



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DE
EUGENOL EM ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Cinnamomum zeylamicum*
(CANELA)**

Mestrando: Glene Henrique Rodrigues Cavalcante
Orientador: Prof. Dr. Edmar Pereira Marques

São Luís - MA
2008

Glene Henrique Rodrigues Cavalcante

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DE
EUGENOL EM ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Cinnamomum zeylamicum*
(CANELA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Química Analítica da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Pereira Marques

São Luís – MA
2008

Glene Henrique Rodrigues Cavalcante

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DE
EUGENOL EM ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Cinnamomum zeylamicum*
(CANELA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
graduação em Química Analítica da
Universidade Federal do Maranhão como
parte dos requisitos necessários para
obtenção do título de Mestre em Química
Analítica.

Aprovado em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edmar Pereira Marques
Departamento de Química da UFMA

Prof. Dr. Ronaldo Nascimento
Departamento de Química Analítica-UFC

Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho
Departamento de Tecnologia Química da UFMA

Em especial as minhas mães Darcy e Judite,
por toda vida que me propuseram.

Ao meu pai Teodorico (in memorian),
responsável por tudo que sou hoje.

Aos meus irmãos Mônica e Glácio que
sempre me apoiaram e me incentivaram

A minha noiva, Kiany Sirley, pela
compreensão, ajuda e palavras positivas.

Aos professores Edmar e Aldalea Marques,
pela oportunidade e compreensão.

A todas que fizeram parte da minha vida
acadêmica e profissional. Enfim a todos que
acreditaram no meu trabalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as grandes realizações na minha vida;

Aos professores Edmar e Aldaléa Marques, pela orientação, amizade, pela ajuda prestada durante todos estes anos e acima de tudo pelo incentivo constante;

Ao professor Victor Elias Mouchrek, pela imensa contribuição na realização deste trabalho;

A professora Cristina, pela sua colaboração na correção deste trabalho, pela amizade, e demais contribuições prestadas no decorrer deste curso;

Ao LPQA - Laboratório de Pesquisa em Química Analítica da UFMA e toda a sua equipe técnica pela contribuição na parte experimental, em especial à Wendel Mesquita pela fiel colaboração durante a realização da parte experimental;

Ao Herbário desta Universidade, especialmente a professora Msc Ana Zélia Silva do Departamento de Farmacia, pela sua grande contribuição na identificação da espécie vegetal estudada;

Ao LAPQAP – Laboratório de Análise e Pesquisa em Química Analítica de Petróleo e Biocombustíveis, pela oportunidade oferecida, pelas instalações e pelo apoio incondicional;

Agradecimento especial aos meus amigos e companheiros de trabalho que durante todo tempo me incentivaram, apoiaram e acreditaram fielmente no meu trabalho: Antônio Araújo, Marcelo, Leandro Lopes, Andréia, Ana Amélia, Eva Michelly, Ednaldo, Érica Vanessa, Cícero Romão, Sonáira, Alessandra, Conceição, Luene, Umarley e Frednan;

Ao PCQA – Programa de Controle de Qualidade de Alimentos, e sua equipe: professores João Mouchrek, Adenilde, Nestor e toda a equipe técnica: André, Marlucy, Waldenia, Josilene, Josy, Carlinhos, Zequinha, Zé Walter, Paula, Ana Sheila, Dica, Jane, Neves e todos os outros que juntos me proporcionam um amável ambiente de trabalho;

A toda a equipe do Risca Faca, fiéis companheiros de equipe, e aos inesquecíveis amigos: Ronald, Ulisses, Adilton, Valdez, Rosiane, Arine, Vera, Raimundinha, Jethânia, Luiza, Clediciomar, Gladson, Lyzette, Ariana, Mônica, Franscristiane, Joelkson, Janyeid, Lorena, Adriana, Vívía, Luciana, Cristiane, Ilana, Jaciene, Karina e especialmente você;

Ao CNPq, FAPEMA e FSADU, pelo auxílio concedido durante a realização deste trabalho;

Aos professores, funcionários, servidores e serventes da UFMA, pelo agradável convívio.

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht

RESUMO

Este trabalho relata a otimização e validação de um método eletro-analítico para determinação de eugenol em óleo essencial, obtido das folhas verdes de *Cinnamomum zeylamicum* (canela), com aplicação testada em outros óleos essenciais de interesse científico, como o *Origanum* (orégano) e *Pimenta dioica L* (pimenta dióica). A espécie vegetal foi coletada na Maioba, município de Paço do Lumiar, e submetida à identificação Botânica no Herbário da Universidade Federal do Maranhão. Os óleos essenciais foram extraídos por processo de hidrodestilação e submetidos às análises eletro-analíticas. A técnica escolhida foi a Voltametria de Pulso Diferencial, usando como eletrodo de trabalho carbono vítreo, e eletrólito o tampão Britton Robisson com 55% de Etanol. Os parâmetros testados e revelados na otimização foram os seguintes: potencial de oxidação (+524mV), tempo de deposição (100 s), velocidade de varredura (40m V/s), amplitude de pulso (100 mV) e pH (3,3). A curva analítica foi usada como ferramenta para determinação do percentual de eugenol na amostra, o procedimento foi validado, apresentando LDM = $3,12 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ e LQM = $1,12 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$. O método empregado forneceu um percentual de 64,31 % de eugenol na espécie de canela, 20,2 e 78,31 % nos óleos essenciais de orégano e pimenta dióica respectivamente. O emprego da presente metodologia evidencia a potencialidade da utilização da técnica de pulso diferencial com eletrodo de carbono vítreo, fornecendo uma resposta voltamétrica precisa e exata para a análise do eugenol em óleos essenciais.

Palavras-chave: eugenol, óleo essencial, canela, voltametria, eletrodo de carbono vítreo.

ABSTRACT

This work reports the optimization and validation of an eletro-analytical method for to determine eugenol in essential oil, it obtained of the green leaves of *Cinnamomum zeylamicum* (cinnamon), with application tested in other essential oils of scientific interest, such as the *Origanum* (oregano) and *Dioic Pepper L* (dioic pepper). The vegetable species was collected in Maioba, Paço do Lumiar district, and it submitted to Botanical identification in the Herbarium of the Federal University of Maranhão. The essential oils were extracted for hydrodistillation process and it submitted to the eletro-analytical analyses. Voltammetric of Differential Pulse was the technique chosen, that it use the glass carbon as work electrode, and the buffer Britton Robisson with 55% of Ethanol as electrolyte. They were used an tested in the otmization the following parameters: oxidation potential (+524mV), deposition time (100 s), scan speed (40m V/s), pulse amplitude (100 mV) and pH (3,3). The analytical curve was used as tool for determination of the eugenol percentage in the sample, the procedure was validated, it obtaining LDM = $3,12 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹ and LQM = $1,12 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹. The employed method provaided 64,31 % of eugenol in the cinnamon species, 20,2 and 78,31 % in the oregano and dioic pepper essential oils, respectively. The use of the methodology present evidences the potentiality of the application of the differential pulse technique with glass carbon electrode supplying an answer voltammetric precise and exact for the analysis of the eugenol in essential oils.

Key words: Eugenol, essential oil, cinnamon, voltammetry, glass carbon electrode.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Forma estrutural molecular e planar do eugenol 20
- Figura 2.** Rota do Ácido Chiquímico para síntese do eugenol..... 21
- Figura 3.** Formas de aplicação do potencial para a voltametria cíclica: A) potencial com varredura linear e B) potencial do tipo escada (ALEIXO, 1994)..... 27
- Figura 4.** Exemplos das etapas envolvidas na voltametria de redissolução anódica. (a) programação E vs t mostrando o tempos de deposição (T_d); e potenciais de deposição E_d , (b) Tempo de repouso (T_r) . (c) Etapa de redissolução (ALEIXO, 1994)..... 31
- Figura 5.** Destilador adaptado de Clevenger para extração de óleos essenciais, (a) sistema com capacidade de 1000 mL, (b) sistema com capacidade de 6000 mL 43
- Figura 6.** Voltamograma cíclico do padrão de eugenol para determinação do potencial de oxidação, obtido usando velocidade de varredura 50mVs^{-1} , pH 3,3 em solução hidroalcoólica contendo mistura de tampão BR e 60% de etanol 47
- Figura 7.** Gráfico do comportamento da corrente com variação do tempo de deposição obtido, usando velocidade de varredura 50mVs^{-1} , potencial de oxidação em $+524\text{mV}$, amplitude de pulso 25mV , pH 3,3 em solução hidro-alcoólica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol 49
- Figura 8.** Variação da corrente de pico com o aumento da amplitude de pulso, usando velocidade de varredura 50mVs^{-1} , potencial de oxidação em $+524\text{mV}$, tempo de deposição de 100s, pH 3,3 em solução hidro-alcoólica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol 51
- Figura 9.** Gráfico da variação da corrente com o aumento da raiz quadrada da velocidade de varredura, usando potencial de oxidação em $+524\text{mV}$, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV , pH 3,3 em solução hidro-alcoólica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol 52
- Figura 10.** Variação da corrente com aumento do pH do eletrólito, obtidos usando potencial de oxidação em $+524\text{mV}$, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV , velocidade de varredura 100mVs^{-1} em solução hidro-alcoólica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol 54
- Figura 11.** Reação do eugenol com o Hidróxido de Sódio usado para correção do pH no Tampão BR 54
- Figura 12.** Formação do radical fenóxi a partir da eletrooxidação do eugenol na superfície do eletrodo de carbono vítreo 55
- Figura 13.** Formação do íon fenoxônio a partir da eletro-oxidação do eugenol 55

- Figura 14.** Voltamograma do padrão de eugenol e óleo essencial de canela, obtidos experimentalmente usando potencial de oxidação em +524mV, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV, pH 3,3, velocidade de varredura 100mVs⁻¹ em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol 56
- Figura 15.** Curva analítica do padrão de eugenol usando potencial de oxidação em +524mV, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV, pH 3,3, velocidade de varredura 100mVs⁻¹ em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol 57
- Figura 16.** Variação da Corrente (I_p) com o aumento da concentração de eugenol para determinação da faixa de linearidade, usando potencial de oxidação em +524mV, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV, pH 3,3, velocidade de varredura 100mVs⁻¹ em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol 58
- Figura 17.** Variação da corrente (I_p), com o aumento da concentração de eugenol, para determinação da faixa de trabalho, usando potencial de oxidação em +524mV, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV, pH 3,3, velocidade de varredura 100mVs⁻¹ em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol 59
- Figura 18.** Voltamograma de Pulso Diferencial do LQM em comparação com a menor concentração usada na curva analítica, obtido usando potencial de oxidação em +524mV, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV, pH 3,3, velocidade de varredura 100mVs⁻¹ em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol 63
- Figura 19.** Gráfico do z-score para verificação da reprodutibilidade do método..... 66
- Figura 20.** Voltamograma de pulso diferencial do orégano, obtido usando potencial de oxidação em +524mV, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV, pH 3,3, velocidade de varredura 100mVs⁻¹ em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol 68
- Figura 21.** Espectros de absorção no UV. a) mistura etanol/água à 60 %. b) óleo essencial e C) padrão de eugenol (MOUCHREK, 2000). 69
- Figura 22.** (A) Curva de adição padrão de solução contendo 20 µL de solução estoque preparada com 100 µL de amostra de óleo essencial, em 10 mL de mistura etanol/água a 60 %. (B) Espectros de absorção da amostra e das concentrações de padrão de eugenol: (1) amostra; (2) 1,28 x 10⁻⁴ ; (3) 2,56 x 10⁻⁴; (4) 3,85 x 10⁻⁴ e (5) 5,12 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ (MOUCHREK, 2000) 69
- Figura 23.** Voltamograma de pulso diferencial do óleo essencial da *Pimenta dióica* L, obtido usando potencial de oxidação em +524mV, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV, pH 3,3, velocidade de varredura 100mVs⁻¹ em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol..... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores do potencial de deposição versus corrente de pico	49
Tabela 2. Valores de amplitude de pulso versus corrente de pico	50
Tabela 3. Valores da velocidade, raiz quadrada da velocidade, corrente e desvio, obtidos experimentalmente	52
Tabela 4. Valores de pH e corrente obtidos experimentalmente.....	53
Tabela 5. Valores de corrente obtidos experimentalmente a partir de concentrações conhecidas	57
Tabela 6. Valores de corrente e concentração de eugenol obtidos experimentalmente	59
Tabela 7. Valores de corrente, desvio padrão e variância, obtidos a partir da adição de 300µL da solução estoque contendo padrão de eugenol, correspondente a concentração de $2,80 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$	60
Tabela 8. Valores de corrente, desvio padrão e variância, obtidos a partir da adição de 200µL da solução estoque contendo óleo essencial de canela em 100 µL da solução estoque contendo padrão de eugenol.....	60
Tabela 9. Valores de corrente de pico para calculo de recuperação do método.....	61
Tabela 10. Valores de corrente e concentração para determinação do limite de detecção do método.....	62
Tabela 11. Valores de corrente e concentração e desvio padrão para determinação da repetitividade do método	64
Tabela 12. Valores de corrente e concentração para determinação da reprodutibilidade do método.....	65
Tabela 13. Concentração de eugenol obtidos experimentalmente, para determinação da exatidão	67

