,00 (alta)	1,03	102,90	102,20	0,663	0,65	6,636
	1,01	101,3				
	1,02	102,3				
	1,02	102,30				

A análise dos resultados obtidos permitiu concluir que o processo extrativo foi realizado com sucesso, visto que as porcentagens de recuperação do marcador ficaram entre 97,9 e 102,2%, com média em 100,5%. Observa-se que o valor de $t_{\text{calculado}}$ foi menor que o valor de t_{tabelado} nos níveis de ensaio baixo e médio, o que permite concluir que o método apresentou exatidão no intervalo de confiança de 95% somente para estes níveis. Sendo assim, para o xarope, o ensaio em concentrações mais altas, a exatidão fica comprometida, da mesma forma que para as folhas de *E. globulus*.

4.9.6. Precisão

4.9.6.1. Repetitividade para as folhas desidratadas

Para a determinação da precisão, optou-se por trabalhar com as amostras preparadas em sextuplicata à concentração do teste, visto que o objetivo principal foi avaliar a repetitividade do processo extrativo. Observa-se que o método apresenta ótima precisão, intra e inter ensaio, visto que o coeficiente de variação foi de 1,86% e o valor máximo preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2003) é de 5,0%. Nas **Tabelas 21 e 22** a seguir resumem-se os resultados obtidos.

Tabela 21- Resultados obtidos para determinação da precisão do método de quantificação do 1,8-cineol após extração do marcador das folhas desidratadas de *E. globulus* (n=6).

% intervalo	Amostras	Razão: área 1,8-cineol/TMB		Média	Teor 1,8-cineol (mg/g)
		Injeção 1	Injeção 2		
100%	1	0,784	0,778	0,781	4,04
	2	0,809	0,792	0,801	4,15
	3	0,748	0,778	0,763	3,95
	4	0,767	0,778	0,773	4,00
	5	0,776	0,784	0,780	4,04
	6	0,768	0,757	0,763	3,95

Tabela 22- Análise estatística dos dados obtidos para a precisão do método de quantificação do 1,8-cineol após extração das folhas desidratadas de *Eucalyptus* (n=6).

intervalo	Teor médio de 1,8-cineol (mg/g)	<i>S</i>	% CV	<i>S</i> ²
100%	4,02	0,075	1,86	5,62x10 ⁻³

4.9.6.2. Precisão intermediária para as folhas desidratadas

Para a avaliação da precisão intermediária do método, o mesmo analista utilizando a mesma instrumentação repetiu o experimento anterior, em dia diferente. Os resultados obtidos estão apresentados abaixo. Observa-se que o método apresentou ótima precisão inter-ensaio, com coeficiente de variação de 1,47%. Na **Tabela 23** evidenciam-se os resultados obtidos.

Tabela 23- Resultados obtidos para determinação da precisão intermediária do método para o 1,8-cineol (extração do marcador das folhas desidratadas de *E. globulus*) (n=6).

% intervalo	Amostras	Razão: área 1,8-cineol/TMB		Média	Teor 1,8-cineol (mg/g)
		Injeção 1	Injeção 2		
100%	1	0,776	0,783	0,780	4,04
	2	0,793	0,778	0,786	4,07
	3	0,774	0,757	0,766	3,96
	4	0,783	0,783	0,783	4,06
	5	0,769	0,765	0,767	3,97
	6	0,756	0,762	0,759	3,93

Tabela 24- Análise estatística dos dados obtidos para a precisão intermediária do método de quantificação de 1,8-cineol após extração das folhas desidratadas de *Eucalyptus* (n=6).

intervalo	Teor médio de 1,8-cineol (mg/g)	<i>S</i>	% CV	<i>S</i> ²
100%	4,01	0,059	1,47	3,48x10 ⁻³

Comparando-se os resultados obtidos para a precisão em dois dias diferentes, verifica-se que o quociente das variâncias obtidas nos dois testes ($F=1,61$) é menor que o valor tabelado 5,05 ($n=6$). Sendo assim verifica-se que não há diferença significativa entre os resultados das duas precisões, no nível de 5%.

4.9.6.3. Repetitividade para o xarope de eucalipto

A precisão do processo extrativo do marcador 1,8-cineol no xarope de eucalipto foi determinada através da análise dos dados obtidos da análise de seis amostras. A Precisão foi medida em condições repetitivas (mesmo analista, mesmo dia e mesmo instrumento). Observa-se que o método apresenta precisão visto que o coeficiente de variação entre as análises situou-se em 0,92%, ou seja, um valor menor que o máximo preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2003) que é de 5,0%.

Tabela 25- Resultados obtidos para determinação da precisão do método de quantificação de 1,8-cineol após extração do marcador 1,8-cineol do xarope ($n=6$).