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS.....	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
2.1 NOÇÕES SOBRE ÓLEOS ESSENCIAIS	17
2.2 ASPECTOS GERAIS SOBRE A ESPÉCIE CANELA.....	18
2.3 ASPECTOS GERAIS SOBRE O EUGENOL	19
2.4 ASPECTOS GERAIS SOBRE VOLTAMETRIA	24
2.4.1 Considerações sobre eletrodos	25
2.4.3 Voltametria Cíclica	26
2.4.4 Voltametria de Pulso diferencial.....	29
2.4.5 Determinação voltamétrica de compostos fenólicos.....	31
2.5 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	33
2.5.1 Faixa de linearidade	34
2.5.2 Faixa de trabalho	36
2.5.3 Seletividade	36
2.5.4 Teste de recuperação	37
2.5.5 Limite de detecção	37
2.5.6 Limite de Quantificação	38
2.5.7 Precisão do método	38
2.5.7.1 Repetitividade	38
2.5.7.2 Reprodutibilidade.....	39
2.5.8 Exatidão.....	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 REAGENTES E MATERIAIS.....	42
3.1.1 Obtenção dos óleos essenciais	42
3.1.2 Determinações Voltamétricas	42
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	42
3.2.1 Coleta e caracterização botânica	42
3.2.2 Processo de extração do óleo essencial.....	43
3.2.3 Preparo das amostras.....	44
3.2.4 Condições de análise.....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 RESULTADO DA CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA	47
4.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO ELETRO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE EUGENOL	47
4.2.1 Estudo do potencial de oxidação.....	47
4.2.2 Estudo do tempo de deposição.....	48
4.2.3 Estudo da amplitude de pulso	50
4.2.4 Influência da velocidade de varredura	51
4.2.5 Estudo da variação do pH	53
4.3 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA E DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE EUGENOL NO ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA	56
4.4 DETERMINAÇÃO DAS FIGURAS DE MÉRITO	57ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.4.1 Faixa de linearidade	58
4.4.2 Faixa de trabalho	59
4.4.3 Seletividade.....	60

4.4.4	Teste de recuperação	61
4.4.5	Limite de detecção	62
4.4.6	Limite de Quantificação	62
4.4.7	Cálculo de Precisão	63
4.4.7.1	Determinação da Repetitividade	64
4.4.7.2	Determinação da Reprodutibilidade.....	65
4.4.8	EXATIDÃO	66
4.4.9	DETERMINAÇÃO DE EUGENOL EM OUTRAS MATRIZES	67
4.4.10.1	Determinação de eugenol em óleo essencial de orégano	67
4.4.10.2	Determinação de eugenol em óleo essencial das folhas de <i>Pimenta dioica</i> L.....	68
	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	74

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO

O interesse pelo uso de terapias alternativas, tem crescido significativamente nos últimos anos, principalmente pelos produtos naturais derivados de plantas e substâncias vegetais empregadas como fármacos naturais ou suportes de medicamentos sintéticos. A expansão da fitoterapia pode ser atribuída a diversos fatores tais como: aos efeitos adversos de fármacos sintéticos, a preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”, a validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, o desenvolvimento de novos métodos analíticos colocados à disposição do controle de qualidade, além também do menor custo se comparado com os fármacos sintéticos (CAÑIGUERAL *et al.* 2003; VIEIRA, 2001).

O Brasil é caracterizado internacionalmente como possuidor da maior reserva florestal diversificada do planeta. O potencial dessa flora para uso na medicina tem sido destacado no meio científico interessado em descobrir novas substâncias. Contudo, ainda é incipiente o que existe de trabalhos com metodologia cientificamente estruturada. A maior parte das publicações é de ensaios empíricos baseados no dito popular. (MALFAIA *et al.* 2008)

Devido a grande demanda por produtos a base de plantas medicinais, conseqüência do significativo aumento do interesse do público brasileiro por “terapias naturais”, se faz necessário investigar como esses produtos estão sendo oferecidos ao consumidor, de acordo com a legislação específica e critérios estabelecidos cientificamente (NASCIMENTO *et al.* 2005a; NASCIMENTO *et al.* 2005b; AMARAL *et al.* 2003; MELO *et al.*, 2007).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem elaborando normas para a regulamentação destes medicamentos, desde a Portaria n. 6 de 1995, que estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos, passando pela RDC n. 17 de 2000, e a Resolução RDC n. 48 de 16 de março de 2004, atualmente em vigor. Esta preocupação das autoridades regulatórias com a normalização dos medicamentos fitoterápicos propicia a avaliação de aspectos importantes, como a eficácia e segurança do uso destes medicamentos. O uso tradicional de diversas plantas medicinais baseado em conhecimentos populares, aliado à crença de que, por ser natural não causa reações adversas, fez com que poucas plantas medicinais fossem avaliadas usando os estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar sua eficácia e segurança (TURROLA *et al.*, 2006).

Além disto, sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta, extração de seus constituintes, até a elaboração

do medicamento final. Esse controle apesar de trazer benefícios aos usuários de medicamentos fitoterápicos, promove o encarecimento do produto, devido ao alto custo com ensaios laboratoriais na identificação de constituintes presentes nas essências vegetais. O uso de métodos alternativos para identificação dos constituintes presentes nos vegetais tem sido estudado com objetivo de simplificar o processo de identificação e quantificação de constituintes presentes nas essências vegetais e promover a diminuição dos custos do produto final. A técnica eletro analítica apresentada neste trabalho foi avaliada como método para identificação e quantificação de eugenol no óleo essencial da espécie *Cinnamomum zeylamicum* (Canela).

Dentre as várias plantas com propriedades terapêuticas, a canela obteve destaque especial, devido a sua incidência em maior escala quanto ao uso medicinal e na culinária, citada por antigos historiadores gregos e romanos a 2700 a.c. (MATOS, 1984)

A canela e o seu óleo essencial têm sido empregados como corretivos do odor e do sabor na preparação de alimentos e alguns medicamentos (COSTA, 1975). Trabalhos prévios sobre o óleo essencial indicaram uma grande diversidade da composição química, com relatos de pelo menos quatro quimiotipos: como cinamaldeído (VARIYAR, 1989), benzoato de metila (RAO, PAUL e DUTRA, 1988), linalol (JIROVETZ *et al*, 2001), cânfora (SENANAYAKE, 1978) e eugenol (THOMAS *et al*, 1987 citado por LIMA *et al*, 2005), este último, considerado um dos componentes mais importantes, sendo amplamente utilizado na odontologia no alívio a dor de dente, como anti-séptico, e na fabricação de dentifrícios, em perfumaria, saboaria e como clarificador em histologia. O eugenol é também usado como matéria-prima para a obtenção de vanilina empregada na aromatização de doces, chocolates, sorvetes e tabacos, são usados como antibactericida, antiinflamatório entre outros. Existem outras espécies vegetais que possuem eugenol em sua composição, como é o caso de algumas espécies de manjeriço, pimenta dióica, orégano e canela, que em decorrência do seu cultivo podem se tornar inviáveis para produção em escalas comerciais.

Tendo em vista a importância comercial apresentada, e a necessidade do estudo de metodologias alternativas, este trabalho objetiva a otimização de método para determinação eletro-analítica de eugenol em óleos essenciais da espécie *Cinnamomum zeylamicum*, usando a técnica de voltametria de pulso diferencial, executando coleta e identificação Botânica da espécie vegetal estudada; extração dos óleos essenciais; validação do procedimento eletro-analítico para determinação de eugenol e aplicação do procedimento otimizado em óleos essenciais de outras espécies vegetais de interesse comercial.

CAPITULO 2

CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.1 Noções sobre óleos essenciais

Os óleos essenciais das plantas são misturas complexas de constituintes voláteis que conferem aromas e sabores característicos. Apresentam-se como líquidos oleosos de alta volatilidade, o que diferenciam dos óleos fixos, possuem solubilidade em água limitada, mas o suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas de hidrolatos. De uma maneira geral os óleos essenciais são instáveis, especialmente na presença de luz, calor, umidade, ar e metais. (SIMÕES *et al*, 1999)

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é um composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços), porém os terpenos e os fenilpropenos são as classes mais comumente encontradas. (SIMÕES *et al*, 1999)

As plantas de uma mesma espécie, quando cultivadas em diferentes partes do mundo apresentam óleos essenciais via de regra, com a mesma composição qualitativa, porém diferindo nas proporções dos seus constituintes, o que certamente terá efeito sobre seu aroma e suas principais aplicações (ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1996).

Há milhares de anos, os óleos essenciais vêm sendo extraídos de plantas e usados nas indústrias de perfumes, cosméticos e fármacos de uso medicinal. A importância econômica que as plantas aromáticas representam à Região Amazônica está associada à aplicação de seus óleos essenciais e uso de seus aromas em processos tecnológicos (VIANA *et al*. 1998).

Nos últimos anos, estudos científicos têm sido conduzidos com o objetivo de identificar as substâncias químicas que compõem os óleos essenciais de plantas da Amazônia brasileira (VIANA *et al*, 1998 e ZOGHBI *et al*, 1998a). Os óleos essenciais são encontrados nas partes aéreas (folhas e ramos finos), cascas, troncos, raízes, frutos, flores, sementes e resinas (ZOGHBI *et al*, 1998b).

No processo de extração de óleo essencial, podem ser aplicados diversos métodos, como a hidro-destilação, maceração, extração por solvente, enfleuragem, gases supercríticos e microondas. Dentre esses, o método de maior aplicação é o de hidrodestilação que se divide em duas técnicas – arraste a vapor (CRAVEIRO *et al*. 1981) e coação (SANTOS *et al*. 1998). Entretanto, são necessários conhecimentos mínimos dos fundamentos teóricos das ciências aplicadas, na condução do processo de destilação e na elaboração de projetos de

equipamentos para a extração de óleos essenciais, tanto em escala laboratorial quanto industrial.

No trabalho proposto optamos pela utilização do óleo essencial da espécie *Cinnamomum zeylanicum* (canela), devido ao grande percentual de eugenol em sua composição.

2.2 Aspectos gerais sobre a espécie canela

As canelas estão entre as espécies mais antigas conhecidas pela humanidade. Originária do Ceilão, atual Sri Lanka, pertencente à família das Laureaceae, podendo alcançar alturas de 8 a 17 metros. Suas cascas e folhas são fortemente aromáticas, de odor suave e sabor adocicado levemente picante, possuindo células secretoras com conteúdo oleoso, folhas opostas, longas e aveludadas. Como todas as espécies de *Cinnamomum*, são aromáticas e bastante usadas como tempero na tradicional medicina homeopática (KOCHUMMEN, 1989; VERNON e RICHARD, 1976), e como anti-inflamatórios (SHUOMINGSHU, 2008).