% intervalo	Amostras	Razão: área 1,8-cineol/TMB		Média	Teor 1,8-cineol (mg/g)
		Injeção 1	Injeção 2		
100%	1	0,788	0,787	0,788	0,497
	2	0,817	0,798	0,808	0,511
	3	0,807	0,801	0,804	0,506
	4	0,791	0,787	0,789	0,507
	5	0,793	0,793	0,793	0,505
	6	0,807	0,798	0,803	0,507

Tabela 26- Análise estatística dos dados obtidos para a precisão do método de quantificação de 1,8-cineol após extração do marcador 1,8-cineol do xarope ($n=6$)

intervalo	Teor médio de 1,8-cineol (mg/g)	S	% CV	S^2
100%	0,506	0,005	0,92	$2,5 \times 10^{-5}$

4.9.6.4. Precisão intermediária para o xarope de eucalipto

Para a avaliação da precisão intermediária do método para o xarope, o mesmo analista utilizando a mesma instrumentação repetiu o experimento em dia diferente. Os resultados obtidos estão apresentados abaixo. Observa-se que o método apresentou ótima precisão inter-ensaio, com coeficiente de variação de 1,29%. Na **Tabela 27** evidenciam-se os resultados obtidos.

Tabela 27- Resultados obtidos para determinação da precisão intermediária do método de quantificação de 1,8-cineol após extração do marcador 1,8-cineol do xarope (n=6)

% intervalo	Amostras	Razão: área 1,8-cineol/TMB		Média	Teor 1,8-cineol (mg/g)
		Injeção 1	Injeção 2		
100%	1	0,806	0,804	0,805	0,509
	2	0,798	0,799	0,799	0,505
	3	0,794	0,785	0,790	0,496
	4	0,809	0,805	0,807	0,511
	5	0,794	0,799	0,797	0,507
	6	0,790	0,786	0,788	0,496

Tabela 28- Análise estatística dos dados obtidos para a precisão intermediária do método de quantificação de 1,8-cineol após extração do marcador 1,8-cineol do xarope (n=6)

intervalo	Teor médio de 1,8-cineol (mg/g)	S	% CV	S ²
100%	0,504	0,007	1,29	4,9x10 ⁻⁵

Comparando-se os resultados obtidos para a precisão para o xarope em dois dias diferentes, verifica-se que o quociente das variâncias obtidas nos dois testes, (F=1,96) é menor que o valor tabelado 5,05 (n=6). Sendo assim, verifica-se que não há diferença significativa entre os resultados das duas precisões, no nível de 5%.

4.9.7. Robustez

4.9.7.1. Determinação da robustez para as folhas desidratadas

A determinação da robustez foi realizada através do teste de *Yuden*, que permite avaliar e ordenar a influência de cada uma das variações no resultado final (INMETRO, 2003). Sendo assim, na **Tabela 29** resumem-se os resultados obtidos.

Tabela 29- Valores numéricos obtidos para cada parâmetro alterado na determinação da robustez para as folhas.

Alteração	Descrição	Valor numérico
A	Tempo de agitação	0,32
B	Temperatura de extração	0,30
C	Frequência de agitação	0,12
D	Vazão do gás	0,02
E	Temperatura de injeção	0,08
F	Temperatura de detecção	0,32
G	Tamanho da amostra	0,10

Neste teste, quanto menor o valor numérico obtido, menor será a influência do fator modificado, como pode ser observado na **Figura 19**.

Figura 19- Influência de cada fator modificado no teste de robustez para as folhas de *E. globulus*.

Verifica-se que a vazão do gás e a temperatura de injeção pouco influenciam nos resultados. Seguem o tamanho da amostra e frequência de agitação. O efeito mais drástico é observado quando se diminuem a temperatura e o tempo de extração e a temperatura de detecção.

Em seguida, na **Tabela 30** observam-se os teores de 1,8-cineol, quando aplicados cada conjunto de modificações proposto para este teste de robustez.

Tabela 30- Teor de 1,8-cineol obtido em cada conjunto de modificações realizadas no teste de robustez para as folhas.

Conjunto de modificações deliberadas	Teor de 1,8-cineol nas folhas (mg/g)
método sem modificações	4,08
frequência de agitação, temperaturas de detecção e injeção e tamanho da amostra	3,93
temperatura de extração, vazão do gás, temperatura de detecção e tamanho da amostra	3,31
temperatura de extração, frequência de agitação, vazão do gás e temperatura de injeção	3,19
tempo de agitação, vazão do gás, temperatura de injeção e tamanho da amostra	3,41
tempo de agitação, frequência de agitação, vazão do gás e temperatura de detecção	4,06
tempo de agitação, temperatura de extração, temperatura de injeção e detecção	3,79
tempo de agitação, temperatura de extração, frequência de agitação e tamanho da amostra	3,54

Finalmente, observando-se os teores de 1,8-cineol obtidos em cada conjunto de modificações, nota-se que os resultados são condizentes e permitem inferir que é imprescindível manter a temperatura e o tempo de extração a 40 °C, bem como a temperatura do detector. Cabe sugerir, ainda, manter o tamanho da amostra, evitando, desta forma, possíveis erros relacionados à baixa concentração do marcador.

4.9.7.2. Determinação da robustez para o xarope de eucalipto

A determinação da robustez para o xarope de eucalipto também foi realizada através do teste de *Yuden*, no entanto com seis modificações. Na **Tabela 31** resumem-se os resultados obtidos.

Tabela 31- Valores numéricos obtidos para cada parâmetro alterado na determinação da robustez para o xarope.

Alteração	Descrição	Valor numérico
A	Tamanho da amostra	0,031
B	Quantidade de solvente	0,047
C	Temperatura de extração	0,030
D	Frequência de agitação	0,021
E	Tempo de agitação	0,049
F	Quantidade de água	0,049

Como pode ser observado na **Figura 20** verifica-se que as mudanças propostas no procedimento influenciaram consideravelmente os resultados. A menor influência pode ser verificada quando de alteram a frequência de agitação, a temperatura de extração, e o tamanho da amostra (valores mais próximos de zero).

Figura 20- Influência de cada fator modificado no teste de robustez para o xarope de eucalipto.

As modificações que mais influenciam no resultado, e por isso devem ser cuidadosamente prevenidas são: a quantidade de solvente extrator, o tempo de agitação e a quantidade de água no meio de extração, como pode ser observado na

Tabela 32.

Tabela 32- Teor de 1,8-cineol obtido em cada conjunto de modificações realizadas na determinação da robustez para o xarope.

Conjunto de modificações deliberadas	Teor de 1,8-cineol no xarope (mg/g)
sem modificações	0,508
temperatura de extração, tempo de agitação e ausência de água	0,146
quantidade de solvente, frequência de agitação e ausência de água	0,251
quantidade de solvente, temperatura de extração, frequência e tempo de agitação	0,455
tamanho da amostra, frequência de agitação e tempo de agitação	0,235
tamanho da amostra, temperatura extração, frequência de agitação e ausência de água	0,440
tamanho da amostra, quantidade de solvente, tempo de agitação e ausência de água	0,488
tamanho da amostra, quantidade de solvente, temperatura de extração	0,321

De fato, o pior resultado em miligramas de 1,8-cineol por grama de xarope foi obtido quando se modificaram a temperatura de extração, o tempo de agitação e a quantidade de água. O segundo pior resultado foi obtido quando se modificaram o tamanho da amostra, frequência de agitação e o tempo de agitação. Verifica-se, portanto, que dependendo do conjunto de modificações realizadas, o resultado da quantificação é seriamente comprometido, visto que o analito de interesse e o solvente utilizado são voláteis. Por esse motivo é importante que as condições analíticas

estabelecidas, tais como temperatura e tempo de extração, sejam monitoradas e respeitadas, para que ocorra com sucesso o doseamento desejado.

4.10. Identificação dos principais constituintes das 12 espécies do gênero *Eucalyptus*

Os óleos essenciais obtidos das 12 espécies do gênero *Eucalyptus* foram submetidos à análise de CG-EM para que se pudessem identificar os principais constituintes. A seguir são apresentadas as tabelas correspondentes a cada espécie, relacionando as substâncias identificadas com sua concentração relativa, em porcentagem de área. Além disso, cada tabela compara os tempos (tr) de retenção (em minutos) e os índices de retenção (IR) obtidos nas técnicas de CG-DIC (1) e CG-EM (2), fornecendo também a porcentagem de similaridade e o número CAS de cada composto.

Tabela 33- Principais constituintes presentes no óleo essencial de *E. grandis*.

<i>E. grandis</i>								
Constituintes	tr1	tr2	IR 1	IR 2	PM	SI (%)	%Área	CAS
α -tujeno	3,047	4,992	929	929	136	95	1,59	2.867-5-2
α -felandreno	4,501	7,217	1008	1008	136	93	4,22	99-83-2
<i>o</i> -cimeno	5,027	7,811	1029	1027	136	97	33,89	527-84-4
limoneno	5,142	7,961	1034	1032	136	89	1,93	138-86-3
4-terpineol	9,392	13,799	1153	1146	154	93	5,93	562-74-3
criptona	9,606	14,046	1157	1149	138	93	14,30	500-2-7
cuminal	10,755	16,402	1180	1175	148	88	3,27	122-3-2
espatulenol	15,823	30,144	1585	1572	220	93	9,81	77171-55-2
óxido de cariofileno	15,897	30,326	1591	1577	220	95	9,73	1139-30-6

Tabela 34- Principais constituintes presentes no óleo essencial de *E. saligna*.

<i>E. saligna</i>								
Constituintes	tr1	tr2	IR 1	IR 2	PM	SI (%)	% Área	CAS
<i>p</i> -cimeno	5,022	7,802	1029	1027	136	92	9,21	99-87-6
γ -terpineno	6,117	8,96	1067	1061	136	95	21,37	99-85-4
4-terpineol	9,39	13,791	1153	1146	154	84	3,26	562-74-3

Tabela 35- Principais constituintes presentes no óleo essencial de *E. elba*.

<i>E. elba</i>								
Constituintes	tr1	tr2	IR 1	IR 2	PM	SI (%)	%Área	CAS
1,8-cineol	5,253	8,065	1038	1035	154	90	3,38	470-82-6
α -terpineol	9,711	14,417	1159	1153	154	97	33,70	10482-56-1
trans-cariofileno	13,754	23,834	1428	1415	204	86	3,80	87-44-5
biciclogermacreno	14,803	26,946	1501	1491	204	86	5,28	100762-46-7
globulol	15,902	30,484	1592	1580	222	92	10,40	489-41-8
veridiflorol	16,002	30,815	1600	1589	222	89	4,59	552-2-3
<i>d</i> -selineno	16,116	32,274	1612	1627	204	81	4,51	28624-28-4
eudesmol	16,449	33,123	1648	1650	222	91	21,27	51317-8-9

Tabela 36- Principais constituintes presentes no óleo essencial de *E. botryoides*.