Durante muitos anos os químicos acreditaram que a substância responsável pelo cheiro de canela era um ácido orgânico, devido a sua solubilidade em meio alcalino. Gottlieb e Magalhães (1959), ainda quando trabalhavam no Instituto de Química Agrícola, no Rio de Janeiro, isolaram e identificaram o único nitro-derivado odorífero que se conhece até hoje. O nitrofenil-etano é o responsável pelo cheiro de canela das cascas de *Aniba canelilla*. Além deste composto, isolaram e identificaram o eugenol e o metileugenol no mesmo óleo. Por ser o componente majoritário, o 2-nitrofenil-etano cristaliza no óleo, obtido por arraste com vapor das cascas da árvore estudada, facilitando a separação e identificação.

Considerada símbolo da sabedoria, a canela foi usada na Antigüidade pelos gregos, romanos e hebreus para aromatizar o vinho e com fins religiosos na Índia e na China. Mesmo sem a importância que teve no passado e não sendo mais motivo de lutas entre os povos, a canela continua indispensável, como tempero na culinária moderna. (PINTO, 1995)

Jham *et al* (2005), identificaram os componentes fungitóxicos mais ativos do óleo da casca de *Cinnamomum zeylanicum*, para serem usados como marcador para padronização de conservantes para aplicação em armazenamento de sementes. Os dados revelam que cinamaldeído é o composto principal com atividade antifúngica tanto no óleo extraído com hexano quanto no óleo destilado da casca. Os outros componentes parecem ter efeito aditivo ou sinérgico na atividade fungitóxica total.

Koketsu et al (1997), estudou os óleos essenciais de cascas e folhas das espécies *Cinnamomum verum* Presl e *Cinnamomum zeylanicum* Bl, provenientes de doze árvores submetidas a diferentes tipos de adubação, e concluiu que a composição e teores de seus componentes não variam em função do tipo de adubação utilizada.

Santurio et al (2007), testou óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sessenta amostras de *Salmonella enterica* de origem avícola, e verificou que o óleo essencial de orégano evidenciou forte atividade antibacteriana, seguido do tomilho que apresentou atividade moderada, e por último a canela, que apresentou a menor atividade dentre os óleos testados. Apesar da menor atividade antibacteriana deste óleo essencial, quatro isolados (*sorovares Derby, Infantis e Typhimurium*) foram fortemente inibidos por esta essência,

Moreira e Mancini-Filho (2004) verificaram o potencial antioxidante da mistura das especiarias: mostarda, canela e erva-doce; os resultados obtidos sugeriram uma provável atuação sobre o metabolismo lipídico, por meio de proteção contra a oxidação e ação sobre enzimas da biossíntese dos eicosanóides.

Benarroz et al (2008), avaliou o comportamento da espécie de canela *zeylanicum* aplicada em ratos, e observou as alterações nos componentes presentes no sangue.

Patel et al (2007) caracterizaram o óleo essencial da espécie *Cinnamomum verum* (canela) usando a técnica de cromatografia gasosa com detector de massa, e encontraram um teor de eugenol de 86,02% em sua composição.

2.3 Aspectos gerais sobre o eugenol

Dentre os compostos fenólicos voláteis o Eugenol (4-alil-2-metil-metoxifenol) (Figura 1) se destaca pela sua elevada e comprovada capacidade flavorizante (MYINT et al, 1996), anti-oxidante (BARCLAY e NORRIS, 1997), anti-espasmódico, antialérgico (LION CORPORATION, 1997) e anti-bactericida, sendo usado principalmente na odontologia como componente de seladores e outros produtos anti-sépticos de higiene (CAI e WU, 1996 e KAPLAN et al, 1999).

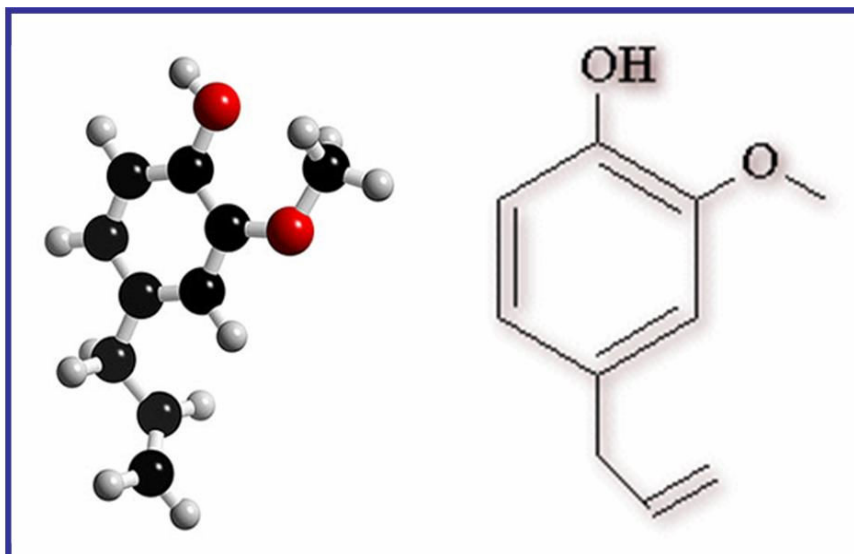


Figura 1. Forma estrutural molecular e planar do eugenol

O eugenol apresenta fórmula molecular ($C_{10}H_{12}O_2$) e cuja massa molar é $164,2\text{gmol}^{-1}$ (MYNT *et al*, 1996). Possui cheiro forte e aromático de cravo e sabor ardente e picante, baixa solubilidade em água, cor levemente amarelada e ponto de ebulição em aproximadamente 273°C .

Atualmente alguns produtos obtidos por sínteses químicas, a partir do eugenol, tais como: o metileugenol e o acetato de eugenila adquiriram elevados valores comerciais, devidos principalmente à utilização desses derivados como princípios ativos nas indústrias agroquímicas, substituindo os atuais defensivos agrícolas, por atrativo de insetos “feromônios” (IWAHASHI *et al*, 1996; WONG e NISHIMOTO, 1989).

Por se tratar de um composto fenólico de origem vegetal, o eugenol possui um grupo quimicamente heterogêneo, com características estruturais semelhante aos álcoois, porém com propriedades ácidas muito mais fortes. Resultados experimentais e teóricos recentes mostram que a maior acidez dos compostos fenólicos provém, principalmente, de distribuição de carga elétrica que faz o oxigênio do grupo hidroxila ($-\text{OH}$) mais positivo; por isso o próton está ligado com menor força. Na realidade, o anel de benzeno do fenol age como se fosse grupo atrator de elétrons, em grau muito maior do que o anel do cicloexano no cicloexanol (SOLOMONS, 1996).

Devido à sua diversidade química, os compostos fenólicos apresentam uma variedade de funções nos vegetais. O eugenol age como composto de defesa contra herbívoros e patógenos. Outros têm função no suporte mecânico, como atrativo de polimerizadores ou

dispersores de frutos, na proteção contra radiação ultravioleta ou reduzindo o crescimento de plantas competidoras adjacentes.

A síntese vegetal de compostos fenólicos compreende duas rotas metabólicas básicas: a rota do ácido chiquímico (Figura 2) e a rota do ácido malônico. A primeira rota participa da biossíntese da maioria dos fenóis vegetais. A segunda, embora seja uma fonte importante de produtos secundários fenólicos em fungos e bactérias, é menos significativa nas plantas superiores. A rota do ácido chiquímico converte precursores de carboidratos derivados da glicose e da rota da pentose fosfato em aminoácidos aromáticos. A formação de muito compostos fenólicos vegetais, incluindo fenilpropanóides simples, cumarinas, derivados do ácido benzóico, lignina, antocianinas, isoflavonas, taninos condensados e outros flavonóides inicia com a fenilalanina (TAIZ e ZEIGER, 2004).

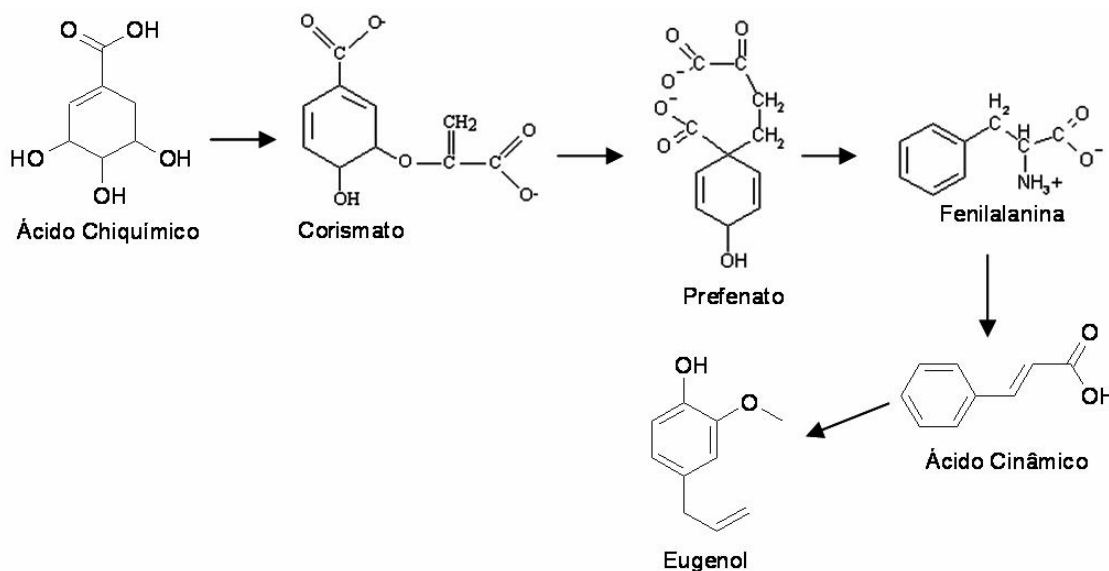


Figura 2. Rota do Ácido Chiquímico para síntese do eugenol

Os compostos fenólicos vegetais se enquadram em diversas categorias: como fenóis simples, ácidos fenólicos derivados de ácidos benzóicos e cinâmico, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas que possuem importantes papéis na defesa vegetal (NACZK e SHAHIDI, 2004). Estes compostos correspondem à classe de metabólitos secundários na qual se encontra a maior parte dos compostos apontados como tendo atividade alelopática, desde fenóis simples até taninos de estrutura complexa (RICE, 1984). Entre os fenóis, poucos apresentam características voláteis, destacando o eugenol, e alguns terpenos (FRIEDMAN e WALLER, 1983). Mazzafera (2003) mostrou, pela

primeira vez, o efeito alelopático de extratos alcoólico de cravo da Índia e eugenol na germinação e crescimento de plantas.

Alguns trabalhos mostraram que eugenol ou extratos de *S. aromaticum* apresentam atividade nematicida (TSAO e YU, 2000; WALKER e MELIN, 1996), inseticida (EL-HAG *et al* 1999), antiviral (YUKAWA *et al.*, 1996), bactericida (DORMAN e DEANS, 2000; OUATTARA *et al.*, 1997) e fungicida (DELESPAUL *et al.*, 2000). Os efeitos bactericida e fungicida do eugenol talvez expliquem porque a pulverização de sementes de cravo com fungicidas não melhora a germinação (MAEDA *et al.*, 1991).

Dentre as diversas classes de substâncias anti-oxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996 e SOARES, 2002).

A atividade anti-oxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias. (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; CHUN, VATEM e SHETTY, 2005)

A utilização de eugenol em medicina dentária data de 1873, quando da utilização de uma pasta de óxido de zinco com eugenol para a aplicação em cavidades com estruturas dentárias cariadas. Uma das suas principais indicações está relacionada com a capacidade analgésica, uma vez que, em baixas concentrações, o eugenol é um bloqueador irreversível da condução nervosa e inibidor da condução sináptica a nível neuromuscular (GOSSEL, 1986).

Nakamura *et al* (1999) investigaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Ocimum gratissimum L.* e observaram que o principal composto responsável pela atividade antimicrobiana contra *S. aureus* foi o fenil-propanoide eugenol.