<i>E. botryoides</i>								
Constituintes	tr1	tr2	IR 1	IR 2	PM	SI (%)	% Área	CAS
α -pineno	3,184	5,192	938	937	136	97	7,72	80-56-8
α -felandreno	4,497	7,215	1008	1008	136	97	58,02	99-83-2
<i>o</i> -cimeno	5,022	7,807	1029	1027	136	96	13,20	527-84-4
limoneno	5,154	7,96	1034	1032	136	90	1,97	138-86-3
1,8-cineol	5,242	8,068	1037	1035	154	95	4,81	470-82-6
γ -terpineno	6,112	8,966	1067	1061	136	93	1,81	99-85-4
4-terpineol	9,389	13,795	1153	1143	154	89	2,28	562-74-3
nerolidol	15,602	29,674	1568	1560	222	91	5,01	142-50-7

Tabela 37- Principais constituintes presentes no óleo essencial de *E. tereticornis*.

<i>E. tereticornis</i>								
Constituintes	tr1	tr2	IR 1	IR 2	PM	SI (%)	% Área	CAS
α -tujeno	3,05	4,992	929	929	136	94	1,10	2867-5-2
α -felandreno	4,503	7,212	1008	1008	136	96	15,77	99-83-2
<i>o</i> -cimeno	5,028	7,805	1029	1027	136	95	9,90	527-84-4
β -felandreno	5,17	8,019	1035	1034	136	96	14,98	555-10-2
4-terpineol	9,395	13,794	1153	1146	154	87	1,65	562-74-3
trans-cariofileno	13,756	23,833	1425	1415	204	88	2,90	87-44-5
biciclogermacreno	14,808	26,945	1502	1491	204	92	10,03	100762-46-7
espatulenol	15,825	30,139	1586	1572	220	94	12,53	77171-55-2
globulol	15,905	30,483	1592	1580	222	92	12,38	489-41-8
veridiflorol	16,004	30,816	1600	1589	222	90	8,63	552-2-3

Tabela 38- Principais constituintes presentes no óleo essencial de *E. resinifera*.

<i>E. resinifera</i>								
Constituintes	tr1	tr2	IR 1	IR 2	PM	SI (%)	% Área	CAS
α -pineno	3,175	5,149	902	935	136	98	12,41	80-56-8
α -felandreno	4,496	7,214	1008	1007	136	95	0,94	99-83-2
<i>p</i> -cimeno	5,021	7,809	1029	1027	136	92	3,09	99-87-6
limoneno	5,142	7,962	1034	1032	136	95	4,40	5989-54-8
1,8-cineol	5,234	8,072	1037	1035	154	96	62,18	470-82-6
γ -terpineno	6,111	8,968	1067	1061	136	96	9,65	99-85-4
4-terpineol	7,39	13,8	1104	1146	154	87	1,05	562-74-3
α -terpineol	9,708	14,419	1159	1153	154	94	5,49	10482-56-1

Tabela 39- Principais constituintes presentes no óleo essencial de *E. robusta*.

<i>E. robusta</i>								
Constituintes	tr1	tr2	IR 1	IR 2	PM	SI (%)	% Área	CAS
α -pineno	3,175	5,188	937	959	136	98	48,18	80-56-8
β -pineno	3,928	6,372	981	987	136	88	3,80	127-91-3
limoneno	5,154	7,958	1034	1013	136	92	6,78	138-86-3
1,8-cineol	5,261	8,066	1038	1014	154	92	4,52	470-82-6
α -terpineol	9,719	14,417	1160	1153	154	89	6,36	10482-56-1
aloaromadendreno	14,034	24,602	1446	1435	204	88	10,26	489-39-4
globulol	15,908	30,481	1592	1580	222	93	20,10	489-41-8

Tabela 40- Principais constituintes presentes no óleo essencial de *E. citriodora*.

<i>E. citriodora</i>								
Constituintes	tr1	tr2	IR 1	IR 2	PM	SI (%)	% Área	CAS
1,8-cineol	5,237	8,074	1037	1035	154	93	4,84	470-82-6
citronelal	8,791	12,637	1134	1131	154	98	48,25	106-23-0
citronelol	10,538	15,785	1158	1169	156	98	44,87	106-22-9

Tabela 41- Principais constituintes presentes no óleo essencial de *E. microcorys*.

<i>E. microcorys</i>								
Constituintes	tr1	tr2	IR 1	IR 2	PM	SI (%)	% Área	CAS
α -pineno	3,164	5,194	937	937	136	98	12,00	80-56-8
<i>p</i> -cimeno	5,02	7,813	1029	1027	136	92	1,84	99-83-2
limoneno	5,139	7,966	1034	1032	136	92	1,75	138-86-3
1,8-cineol	5,234	8,075	1037	1035	154	96	80,64	470-82-6
α -terpineol	9,71	14,427	1159	1153	154	92	2,85	10482-56-1

Tabela 42- Principais constituintes presentes no óleo essencial de *E. paniculata*.

<i>E. paniculata</i>								
Constituintes	tr1	tr2	IR 1	IR 2	PM	SI (%)	% Área	CAS
<i>trans</i> -cariofileno	13,754	23,829	1400	1415	204	92	21,92	87-44-5
biciclogermacreno	14,803	26,941	1502	1491	204	87	15,47	100762-46-7
espatulenol	15,821	30,133	1585	1572	220	86	10,42	77171-55-2
globulol	15,900	30,479	1592	1580	222	90	21,51	489-41-8
veridiflorol	16,000	30,81	1600	1588	222	93	25,39	552-2-3

Tabela 43- Principais constituintes presentes no óleo essencial de *E. urophylla*.

<i>E. urophylla</i>								
Constituintes	tr1	tr2	IR 1	IR 2	PM	SI (%)	% Área	CAS
<i>o</i> -cimeno	5,021	7,803	1029	1027	136	95	6,50	527-84-4
limoneno	5,143	7,957	1027	1026	136	96	39,45	5989-54-8
1,8-cineol	5,236	8,064	1025	1025	154	97	37,99	470-82-6
γ -terpineno	6,112	8,961	1040	1038	136	95	6,89	99-85-4
α -terpinil-acetato	12,696	20,853	1516	12528	196	91	3,46	80-26-2

Tabela 44- Principais constituintes presentes no óleo essencial de *E. globulus*.

<i>E. globulus</i>								
Constituintes	tr1	tr2	IR 1	IR 2	PM	SI (%)	% Área	CAS
α -pineno	3,163	3,95	936	936	136	97	14,27	80-56-8
β - pineno	3,913	5,058	980	980	136	95	0,90	127-91-3
<i>p</i> -cimeno	5,016	6,523	1029	1033	134	99	4,71	99-87-6
limoneno	5,136	6,661	1033	1037	136	95	3,71	5989-54-8
1,8-cineol	5,225	6,76	1037	1041	136	99	44,68	470-82-6
α -terpineol	9,701	11,1	1159	1159	154	98	2,07	98-55-5
α -gurjuneno	13,61	14,833	1414	1412	204	92	1,05	489-40-7
calareno	13,93	15,192	1438	1439	204	98	0,79	17334-55-3
aromadendreno	14,024	15,294	1445	1446	204	95	7,31	489-39-4
aloaromadendreno	14,326	15,6	1467	1468	204	96	1,49	25246-27-9
epiglobulol	15,598	16,967	1567	1571	222	95	1,96	552-2-3
globulol	15,898	17,267	1591	1594	222	92	9,24	489-41-8

Análise da **Tabela 45** e da **Figura 21**, a seguir, facilita a compreensão dos principais constituintes presentes nos óleos essenciais das doze espécies do gênero *Eucalyptus* estudadas.

Tabela 45- Concentração relativa dos principais constituintes encontrados nos óleos essenciais das 12 espécies de *Eucalyptus* estudadas. Os resultados estão expressos em porcentagem de área.

Constituintes	<i>E. globulus</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. elba</i>	<i>E. botryoides</i>	<i>E. tereticornis</i>	<i>E. resinifera</i>	<i>E. robusta</i>	<i>E. saligna</i>	<i>E. citriodora</i>	<i>E. microcorys</i>	<i>E. paniculata</i>
α -felandreno			4,22		58,02	15,77	0,94					
α -pineno	14,27				7,72		12,41	48,18			12,00	
α -tujeno			1,59			1,10				A		
β -felandreno						14,98						
β -pineno	0,90							3,80				
γ -terpineno		6,89			1,81		9,65		21,37			
limoneno	3,71	39,45	1,93		1,97		4,40	6,78			1,75	
o-cimeno		6,50	33,89		13,20	9,90						
p-cimeno	4,71						3,09		9,21		1,84	
criptona			14,30									
cuminal			3,27									
1,8-cineol	44,68	37,99		3,38	4,81		62,18	4,52		4,84	80,64	
4-terpineol			5,93		2,28	1,65	1,05		3,26			
α -terpineol	2,07			33,70			5,49	6,36			2,85	
citronelal										48,25		
citronelol										44,87		
α -terpinil-acetato		3,46										
α -gurjuneno	1,05											
aloaromadendreno	1,49							10,26				
aromadendreno	7,31											
biciclogermacreno				5,28		10,03						15,47
calareno	0,79											
d-selineno				4,51								
trans-cariofileno				3,80		2,90						21,92
espatulenol			9,81			12,53						10,42
óxido de cariofileno			9,73									
epiglobulol	1,96											
eudesmol				21,27								
globulol	9,24			10,40		12,38		20,10				21,51
nerolidol					5,01							
veridiflorol				4,59		8,63						25,39

Figura 21- Perfil químico das 12 espécies do gênero *Eucalyptus*.

4.11. Análise qualitativa – obtenção dos *fingerprints* cromatográficos

Inicialmente, a análise qualitativa das espécies do gênero *Eucalyptus* foi baseada nas semelhanças e diferenças dos cromatogramas, bem como na separação e altura dos picos correspondentes aos compostos majoritários. Para as doze espécies estudadas (*E. botryoides*, *E. citriodora*, *E. elba*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. microcorys*, *E. paniculata*, *E. resinifera*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. tereticornis* e *E. urophylla*), foi possível relacionar a identidade de cada pico com sua concentração relativa, graças à utilização da CG-EM. Podem-se observar, claramente, algumas regiões nos cromatogramas que permitem diferenciar uma espécie de outra.