Garza e Fernández (1998) observaram que o eugenol inibe a síntese de prostaglandinas e, simultaneamente a quimiotaxia dos neutrófilos, com seu efeito antiinflamatório. Tiku, Abraham e Kale (2004), avaliaram o efeito anti-oxidante do eugenol, inibindo a peroxidação lipídica e a formação de radicais superóxidos. Cohen *et al* (2002) demonstraram que o eugenol interfere na polimerização das resinas compostas, não apresentando efeitos sobre os monômeros, mas sim sobre atividade dos radicais livres. Assim, o eugenol altera diferentes propriedades físicas e mecânicas das resinas compostas, tendo efeitos adversos sobre: a

rugosidade da superfície (GRAJOWER, HIRSHFELD e ZALKIND, 1974; LINGARD, DAVIES e FRUNHOFER, 1983); a resistência à tração (REISBICK e BRODSKY, 1971), a dureza (LINGARD, DAVIES e FRAUNHOFER, 1983; PAIGE, HIRSCH e GELB, 1986), a adesão (WAZZAN, HARBI e HAMMAD, 1997). e a estabilidade da cor (PEUTZFELD e ASMUSSEN, 1999).

O eugenol é também usado como matéria-prima para a obtenção de vanilina (COSTA, 2000; PRIEFERT, RABENHORST e STEINBUCHER, 2001), empregada na aromatização de doces, chocolates, sorvetes e tabacos (RIZZINI e MORS, 1983)

Sousa *et al* (2000) avaliaram a influência do eugenol na micro dureza da resina composta utilizando sistemas adesivos atuais, e comprovaram não haver diferenças estatisticamente significantes na micro dureza da resina composta dos grupos estudados.

Alfredo *et al* (2006) estudaram a influência do cimento edodôntico à base do óxido de zinco e eugenol (EndoFill) na adesão de pinos intra-radulares cimentados com cimento resinoso (Enforce) ou cimento fosfato de zinco, e concluíram que o cimento a base de eugenol efetuou corretamente suas propriedades adesivas, porém apresentou menor retenção em comparação ao fosfato de zinco.

Sabaa e Mohamed (2007) testaram o uso de eugenol isolado ou misturado a produtos comerciais como estabilizante térmico para PVC, e obtiveram absoluto sucesso, propondo um mecanismo para a ação estabilizadora.

Polzin *et al* (2007) mediram teores de eugenol, trans-anethole (anetol), e cumarina, em fumaça de 33 marcas de cigarro a base de cravo da Índia, comercializados na Indonésia, usaram o espectrômetro de massa de alta resolução, e verificaram que todas possuíam quantidades elevadas de eugenol, 13 continham anetol, e 19 continham cumarina.

O eugenol representa cerca de 80 % dos componentes presentes no óleo essencial do cravo-da-Índia (BROWN e MORRA, 1995; BROWN *et al.*, 1991; ORTIZ, 1992), nas folhas verdes, chega à 95 % (RAINA *et al*, 2001). Outros componentes dessa fração são: acetato de eugenol (15 %) e β -cariofileno (5 a 12 %), que juntos com eugenol somam 99 % do óleo essencial. Sua obtenção comercial é feita principalmente a partir do cravo, e a caracterização e quantificação dos teores de eugenol e demais componentes são realizadas por técnicas cromatográficas, o que encarece o produto final devido ao custo dos ensaios para sua determinação.

2.4 Aspectos gerais sobre Voltametria

As técnicas eletroquímicas, por sua vez, têm sido consideradas uma ferramenta bastante poderosa para determinações de diversas substâncias, devido à possibilidade de utilização de instrumentos portáteis, com baixo consumo de energia, com análises rápidas em diferentes matrizes. (BROWN e EATON, 2001).

Em todas as técnicas voltamétricas, os experimentos básicos consistem na aplicação de uma perturbação de potencial, após a qual a corrente resultante é avaliada. Desta maneira, os parâmetros fundamentais são: potencial, corrente e tempo. As várias técnicas existentes distinguem-se, basicamente, no modo como a variação de potencial é aplicada, sendo este determinante para a sensibilidade das análises (WANG, 1994).

Segundo HARRIS (2005), a Voltametria é um conjunto de técnicas onde se observa uma relação entre o potencial e a corrente, durante um processo eletroquímico. Este processo ocorre em uma célula eletrolítica posteriormente submetida a uma varredura de potencial. A célula é composta de um eletrodo de referência (calomelano saturado ou eletrodo de prata / cloreto de prata), um auxiliar geralmente representado por um fio de prata e outro polarizável conhecido como eletrodo de trabalho, geralmente construído de um material inerte onde a espécie eletroativa de interesse sofre eletrólise (VOGEL, 1992).

Os eletrodos são imersos na solução da espécie eletroativa diluída em um meio contendo um excesso de eletrólito inerte, conhecido como eletrólito de suporte, a função deste é reduzir a resistência do meio, e eliminar a contribuição da corrente de migração. Os três eletrodos são ligados a um Potenciostato, que gera a rampa de potencial, lê a corrente de interesse e fornece o sinal correspondente à leitura a um dispositivo de registro que origina uma curva corrente-potencial chamada voltamograma (VOGEL, 1992).

Os picos voltamétricos fornecem uma informação qualitativa, que é o valor do potencial de pico (E_p), e uma informação quantitativa, que é a corrente de pico (I_p). Para construção da curva analítica normalmente utiliza-se os valores das correntes de pico versus as concentrações das espécies eletroativas correspondentes a eles. Alternativa que pode ser utilizada é a área sob o pico versus a concentração. Esta situação gera melhores resultados quando se altera a forma do pico de uma medida para outra, causando alteração na altura, porém a medida da área permanece constante. Não há uma regra definida para escolha, neste trabalho optamos pela construção da curva, usando valores correspondentes a corrente de pico versus concentração do analito (LACATELLI, 2004).

O eletrodo de trabalho, também conhecido como eletrodo indicador pode ser de mercúrio, platina, ouro e outros, podem ser de vários tamanhos ou formas, estacionários ou rotatórios. Neste trabalho, optamos por fazer uso do eletrodo de carbono vítreo, pois os eletrodos gotejantes convencionais não podem ser usados para os potenciais suficientemente positivos necessários para oxidar a maioria dos compostos orgânicos, pois a oxidação do mercúrio ocorre em um potencial próximo a oxidação do fenol podendo interferir no sinal analítico (GAYLOR, ELVING e CONRAD, 1953).

2.4.1 Considerações sobre eletrodos

No trabalho ora proposto utilizou-se eletrodo de carbono vítreo. O material deste eletrodo, geralmente é formado por meio de aquecimento de uma resina polimérica (fenol-formaldeído) em uma atmosfera inerte. A substância polimérica não deve passar pelo estado líquido antes da carbonização, uma vez que é neste processo que o oxigênio, nitrogênio e outros, são removidos nas temperaturas entre 300 e 500 °C. Na temperatura de 500 a 1200 °C o hidrogênio é gradualmente eliminado permanecendo somente carbono. A estrutura final do carbono vítreo é formada por uma faixa de moléculas aromáticas orientadas ocasionalmente, quando acima de 1200 °C produzem películas perfeitamente lisas que sobrepostas umas das outras, formam microfibras. Essas microfibras sendo entrelaçadas, dobradas e torcidas produzem o carbono vítreo como produto final (VAN DER LINDER e DIEKER, 1980). Este eletrodo foi aplicado pela primeira vez na química eletro-analítica por Zittel e Miller (1965), onde mostraram que o limite do potencial utilizável estende-se a valores mais positivos comparados com a platina, podendo também ser usado em alcance catódico mesmo em soluções acidificadas.

O eletrodo de referência geralmente usado é o eletrodo de Prata em solução de Cloreto de Prata (Ag/AgCl), este responde por cerca de 80% dos problemas nas medições potenciométricas (GALSTER, 1991). Nos sistemas voltamétricos, eletrodos de referência defeituosos podem acarretar desde voltamogramas irregulares, até a completa destruição da superfície do eletrodo de trabalho quando, sem o valor de referência garantido durante a varredura, os potenciais fornecidos pelo potenciostato tornam-se desgovernadamente altos. Como a única função do eletrodo de referência, em qualquer sistema eletroquímico, é a de fornecer um potencial elétrico fixo e definido, o parâmetro principal posto à prova será justamente o potencial de referência do eletrodo (SILVA, ARAUJO e SILVA, 2000).

O eletrodo auxiliar ou contra eletrodo, mais comum é o de platina, metal relativamente inerte, que não participa da maioria das reações químicas. Sua função é simplesmente permitir a passagem de elétrons para uma espécie em solução (HARRIS, 2005).

2.4.2 O eletrólito suporte

Em sistemas eletroquímicos, o eletrólito suporte é um componente que quando adicionado em altas concentrações pode conferir a solução e a interface em estudo uma série de propriedades. Tais propriedades, em geral, são resultantes da manutenção da força iônica constante da solução o que simplifica a análise dos sistemas eletroquímicos (AGOSTINHO *et al*, 2004).

Dentre as principais funções dos eletrólitos suporte, destaca-se a tarefa de manter os coeficientes de atividade praticamente constante, assim como a viscosidade, coeficiente de difusão e número médio de ligantes, além de diminuir a espessura da dupla camada elétrica, possuir alta solubilidade e grau de ionização (AGOSTINHO *et al*, 2004).

A estabilidade química dos eletrólitos de suporte refere-se a suas espécies químicas que não reagem com outras espécies presentes em solução, sejam elas eletroativas ou não. A estabilidade eletroquímica implica em admitir que o eletrólito não seja oxidado nem reduzido eletroliticamente em toda faixa de potencial de interesse a que as interfaces em estudo forem submetidas (AGOSTINHO *et al*, 2004).

2.4.3 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é técnica versátil de varredura de potencial que tem sido amplamente utilizada para obter informações sobre reações eletroquímicas a partir do registro de curvas corrente-potencial. Esta técnica consiste em aplicação de potencial que varia continuamente com o tempo. Este processo resulta, assim, no registro das reações eletroquímicas existentes. A voltametria cíclica possibilita a determinação do potencial redox de espécies eletroativas, a elucidação da cinética das reações de eletrodo e a avaliação da influência do meio de reação sobre o processo redox (SERRANO e GIL, 2005; HARRIS, 2005; WANG, 2000; BRETT e BRETT, 1993). Nesta técnica, a corrente produzida durante o processo eletroquímico é obtida a partir da aplicação de uma onda ou rampa triangular de potencial ao eletrodo de trabalho, sempre mantido no estado estacionário (BRETT e BRETT, 1993; BARD e FALKER, 1980). A varredura é iniciada em um dado valor de potencial

denominado de potencial inicial (E_i). A escolha do potencial inicial é realizada em função da ausência de corrente faradaica (corrente devida a oxidação ou redução do composto), ou seja, em determinado potencial onde não é detectada ou produzida variação na estrutura do composto estudado. A partir da escolha de E_i , o potencial é variado no sentido positivo ou negativo até um determinado valor, denominado de potencial de inversão de varredura, E , onde, após este ponto, a varredura é invertida até atingir o potencial de partida. Desse modo, uma corrente de oxidação ou redução é produzida e registrada como função do potencial aplicado, tanto na varredura direta quanto na varredura reversa, em uma ilustração denominada voltamograma cíclico. (HARRIS, 2005; WANG, 2000; BRETT e BRETT, 1993).

O potencial de estímulo em voltametria cíclica é um potencial com variações lineares em uma forma de onda triangular. Um voltamograma cíclico é obtido usando a medida de corrente no eletrodo de trabalho durante a variação do potencial. A corrente pode ser considerada o sinal de resposta ao estímulo (KISSINGER e HEINEMAN, 1983).

A forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica está representada figura 3, o potencial é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho estacionário, em uma solução sem agitação, usando um potencial em forma de triângulo (Figura 3A).