Para facilitar a compreensão das informações adquiridas, todos os cromatogramas podem ser divididos em quatro regiões principais, em minutos: a primeira de 2,0 a 8,0 minutos, a segunda de 8,0 a 14,0 minutos e a terceira de 14,0 a 20,0 minutos.

Na primeira região localizam-se os monoterpenos de menor peso molecular, inclusive o 1,8-cineol. São característicos da espécie *E. globulus*, os compostos α -pineno, β -pineno, limoneno e 1,8-cineol, o que foi também observado por HE, et al. (2000b). Além disso, em outro trabalho do mesmo autor, verifica-se que estes monoterpenos são os compostos dominantes de várias espécies do gênero *Eucalyptus* (He et al., 2000a). Como previsto, outras espécies deste estudo também contêm estes monoterpenos, mas somente *E. globulus* e *E. microcorys* possuem todos eles. Não obstante, ainda é possível diferenciar uma espécie da outra observando-se a terceira região do cromatograma. A espécie *E. microcorys* possui apenas um pico em 18,555 minutos (o qual não foi identificado) diferentemente de *E. globulus*, que possui, por exemplo compostos de maior peso molecular como o globulol e o epiglobulol, muito característicos.

Ainda, do ponto de vista da presença de 1,8-cineol, verifica-se que as espécies *E. resinifera* e *E. urophylla* também possuem o marcador em quantidades apreciáveis, no entanto, o perfil químico dos cromatogramas, como um todo, é consideravelmente diferente.

Na região de 8,0 a 14,0 minutos, observa-se, de forma geral, que a maioria das espécies possuem poucos compostos, exceto *E. citriodora*, que possui dois dos picos característicos que permitem identificar a espécie, os quais são o citronelal e o citronelol. É interessante notar que esta espécie também possui o 1,8-cineol, porém, em pequena quantidade. Por ser uma das espécies mais comuns no Brasil e devido ao seu potencial comercial para a produção de desinfetantes, é importante a identificação desta espécie para a prevenção de adulterações de lotes de *E. globulus*.

Finalmente, a terceira região dos cromatogramas, compreende os compostos de maior peso molecular. As espécies *E. elba*, *E. paniculata*, *E. saligna* e *E. tereticornis* possuem compostos característicos nesta região.

É importante ressaltar que as informações provenientes de um *fingerprint* cromatográfico somente podem ser utilizadas na avaliação qualitativa de uma espécie se este estiver relacionado com um padrão, ou seja, uma amostra de planta com identificação botânica confirmada, o que foi priorizado neste trabalho.

As **Figuras 22, 23, 24 e 25** mostram os perfis cromatográficos das 12 espécies utilizadas neste estudo.

Figura 22- Perfis cromatográficos de três espécies de *Eucalyptus*. Na ordem: *E. tereticornis*, *E. botrioides* e *E. citriodora*.

F

Figura 23- Perfis cromatográficos de três espécies de *Eucalyptus*. Na ordem: *E. resinifera*, *E. robusta* e *E. saligna*.

Figura 25- Perfis cromatográficos de três espécies de *Eucalyptus*. Na ordem: *E. grandis*, *E. globulus* e *E. urophylla*.

4.12. Aplicabilidade do método quantitativo

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (1996), o teor mínimo de óleo essencial que se espera encontrar nas folhas de *E. globulus* é 0,8%. De fato, o procedimento de extração das folhas por hidrodestilação permitiu obter teor de óleo essencial de 1,25%, valor acima do esperado. Com relação ao 1,8-cineol, a análise das folhas indicou um teor de 4,02 mg/g.

Apesar do teor de óleo essencial se encontrar dentro do limite especificado nas folhas desidratadas, o teor de 1,8-cineol no óleo, por sua vez, correspondeu a 54,1%, ou seja, 20% abaixo do esperado, que é, no mínimo, 70% (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1996). Este resultado se deve, muito provavelmente, em função do processo de secagem da planta, uma vez que o laudo do fornecedor informa que o material vegetal foi desidratado em estufa. Como o 1,8-cineol, componente majoritário presente no óleo essencial é um monoterpeneo, este tem maior facilidade de se volatilizar dependendo das condições de temperatura ao qual está sendo submetido. Outro fator importante a ser considerado é a idade das folhas colhidas. Sabe-se que folhas mais jovens desta espécie tendem a ter maiores rendimentos de óleo (SILVESTRE et al., 1997) e, conseqüentemente, é possível que folhas mais jovens também forneçam maiores teores de 1,8-cineol que as mais velhas (HE et al., 2000a).

Este resultado ilustra, mais uma vez, a necessidade de se promover e garantir a qualidade da matéria-prima vegetal considerando o cultivo, a colheita, a estabilização e o armazenamento da planta desidratada (SIMÕES et al., 2003).