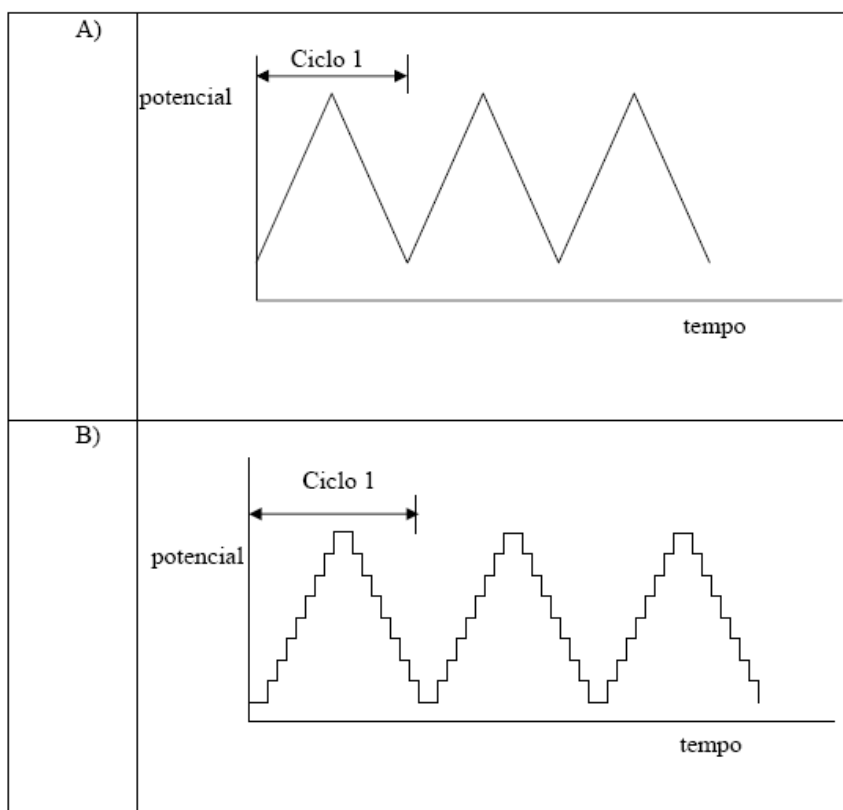


Figura 3. Formas de aplicação do potencial para a voltametria cíclica: A) potencial com varredura linear e B) potencial do tipo escada (ALEIXO, 1994).

Dependendo da informação desejada, simples ou múltiplos ciclos podem ser utilizados. Durante a varredura do potencial, o potenciostato mede a corrente resultante desta corrente versus o potencial aplicado. Em alguns casos, instrumentos digitais não possuem este mesmo padrão de aplicação de potencial. Porém, o potencial é aplicado na forma de escada como pode ser visto na figura 3B, com degraus de potenciais pequenos da ordem de 10 mV e tempo de duração pequena (50 ms), onde a corrente é lida apenas no final deste intervalo. Esse método substitui a contento a varredura linear. O objetivo desta variação é conseguir uma minimização da contribuição da corrente capacitiva na corrente total. Como as etapas de potencial são pequenas, as equações para as respostas da voltametria cíclica são consideradas como idênticas das provenientes da voltametria cíclica de varredura linear.

A voltametria cíclica é aplicada a sistemas em repouso para garantir que a espécie de interesse chegue à superfície do eletrodo por meio de processo exclusivamente difusional (BRETT e BRETT, 1993; BARD e FALKNER, 1980), com exceção de espécies que são oxidadas ou reduzidas a partir do estado adsorvido. Deste modo, a partir da difusão das espécies eletroativas, ocorre a geração de uma camada de difusão na interface eletrodo-solução, o que permite a interação destas espécies com a superfície do eletrodo de trabalho e a sua detecção, no instante em que se realiza o experimento. Neste contexto, observa-se que a resposta obtida para determinados processos redox, caracterizado pela detecção de picos catódicos e/ou anódicos, depende da concentração da espécie eletroativa em solução (HARRIS, 2005; BRETT e BRETT, 1993).

Adicionalmente, a voltametria cíclica é também utilizada para estudar a reversibilidade do processo eletródico, ou seja, se o processo é reversível, quase-reversível ou irreversível, e avaliar a influência do meio reacional sobre estes parâmetros, bem como sobre a ocorrência e estabilidade dos radicais e intermediários formados pela redução de espécies eletroativas como os nitrocompostos (HARRIS, 2005; SQUELLA *et al*, 1996; BRETT e BRETT, 1993; MORALES *et al*, 1987). Porém a voltametria cíclica não é uma técnica mais recomendável para determinações analíticas, devido a menor sensibilidade em comparação a outras técnicas voltamétricas, sendo facilmente superada pela voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada. Apesar disso, o ponto forte da voltametria cíclica é a sua grande versatilidade para a elucidação de processos de eletrodos e mecanismos de reação (Brett e Brett, 1993; OLMSTEAD *et al*, 1969).

2.4.4 Voltametria de Pulso diferencial

Nesta técnica, os pulsos de igual amplitude são aplicados sobre uma rampa linear de potencial, a corrente é medida antes de o pulso ser aplicado e no final do pulso. As correntes são subtraídas, já que a primeira é a contribuição da corrente capacitiva e a segunda é a contribuição da corrente faradaica e, então, graficadas contra o potencial da rampa linear, gerando um voltamograma de pulso diferencial, com a forma de uma curva gaussiana. Esta técnica é mais sensível que a de pulso normal, isto porque ela possibilita a minimização da contribuição da corrente capacitiva no sinal obtido, pois a corrente capacitiva não depende da concentração da espécie em estudo (SOUSA, 2003).

A relação entre a corrente de difusão (que é uma corrente do tipo faradaica, isto é, uma corrente produzida por uma reação eletrodica) e a concentração da espécie eletroativa em solução é dada pela equação de Ilkovic:

$$I_d = 607nD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}C \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde:

i_d = corrente de difusão (μA)

n = quantidade de matéria (antigamente conhecido como “número de moles”) de elétrons por mol de substância

m = velocidade da vazão de mercúrio obtido a partir do capilar de vidro (mg/s)

t = tempo de gota (s)

C = concentração em mmol L^{-1}

D = coeficiente de difusão

Além da difusão, como comentado acima, mais dois processos de transferência de massa envolvendo a solução e a superfície do eletrodo pode ocorrer. Um desses processos é a migração de partículas carregadas em um campo elétrico. O outro é a convecção, um processo mecânico que ocorre devido à movimentação da solução, que ocorre quando se usa um agitador magnético e uma barra magnética. O processo de migração em um campo elétrico é minimizado pela adição de um eletrólito inerte (eletrólito de suporte) O processo de convecção é eliminado mantendo-se a solução em repouso durante a etapa de equilíbrio, sem agitação. Assim, apenas o processo de difusão será responsável pelo transporte de massa, e a

corrente medida, i_d , pode ser efetivamente expressa como corrente de difusão (ALEIXO, 1994).

Um degrau de potencial ou de corrente aplicado representa uma instantânea alteração no sistema eletroquímico. Análises da evolução do sistema depois desta perturbação permitem deduções sobre reações no eletrodo e suas velocidades. Degraus de potencial e de corrente fornecem informações complementares, pois considerando a mudança de potencial, há um breve pico de corrente capacitiva e considerando parte da corrente aplicada, o valor que vai provavelmente variar com o tempo é sempre usado para carregar a dupla camada como a mudança de potencial. Outro importante ponto é o efeito da convecção natural em eletrodos macroscópicos que começa a ser sentido de 20 a 300 segundos depois do início do experimento (BRETT e BRETT, 1993).

A resolução da técnica de voltametria por pulso diferencial é melhor que a técnica de voltametria cíclica em relação à seletividade. Na voltametria cíclica, para se determinar duas substâncias eletroativas simultaneamente elas precisam apresentar uma diferença de potencial de meia onda de pelo menos 200 mV. Já na voltametria de pulso diferencial uma diferença entre os potenciais de pico (E_p) de apenas 50 a 100 mV poderá ser suficiente para a determinação simultânea.(CARDOSO, 2007)

A principal vantagem da voltametria de pulso diferencial é o baixo limite de detecção que pode ser alcançado, numa concentração do analito entre 10^{-7} e 10^{-8} mol.L. Outra vantagem é a curva em forma de pico, que oferece maior segurança na medida e na localização do potencial de pico. As desvantagens dessa técnica é que os experimentos realizados não são tão rápidos (com duração de minutos) quantos os feitos a partir da voltametria de onda quadrada (SWV, com duração de segundos), que apresenta sensibilidade um pouco maior. Outro ponto é que a sensibilidade de voltametria por pulso diferencial é menor que a sensibilidade obtida por técnicas de pré-concentração, que é capaz de detectar concentrações de até 10^{-12} mol/L (BUFFLE e TEECIER-WAEBER, 2005).

A técnica de Voltametria de Pulso Diferencial ocorre basicamente em três etapas (Figura 4).

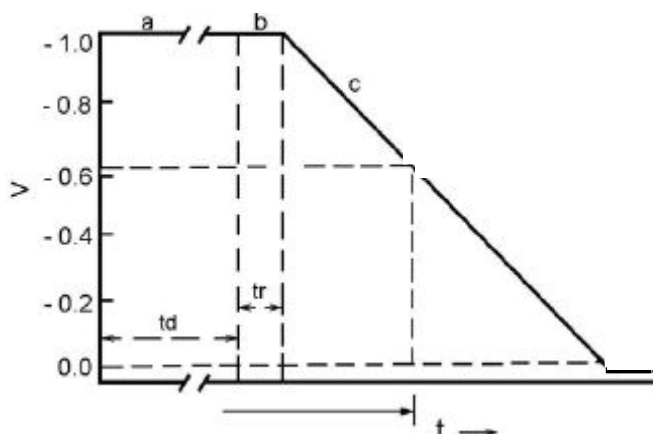


Figura 4. Exemplos das etapas envolvidas na voltametria de redissolução anódica. (a) programação E vs t mostrando o tempo de deposição (T_d); e potenciais de deposição E_d , (b) Tempo de repouso (T_r). (c) Etapa de redissolução (ALEIXO, 1994).

Na primeira etapa (a), a deposição é feita eletroliticamente aplicando-se o potencial de deposição (E_d) durante um determinado tempo e com agitação da solução. O tempo de deposição (t_d) é escolhido em função da espécie eletroativa. A agitação faz com que o transporte de massa por convecção mantenha a concentração da espécie eletroativa junto à superfície do eletrodo igual à do resto da solução. Nesta etapa, ocorrerá então a redução do metal e conseqüentemente a sua deposição sobre a superfície do eletrodo

Após completar-se a etapa de deposição, a agitação cessa e durante alguns segundos deixa-se a solução em repouso, para que a concentração do material depositado homogeneíze-se, entrando em equilíbrio na superfície do eletrodo (b). O tempo correspondente a esta etapa de equilíbrio é chamado de tempo de repouso (t_r)

Na terceira etapa (c), ocorre a redissolução. Nesta etapa faz-se a varredura de potencial na direção anódica onde o voltamograma será registrado, obtendo-se o sinal analítico de acordo com a técnica voltamétrica escolhida (pulso diferencial ou onda quadrada, por exemplo). Os elementos de interesse depositados se redissolverão quando os seus potenciais de pico forem atingidos.

2.4.5 Determinação voltamétrica de compostos fenólicos

Alguns compostos orgânicos, tais como os fenóis, passivam a superfície dos eletrodos durante a eletro-oxidação promovendo o decréscimo de sua atividade, causada pela formação

de um filme impermeável e não reativo sobre a superfície eletródica (GRATTRELL e KIRK, 1992).

O mecanismo de formação do polímero envolve o acoplamento de radicais fenóis eletrogerados, sendo um processo complexo que envolve várias etapas. Os caminhos reacionais são afetados por fatores tais como: concentração de fenol, material eletródico, pH, potencial e outros (FERREIRA, GIZ e FILHO, 2000; SAFAVI *et al*, 2007).

Os principais compostos resultantes da oxidação do fenol em meio ácido são benzoquinona e hidroquinona, seguidos por ácidos orgânicos alifáticos (COMNINELLIS & PULGARIN, 1991).

Julian e Ruby (1950) determinaram potenciais de meia onda de sistemas oxidados irreversivelmente usando microeletrodos de platina, e assim reconheceram uma nova técnica aplicável ao estudo da oxidação de fenol.