Já os teores de 1,8-cineol encontrados na tintura e no extrato fluido foram, respectivamente, 1,02 mg/mL e 4,81 mg/mL. Neste caso, os resultados obtidos refletem, além da qualidade da matéria-prima de partida, o processo de obtenção de cada extrato. Quando se compara a concentração de 1,8-cineol na tintura (1:5) com o extrato fluido

(1:1), verifica-se que este último apresenta um teor cerca de 5 vezes maior. Foram analisados, em triplicata, as folhas desidratadas, tintura, extrato fluido e óleo essencial de *E. globulus* e o xarope de eucalipto. Sendo assim, apresentam-se, na **Tabela 46**, os valores médios obtidos.

Tabela 46- Teor de 1,8-cineol encontrado nas folhas, tintura, extrato fluido e óleo essencial de *E. globulus* e xarope de eucalipto.

Amostra	Teor médio	<i>S</i>	% CV
Folhas	4,02 mg/g	0,075	1,86
Tintura	1,02 mg/mL	0,006	0,57
Extrato fluido	4,81 mg/mL	0,004	0,55
Óleo essencial	54,1 % m/m	0,300	0,55
Xarope de eucalipto	0,506 mg/g	0,005	0,92

Finalmente, com relação ao xarope de eucalipto, elaborado a partir do extrato fluido de *E. globulus* na proporção de 1:10 m/m, esperava-se, de acordo com os cálculos teóricos, obter 0,524 mg de 1,8-cineol por grama de xarope. O teor de encontrado foi de 0,506 mg/g, ou seja, houve uma diferença de aproximadamente 3,4%, muito provavelmente devido a perdas no procedimento de preparo do produto e no procedimento analítico, visto que, como demonstrado anteriormente, o monoterpene em análise é muito volátil.

De forma geral, observa-se que o método analítico foi capaz de quantificar com sucesso o teor de 1,8-cineol em diferentes matrizes, tais como: folhas desidratadas de *E. globulus*, óleo essencial, extratos e no fitoterápico xarope de eucalipto, além de fornecer dados confiáveis a respeito da rastreabilidade do produto final.

Ao se utilizar uma única amostra do material vegetal bruto conseguiu-se minimizar possíveis erros relacionados à variabilidade de amostras. No entanto, ao executar a metodologia para a quantificação do marcador 1,8-cineol nas folhas

desidratadas e no óleo essencial, obteve-se teor menor do que o esperado, evidenciando baixa qualidade da amostra inicial.

Para efeitos de desenvolvimento e validação analítica este fato não interferiu na qualidade dos resultados. Ao contrário, indicou a importante necessidade de se utilizarem procedimentos criteriosos para a avaliação da qualidade de plantas medicinais e seus produtos, desde a identificação da matéria-prima vegetal até a quantificação dos constituintes ativos ou marcadores.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

A execução deste trabalho permitiu alcançar com sucesso um dos objetivos principais, que era desenvolver um procedimento analítico capaz de garantir a rastreabilidade de todo o processo produtivo do fitoterápico xarope de eucalipto, desde a aquisição da matéria-prima até a aprovação do produto final.

Desta forma, foi desenvolvido e validado um método analítico utilizando cromatografia gasosa para a quantificação do monoterpeneo 1,8-cineol nas folhas, extratos e óleo essencial de *E. globulus*, bem como no fitoterápico xarope de eucalipto. A obtenção deste xarope, por sua vez, foi possível graças à utilização de um extrato fluido 1:1, obtido pelo processo C de percolação, o que permitiu alcançar a dosagem mínima de 1,8-cineol preconizada pela legislação brasileira para fitoterápicos contendo insumos desta espécie.

Com os resultados obtidos na etapa de validação verifica-se que o método apresentou seletividade, exatidão e precisão excelentes, parâmetros que refletem diretamente a qualidade e a segurança do doseamento do componente de interesse. Além desses parâmetros foram determinados também a linearidade, os limites de detecção e quantificação e a robustez do método.

Posteriormente, com a obtenção dos perfis cromatográficos (*fingerprints*) e a identificação dos picos majoritários das 12 espécies do gênero *Eucalyptus* foi possível a elaboração de um banco de dados para posteriores análises de amostras do gênero viabilizando, desta forma, uma eficiente e preliminar identificação do material vegetal desidratado, seja ele rasurado ou mesmo em pó.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, B.; ZAKIR, S.; BASHIR, S.; BEGUM, S.; ISMAIL, M.; BADSHAH, A. phytochemical evaluation of *Eucalyptus citriodora*. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 1, n.1, p.55-56, 2002.

ALONSO J. **Tratado de Fitomedicina**. 1 ed. Rosário: Isis Ediciones, 2004, 1360 p.

BARNES, J. Quality, efficacy and safety of complementary medicines: fashions, facts and the future. Part I. Regulation and Quality. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 55, p. 226 - 233, 2003a.

BARNES, J. Quality, efficacy and safety of complementary medicines: fashions, facts and the future. Part II. Efficacy and Safety. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 55, p. 331-340, 2003b.

BERG, M. E. von den. **Plantas Medicinais da Amazônia: Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático**. 2 ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993, 206 p.

BETTS, T. J. Solid phase microextraction of volatile constituents from individual fresh *Eucalyptus* leaves of three species. **Planta Medica**, v. 66, n.2, p. 193-95, 2000.