Hendenburg e Freiser (1953) estudaram pela primeira vez a aplicabilidade da voltametria anódica para compostos fenólicos, indicando que a reprodutibilidade do potencial de meia onda depende do pH.

Pantoja (2000) verificou o comportamento de eletrodos de polianilina frente a eletroxidação de eugenol e guaiacol, e observaram a desativação dos eletrodos devido a formação de filme fenólico não condutor. A formação desse filme foi caracterizada pelo contínuo decréscimo da densidade de corrente do pico de oxidação.

Bidoia e Notoya (2004) estudaram a eletro-oxidação de compostos fenólicos presentes em efluentes industriais, tornando os fenóis tóxicos mais susceptíveis aos sistemas biológicos. A eletro-oxidação promovida pelo tratamento eletrolítico possibilitou a remoção de 30 % do fenol em 1 hora de aplicação, comprovando a viabilidade do método.

Sousa *et al* (2003) verificaram as diferenças no perfil voltamétrico de dois flavonóides, a Quercitina, e a rutina. Esses flavonóides são compostos fenólicos naturais que atuam como seqüestradores de radicais livres por meio de reações de transferência de elétrons, inibindo, portanto a peroxidação lipídica. Por meio destes estudos concluíram que o mecanismo de eletro-oxidação e a estabilidade dos produtos formados dependem do substituinte no carbono que diferencia as duas estruturas, e no qual é responsável pela reação posterior a formação da orto-quinona.

Giacomelli *et al* (2003) traçaram o perfil voltamétrico do eugenol e bis-eugenol, e propuseram um mecanismo de oxidação, envolvendo a formação da quinona (2-metoxi-4-alildieno-2,5-ciclohexadien-1-ona), que reage formando o bis-eugenol, na seqüência ocorre

sua oxidação, formando uma espécie de mono-quinonóide. O perfil voltamétrico para os compostos eugenol e bis-eugenol, é diferente e indica que o mecanismo de oxidação e a estabilidade dos produtos formados são distintos.

Timbola *et al* (2006) estudaram o comportamento eletroquímico da quercetina em meio hidro-alcoólico na faixa de pH de 2,2 a 9,2 usando voltametria cíclica, e propuseram um esquema reacional envolvendo as etapas eletroquímicas e químicas para a eletroxidação da quercetina.

Francisco *et al* (2007) estudaram o perfil de eletro-oxidação de compostos fenólicos usando as técnicas de voltametria cíclica e cronoamperometria, com eletrodo de pasta de carbono modificada com combinações de Ni(II) e $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, obtiveram respostas operacional com boa sensibilidade analítica para o Hidroquinona e a 4-aminofenol.

Gonçalves (1993) investigou a oxidação eletroquímica de orto- e meta- aminofenol e metoxianilina em meio ácido, mostrando diferentes propriedades com a mudança do substituinte no anel aromático da anilina.

2.5 Validação da metodologia analítica

A validação de métodos analíticos comprova por meio de evidências objetivas que requisitos para uma determinada aplicação ou uso específico são atendidos (INMETRO, 2003). Pode ser definido como o processo que confere validade a um método analítico, instrumento ou equipamento, cujas especificações são aceitas como corretas, conferindo confiabilidade aos resultados obtidos (LEITE, 1996 e EURACHEM, 2002).

A validação de um resultado significa que o procedimento, que inclui desde as condições de operação do equipamento até toda a seqüência analítica, seja aceito como correto. Para isso, estabelecem-se níveis de exigência que podem definir a aprovação do produto ou espécie em estudo. Para tanto, é fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar que os métodos utilizados conduzem a resultados confiáveis, que garantam qualidade, idoneidade e credibilidade de seus produtos e/ou serviços. É importante enfatizar que qualquer alteração de métodos normalizados implica em revalidar o método (LEITE, 1996).

Segundo a EURACHEM (2003), são feitas milhões de medidas analíticas diariamente em milhares de laboratórios em todo o mundo. Entretanto, o custo de realização dessas medições é alto, e custos adicionais decorrem das decisões feitas em cima desses resultados.

Fica claro, portanto, a importância de se obter resultados corretos e de ser capaz de mostrar que os mesmos estão corretos.

A calibração, em geral, é uma operação que relaciona uma grandeza de saída com uma grandeza de entrada, para um sistema de medida sob determinadas condições. No processo de medição química, as grandezas de entrada são grandezas analíticas que caracterizam os tipos de analitos (espécies químicas de interesse), e suas quantidades ou concentrações. As grandezas de saída são representadas por valores medidos, isto é, sinais observados em posições e intensidades definidas. O caso mais comum, no qual se determina uma relação entre a quantidade ou concentração (conteúdo) de certo analito e a intensidade de um sinal, é apenas um caso especial de calibração (BARROS, PIMENTEL e ARAUJO, 2002).

Em um sentido mais amplo, a calibração em Química Analítica se refere à relação entre uma função analítica, $x = f(q)$, que representa um perfil de distribuição de analitos e suas quantidades ou concentrações em uma dada amostra-teste, e uma função medida $y = g(z)$, que pode ser representada por um espectro, voltamograma, cromatograma e outros (DANZER, 1995 citado em BARROS, PIMENTEL e ARAUJO, 2002).

A validação de um método estabelece por meio de estudos laboratoriais que suas características de desempenho estão de acordo com as especificações apresentadas para a intenção do uso dos resultados analíticos.

Segundo o manual de orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos do INMETRO (2003), as características de desempenho determinadas incluem entre outras: linearidade, faixa de trabalho, seletividade, recuperação, limite de detecção do método (LDM), limite de quantificação do método (LQM), precisão e exatidão.

Depois de ter determinado todos esses parâmetros, o método deve contê-los de forma clara, para que o usuário possa avaliar se o método é adequado para as suas necessidades (INMETRO, 2003).

2.5.1 Faixa de linearidade

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração (ICH, 1995). A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna

ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = coeficiente angular (inclinação da curva de calibração ou curva analítica = sensibilidade);

b = coeficiente linear (interseção com o eixo y , quando $x=0$).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

O coeficiente de correlação linear (r) é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é, usualmente, requerido. O método pode ser considerado como livre de tendências se o corredor de confiança da reta de regressão linear contiver a origem (INMETRO, 2003).

- a) $r = 1$, correlação perfeita;
- b) $0,91 < R^2 < 0,99$, correlação fortíssima;
- c) $0,61 < R^2 < 0,91$, correlação forte;
- d) $0,31 < R^2 < 0,60$, correlação média;
- e) $0,01 < R^2 < 0,30$, correlação fraca;
- f) $r = \text{zero}$, correlação nula.

A linearidade da curva analítica e, portanto, o intervalo de trabalho do método, é determinado pelo coeficiente de correlação da reta obtida, denominado índice de correlação de Pearson (RIEDER et. al., 2000), considerando:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad \text{(Equação 3)}$$

onde x_1, x_2, \dots, x_n e y_1, y_2, \dots, y_n são os valores medidos de ambas as variáveis. Além disso:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{(Equação 4)}$$

e

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i \quad \text{(Equação 5)}$$

são as médias aritméticas de ambas as variáveis.

2.5.2 Faixa de trabalho

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (INMETRO, 2003).

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho.

2.5.3 Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição pelo detector selecionado, sem causar um sinal visível no teste de especificidade. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Vários testes e suas estatísticas correspondentes podem ser utilizados para o estudo da seletividade dependendo da disponibilidade do analito, da matriz

sem o analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse. Se a matriz da amostra sem analito ou um grupo satisfatório de amostras de referência estão disponíveis, podem ser aplicados os testes F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e o teste t (*Student*) de comparação de médias, ou então realizada a análise dos desvios em relação aos valores de referência (INMETRO, 2003).

2.5.4 Teste de recuperação

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas. A recuperação é calculada segundo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_2} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 6)}$$

Onde:

C_1 = Concentração obtida experimentalmente

C_2 = Concentração aceita como verdadeira

2.5.5 Limite de detecção

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.

A importância desta determinação e os problemas associados a ela advêm do fato de que a probabilidade de detecção não muda rapidamente de zero para um quando seu limiar é ultrapassado. Os problemas têm sido investigados estatisticamente e diversos critérios de decisão têm sido propostos. Muitas controvérsias são originadas devido ao fato de não haver atualmente uma concordância da terminologia aplicável. O termo “limite de detecção” não é aceito por todos, apesar de ser usado em alguns documentos setoriais (INMETRO, 2003).

$$LDM = t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot S_2 \quad \text{(Equação 7)}$$

onde:

LDM = Limite de detecção do método;

$t_{(n-1, 1-\alpha)}$ = valor da abscissa t (Student) para $(1-\alpha)$ x95% nível de confiança e $(n-1)$ graus de liberdade;

S_2 = Desvio padrão da curva / Inclinação

2.5.6 Limite de Quantificação

O limite de quantificação representa a mais baixa concentração da substância em exame, que pode ser determinada de forma quantitativa com precisão e exatidão adequadas utilizando o procedimento experimental em estudo. O limite de quantificação inferior é estabelecido a partir de uma relação de valores (desvio padrão e inclinação) obtidos na curva analítica no estudo da linearidade. Para o estudo do limite de quantificação do método (LQM) são analisadas soluções matrizes com baixas concentrações de substância, determinando-se a concentração mínima que pode ser quantificada com precisão e exatidão. O limite de quantificação pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor de 10 desvios-padrão ou da média do branco. Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e a precisão obtidas são satisfatórias (INMETRO, 2003).

A determinação do valor do LQM representa um compromisso entre os parâmetros de exatidão e precisão a serem conseguidos, em que quanto menor o nível de concentração dos analitos maior será a variação dos resultados, tornando o método menos preciso (HARRIS, 2005).

$$LQM = 10.S_2 \quad \text{(Equação 8)}$$

2.5.7 Precisão do método

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. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e reprodutibilidade.

2.5.7.1 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 (VIM, 2007), a seguir:

- Mesmo procedimento de medição;

- Mesmo observador;
- Mesmo instrumento usado sob mesmas condições;
- Mesmo local, e
- Repetições em curto espaço de tempo.

2.5.7.2 Reprodutibilidade

É o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição. Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial (INMETRO, 2003).

Segundo Leite (2002), nos processos de validação de métodos analíticos, os resultados encontrados devem ser emitidos com a certeza absoluta de ser as espécies em estudo (qualitativo) e com a máxima certeza do (quantitativo) existente na amostra analisada. Neles, a precisão e exatidão devem estar embutidas com os resultados emitidos com a menor variabilidade possíveis, determinadas por conceitos estatísticos em um determinado número de amostras analisadas.

O índice z (z score) é também um modo de avaliar o desempenho dos resultados de reprodutibilidade. A avaliação foi feita obedecendo à norma (ISO GUIA 43) usando a seguinte escala de pontuação:

$|z| \leq 2$ = satisfatório;

$2 < |z| \leq 3$ = questionável;

$|z| > 3$ = insatisfatório.

2.5.8 Exatidão

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).

Na avaliação da exatidão utilizando um material de referência, os valores obtidos pelo laboratório (média e desvio padrão) de uma série de ensaios em replicata devem ser comparados com os valores certificados do material de referência. Uma forma de avaliar a exatidão do método é o uso do cálculo do erro relativo (ER), expresso em percentagem, usando a expressão:

$$ER = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \cdot 100 \text{ (Equação 9)}$$

Onde:

X_{lab} = valor obtido experimentalmente ou média aritmética de valores obtidos

X_v = valor aceito como verdadeiro (valor certificado do MRC)

CAPITULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e materiais

3.1.1 Obtenção dos óleos essenciais

A extração dos óleos essenciais foi realizada no LAPQA – Laboratório de Análise e Pesquisas em Química Analítica de Petróleo, localizado no Pavilhão Tecnológico, onde foram utilizados balões de destilação PYREX de 1000 e 6000 mL, manta aquecedora (Químis), Destilador adaptado de Clevenger e reagente Na₂SO₄ anidro (Merck) usado para secagem do óleo essencial após a extração.

3.1.2 Determinações Voltamétricas

Os estudos eletro-analíticos foram realizados no LPQA – Laboratório de Pesquisas em Química Analítica, localizado no Centro de Ciências Exatas e Tecnologia (UFMA).

Foi usado para leitura das amostras, um potenciostato BAS modelo. (CV50W), acoplado a microcomputador, célula eletroquímica de 10mL e 3 (três) compartimentos, contendo eletrodo de trabalho (Carbono Vítreo $\varnothing=0,06\text{ cm}^2$), eletrodo referência Prata em solução de Cloreto de Prata(Ag / AgCl) e eletrodo auxiliar (Platina). O eletrólito suporte usado foi a solução hidroalcoólica Tampão Britton-Robinson (BR) corrigida para pH 3,3 usando solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) na concentração de $0,1\text{ molL}^{-1}$, preparada a partir de reagente de pureza (84,5 %,Merck), as leituras de pH foram efetuadas em pH-metro Methron.

Para possibilitar a completa solubilidade do óleo essencial e padrão de eugenol na solução tampão, foi usado mistura 55% de reagente álcool etílico de pureza (99,9 %, Merck)

A curva analítica foi construída a partir de adições sucessivas de padrão de eugenol com pureza de 98 %, fornecida pelo laboratório CHEM SERVICE;

3.2 Procedimentos experimentais

3.2.1 Coleta e caracterização botânica

As folhas verdes e galhos da espécie vegetal em estudo foram coletados nos meses de janeiro e fevereiro do ano de 2007 (escolha aleatória) na localidade de Maioba, município de Paço do Lumiar – Maranhão. Para preparo das exsiccatas, as folhas e galhos coletados foram

tratados, prensados e secos individualmente acondicionados em folhas de jornal. A temperatura aplicada para secagem foi de aproximadamente 38 °C por um período de 24 horas, em seguida as exsiccatas foram enviadas ao Herbário da Universidade Federal do Maranhão, que efetuou a caracterização Botânica da espécie com base nas características físicas do material coletado.

3.2.2 Processo de extração do óleo essencial

Os óleos essenciais foram extraídos a partir das folhas verdes, previamente trituradas e posteriormente submetidas ao processo de hidrodestilação (Figura 5a e 5b), usando o destilador adaptado de Clevenger (CLEVINGER, 1928). Seu princípio consiste em submergir o material vegetal diretamente na água, onde após a ebulição os compostos voláteis existentes são carregados até o condensador, resfriados e separados na água por diferença de densidade. A água que sobra deste processo recebe o nome de água floral, destilado, hidrosol ou de hidrolato.

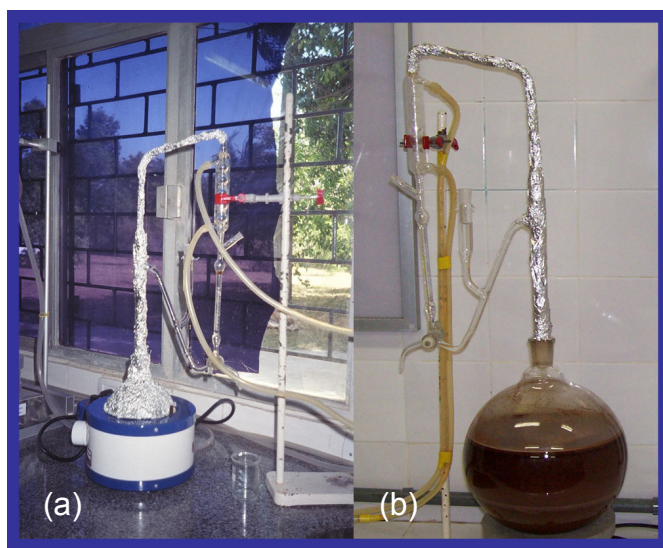


Figura 5. Destilador adaptado de Clevenger para extração de óleos essenciais, (a) sistema com capacidade de 1000 mL, (b) sistema com capacidade de 6000 mL

O tempo de destilação foi fixado em aproximadamente 2 horas após do início da ebulição, a proporção considerada para destilação foi de (1:10), uma parte do vegetal para 10 partes de água, com o rendimento médio de aproximadamente 0,8%. Não foram realizados estudos cinéticos no processo de extração dos óleos, estes foram armazenados em recipientes de vidro protegidos da luz e guardados sob refrigeração.

3.2.3 Preparo das amostras

A solução tampão BR foi preparada a partir das soluções de ácido Bórico (H_3BO_3) $0,04 \text{ molL}^{-1}$, ácido Fosfórico (H_3PO_4) $0,04 \text{ molL}^{-1}$ e Perclorato de Sódio ($\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) $0,1 \text{ molL}^{-1}$.

Devido a baixa solubilidade dos compostos fenólicos, as amostras de óleos essenciais e padrão de eugenol foram solubilizadas em mistura contendo tampão BR com 55 % de álcool etílico. A solubilidade das amostras no eletrólito foi determinada a partir de acréscimo em misturas de álcool e tampão BR, até sua completa solubilização. Para preparo da solução padrão de eugenol (solução estoque), foram utilizados $10 \mu\text{L}$ do padrão em balão de 10 mL , aferido com uso do tampão BR com 55 % de álcool etílico resultando em uma concentração de $8,89 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$. A solução contendo o óleo essencial foi preparada seguindo os mesmos critérios de diluições.

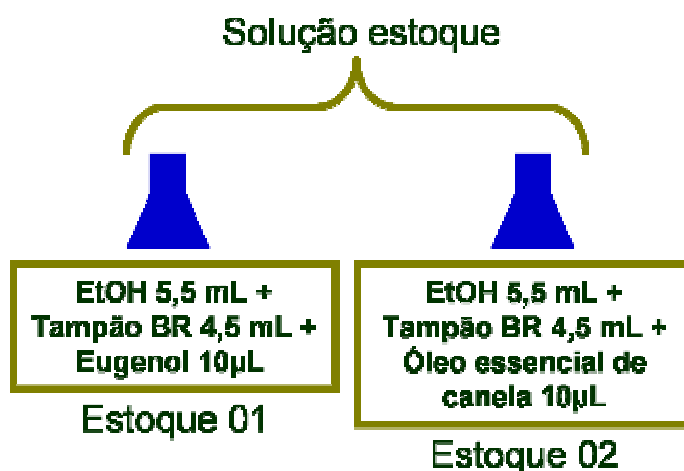


Figura 6 Preparação das soluções estoques

3.2.4 Condições de análise

A superfície do eletrodo de trabalho foi renovada a cada leitura, devido à aderência dos compostos fenólicos à superfície, formando filmes de difícil remoção. A limpeza foi padronizada com a lavagem em água destilada e efetuando movimentos circulares sobre o papel de seda contendo o óxido de alumínio (partícula $0,3 \mu\text{m}$) por aproximadamente três “minutos”.

Devido à faixa de potencial adequado a eletro-oxidação do eugenol compreender valores positivos (região anódica), e a suposta perda de voláteis ocorrida com a

desoxigenação da célula, optou-se por usar agitador em vez de gás de purga, pois a remoção do oxigênio se faz desnecessária neste intervalo de potencial.

A mistura contendo óleo essencial ou padrão de eugenol, álcool etílico e tampão BR foi agitada por cinco minutos antes do início da etapa de pré-concentração. O potencial de deposição sofreu deslocamento significativo quando da não homogeneização completa da mistura.

CAPITULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultado da caracterização Botânica

A espécie vegetal foi identificada pela prof^a Ana Zélia Silva, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). De acordo com a caracterização Botânica, a espécie de canela estudada, pertencente à família das Lauráceas, cujo nome científico é *Cinnamomum Zeylamicum Breyn*, conforme características das folhas e galhos da espécie. A excicata encontra-se depositada no Herbário da UFMA sob o nº 1153.

4.2 Otimização do procedimento eletro analítico para determinação de Eugenol

4.2.1 Estudo do potencial de oxidação

A determinação dos potenciais de oxidação e redução dos compostos fenólicos e o intervalo de varredura de potencial foram determinados a partir da técnica de Voltametria cíclica (Figura 7) usando eletrodo de carbono vítreo versus eletrodo de (Ag/AgCl).

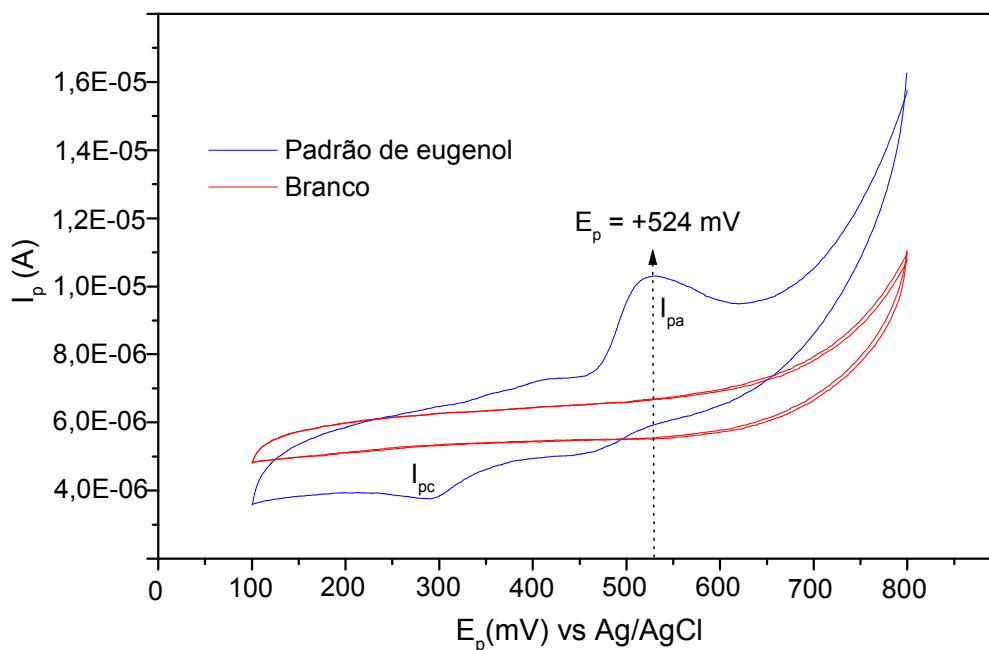


Figura 7. Voltamograma cíclico do padrão de eugenol para determinação do potencial de oxidação, obtido usando velocidade de varredura 50mVs^{-1} , pH 3,3 em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 60% de etanol

Segundo Mouchrek (2000), a determinação eletroanalítica é possível devido ao processo redox do grupo hidroxila do eugenol, originando compostos do tipo benzoquinonas, a literatura revelou o intervalo varredura na faixa de (+1,20 V) à (-0,20 V), e potencial de oxidação variando com o aumento da concentração de eugenol.

No estudo inicial, adotamos as condições analíticas citadas na literatura, e verificamos em replicatas, que o eugenol sofreu oxidação no potencial de (+524 mV). Comparando os resultados, verificamos diferenças significativas no potencial de pico, que se manteve constante em todas as replicatas, ao contrario da literatura que apresentou resultados variáveis no intervalo de (+0,70) à aproximadamente (+0,80). As diferenças podem ser explicadas pelo fato dos ensaios atuais serem feitos por equipamentos mais sofisticados, que usam sistema computadorizado para efetuar o tratamento dos dados experimentais, apresentando sinais mais nítidos, precisos e mais sensíveis que o equipamento manual usado na referência.. Também soma-se a isso, o fato de que a presente metodologia usou uma faixa de concentração bem menor.

O voltamograma sugere um comportamento quase reversível, devido à relação entre os picos de oxidação e redução da molécula de eugenol.

Devido a baixa sensibilidade analítica apresentada pela voltametria cíclica, optamos por fazer uso da técnica de voltametria de pulso para as demais ensaios eletroanalíticos, usando como condições iniciais o potencial de oxidação determinado a partir da voltametria cíclica, eletrólito suporte contendo 55% de etanol em tampão BR, e as condições citadas por Mouchrek (2000).