BLUMENTHAL, M. **The Complete Commission E Monographs**. Massachusetts: Integration Medicine Communications, 1998, 685 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RE n. 899 – **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. 29 de maio de 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RE n. 89 – **Lista para registro simplificado de fitoterápicos**. 16 de março de 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1018 p.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic Agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179 – 189, 2000.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CELEGUINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng ("guaco") leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n.6, p. 706-09, 2001.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n.2, p. 212-20, 2002.

CLEMENT, R. E. **Gas Chromatography: Biochemical, Biomedical and Clinical Applications**. New York: John Wiley and Sons Inc., 1990. 393 p.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas V. II**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. 6v.

DI STASI, L. C. (org). **Plantas Medicinais: Arte e Ciência – Um guia de estudo multidisciplinar**. São Paulo: Editora Unesp, 1996, 232 p.

DAYAL, R. & AYYAR, K. S. Analysis of medicinal oil from *E. globulus* ssp *bicostata* leaves. **Planta Medica**, p. 162, 1986.

FADEL, H.; MARX, F.; EL-SAWY, A.; EL-GORAB, A. Effect of extraction techniques on the chemical composition and antioxidant activity of *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostis* leaf oils. **Zeitschrift-fuer-Lebensmittel-Untersuchung-und-Forschung A**, v. 208, p. 212 – 216, 1999.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte I. São Paulo: Ateneu, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte II. São Paulo: Ateneu, 1996.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 1 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926.

GONG, F.; LIANG, Y.; XIE, P. et al. Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, p. 25 – 40, 2003.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 305 – 309, 1996.

GRUENWALD, J.; BRENLER, T.; JAENICKE, C. **PDR for Herbal Medicines**. 2 ed. Montvale: Medical Economics Company Inc, 2000, 858 p.

GUENTHER, E. **Individual Essential Oils of the Plant of Family Myrtaceae**. In: The essential oils, 4 ed., New York: Van Nostrand, 1977, 2v.

GUO, Q. & YANG, X. Cypellocarpin C and others compounds from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 34, p. 543 – 545, 2006.

HARVEY, A. Strategies for discovering drug from previously natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 7, p. 297 – 300, 2000.

- HE, C.; MURRAY, F. LYONS, T. Monoterpene and isoprene emissions from 15 *Eucalyptus* species in Australia. **Atmospheric Environment**, v. 34, p. 645 – 655, 2000a.
- HE, C.; MURRAY, F. LYONS, T. Seasonal variations in monoterpene emissions from *Eucalyptus* species. **Chemosphere: Global Change Science II**, p. 65 – 76, 2000b.
- HEYDEN, Y. V.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J. et al. **Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation**. Belgium: Vrije Universiteit Brussel, 2006, 40 p.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. São Carlos: EDUSCAR, 2003. 152 p.
- INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. DOQ-CGCRE-008 – Revisão 1. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, 2003.
- LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 4 ed., Campinas: Editora Átomo, 2002, 278 p.
- OBRADOVIC, M.; KRAJESEK, S. S.; DERMASTIA, M.; KREFT, S. A new method for the authentication of plant samples by analysing fingerprint chromatograms. **Phytochemical analysis**, v. 8, p. 123 – 132, 2007.
- OSAWA, K.; YASUDA, H.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Eucalyptone from *E. globulus*. **Phytochemistry**, v. 40, n.1, p. 183-184, 1995.
- OSAWA, K.; YASUDA, H.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Macrocarpals H, I and J from the leaves of *Eucalyptus globulus*. **Journal of Natural Products**, v.59, n. 9, 1996.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, s.1, p.45-61, 2002.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K; VARRO, E. T. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997. 372 p.
- ROUSSEAU, C. G.; SCHACHTER, H. Regulatory issues concerning the safety, efficacy, and quality of herbal remedies. **Birth Defects Research B**, v.68, n. 6, p.505-10, 2003.
- SANTOS, G. C.; ALVES, J. C. N.; RODELLA, J. M. L. et al. Terpenoids and Other Constituents of *Eucalyptus globulus*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1309 – 1312, 1997.

SCHANEBERG, B. T.; CROCKETT, S.; BEDIR, E. KHAN, I. A. The role of chemical fingerprinting: application to *Ephedra*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 911 – 918, 2003.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Rational Phytotherapy**. 3 ed. Berlin: Springer. 1998, 306 p.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 277-283, 2003.

SILVESTRE, A. F. D.; CAVALEIRO, J. A. S.; DELMONT, B. et al. Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. **Industrial Crops and Products**, n. 6, p. 23-33, 1997.

SIMÕES, C. M. O. (org). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5 ed., Porto Alegre: Editora da UFSC, 2003. 834 p.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of *Eucalyptus* leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, n.1, p.60-64, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R. FAJGELJ, A. et al. Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, p. 337 – 348, 1999.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R. WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835 – 855, 2002.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; STADEN, J. F. V. et al. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC recommendation). **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p. 1381 – 1386, 2001.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n.2, p. 326 – 337, 2006.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de eucalipto**. Documentos florestais – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, n. 17, 2003 26 f.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality Control Methods for Medicinal Plants Material**. Geneva: World Health Organization, 1992. 84 p.