4.2.2 Estudo do tempo de deposição

Nesta técnica a etapa ocorre a pré-concentração, ou seja, a eletrodeposição a um potencial constante e controlado da espécie eletroativa sobre um eletrodo estacionário. Para esta etapa foram testados 16 intervalos de tempo (Tabela 1) variando de 10 a 200 segundos (Figura 8).

Tabela 1. Valores do potencial de deposição versus corrente de pico

Tempo de deposição (s)	Ip (A)
10	0,00097
20	0,00102
30	0,00103
40	0,00104
45	0,00105
50	0,00108
60	0,00112
80	0,00122
85	0,00156
90	0,00177
100	0,00194
110	0,00189
130	0,00178
150	0,00168
180	0,00159
200	0,00152

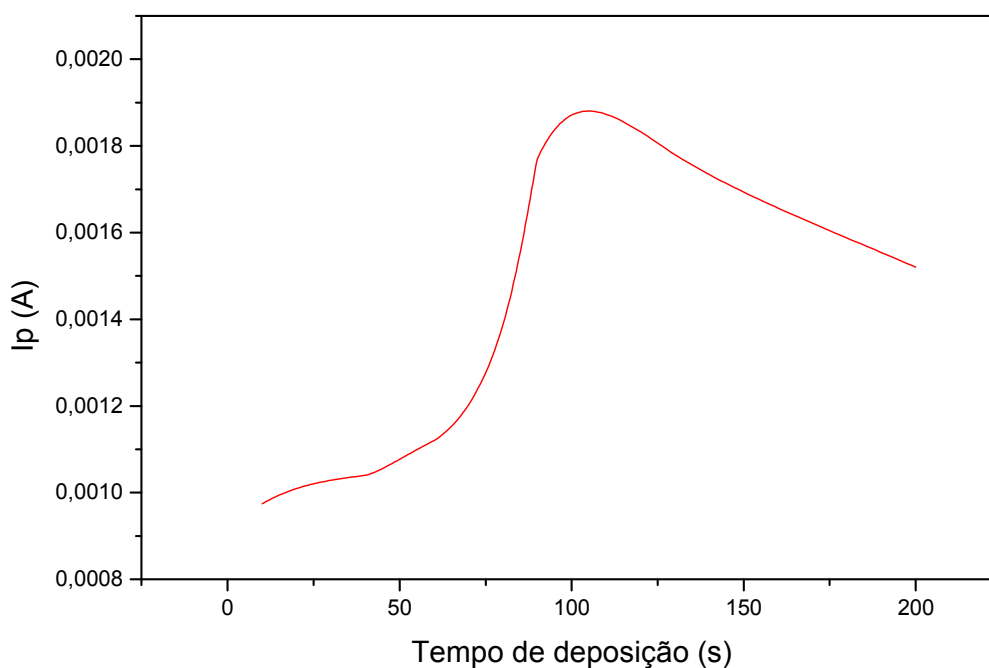


Figura 8. Gráfico do comportamento da corrente com variação do tempo de deposição obtido, usando velocidade de varredura 50mVs^{-1} , potencial de oxidação em $+524\text{mV}$, amplitude de pulso 25mV , pH 3,3 em solução hidroalcoólica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol

De acordo com os resultados obtidos, a corrente é crescente até o intervalo de aproximadamente 100 segundos, após esse ponto os valores de corrente tendem a diminuir devido a saturação ocorrida na superfície do eletrodo gerando sinais fora da região de proporcionalidade entre a corrente e a concentração. A diferença nos tempo de deposição testado é pequena frente ao ganho no sinal analítico apresentado, portanto optamos pelo tempo de 100 segundos.

4.2.3 Estudo da amplitude de pulso

Foram testados 19 pontos (Tabela 2), variando de 5 à 260 mV, plotados versus a corrente de pico.

Tabela 2. Valores de amplitude de pulso versus corrente de pico

Amplitude de Pulso (mV)	Ip (mA)
5	0,43
10	0,55
20	1,55
30	2,08
40	3,15
50	3,64
60	4,48
70	5,01
80	5,51
90	6,01
100	6,70
120	7,04
140	7,41
160	7,53
180	7,58
200	7,56
220	6,70
240	5,73
260	4,72

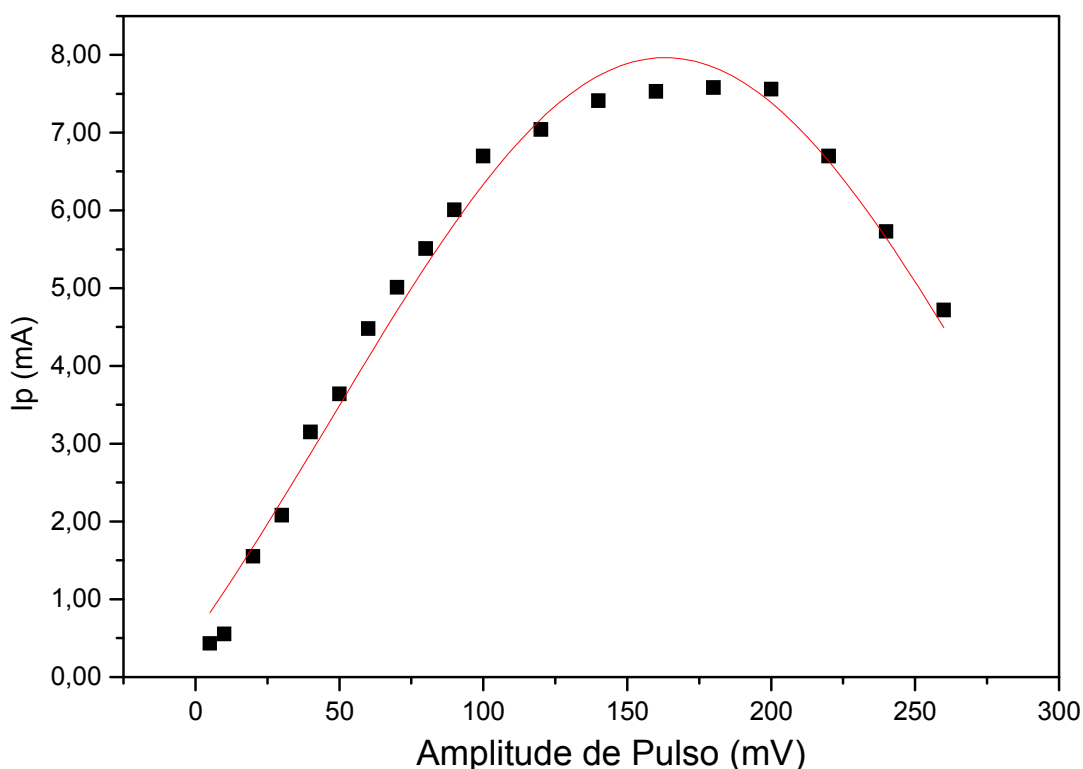


Figura 9. Variação da corrente de pico com o aumento da amplitude de pulso, usando velocidade de varredura 50mVs^{-1} , potencial de oxidação em $+524\text{mV}$, tempo de deposição de 100s, pH 3,3 em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol.

A variação da corrente versus amplitude de pulso obedeceu a um comportamento gaussiano (Figura 9), com valores crescentes no intervalo de 5 á 120 mV. A partir deste intervalo, potencial de deposição permanece constante até aproximadamente 200mV, e a a partir deste sofre decréscimo na corrente devido ao alargamento do pico, esse alargamento de pico desloca o potencial de oxidação no sentido negativo podendo interferir em análises futuras. Levando em consideração a relação entre a maior amplitude de pulso e a melhor definição dos voltamogramas, optamos pela amplitude de 100mV.

4.2.4 Influência da velocidade de varredura

A velocidade de varredura é está relacionada com o tempo de pulso em segundos. O comportamento difusional é comprovado a partir da proporcionalidade entre a raiz quadrada da velocidade de varredura e a corrente de pico, obedecendo à equação de *Randles-Svecik* (Equação 10).

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (25 \text{ }^\circ\text{C}) \quad \text{(Equação 10),}$$

Onde:

I_p = corrente de pico (A);

n = número de elétrons trocados no processo;

A = área do eletrodo (cm^2);

D = coeficiente de difusão (cm^2/s);

C = concentração (mol/cm^3);

v = velocidade de varredura (V/s).

Foram testados oito valores para velocidade de varredura em cinco replicatas (Tabela 3), no intervalo de 5 à 60 mVs^{-1} (Figura 10).

Tabela 3. Valores da velocidade, raiz quadrada da velocidade, corrente e desvio, obtidos experimentalmente

V(mV/s)	V ^{1/2}	I _p (A)	S ₂ (desvio)
5	2,236068	0,0420	0,0003
10	3,162278	0,0440	0,0008
20	4,472136	0,0458	0,0004
30	5,477226	0,0480	0,0013
40	6,324555	0,0500	0,0012
50	7,071068	0,0490	0,0017
60	7,745967	0,0460	0,0018

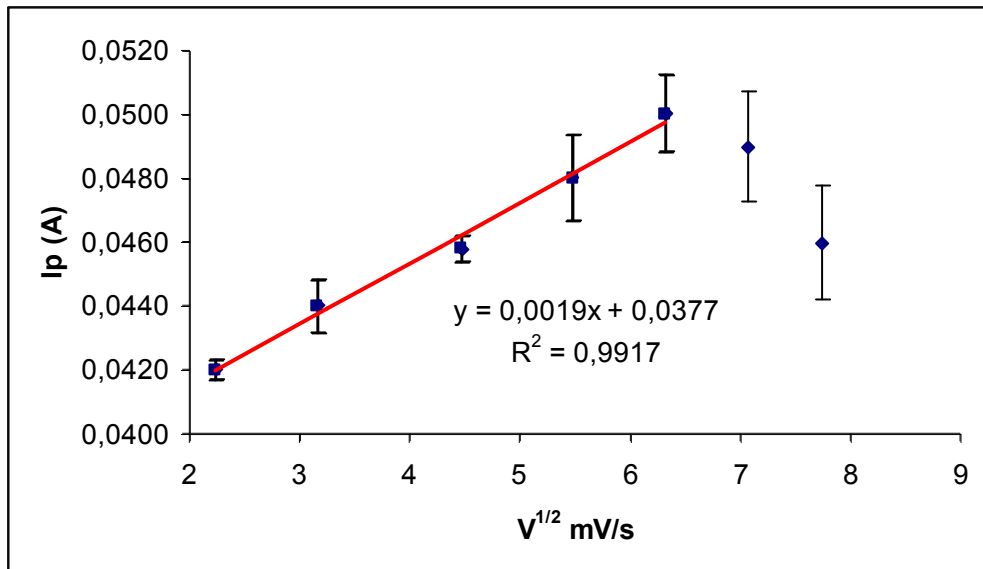


Figura 10. Gráfico da variação da corrente com o aumento da raiz quadrada da velocidade de varredura, usando potencial de oxidação em +524mV, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV, pH 3,3 em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e55% de etanol.

Foi verificado um comportamento não linear a partir de 50 mVs^{-1} ($V^{1/2}=7,07$), quando a migração de compostos para superfície do eletrodo não se dá por satisfatória (velocidade de varredura alta), promovendo a diminuição da corrente para intervalos fora da região de proporcionalidade. Para intervalos de $5 \text{ (} V^{1/2}=2,24 \text{)}$ à $40 \text{ mV/s (} V^{1/2}=6,32 \text{)}$, observamos um comportamento linear ($R^2 = 0,9917$), a corrente (I_p) é proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura, onde se comprova o processo difusional, ou seja: eugenol migra para a superfície do eletrodo.

Levando em consideração a relação entre a maior velocidade de varredura, maior corrente de pico e menor desvio entre as replicatas, optamos pela velocidade de 40 mVs^{-1} , pois o desvio foi considerado insignificante versus o ganho no sinal analítico.

4.2.5 Estudo da variação do pH

O estudo do pH foi efetuado a partir de uma solução contendo padrão de eugenol de concentração conhecida. As condições analíticas foram fixadas em: potencial de oxidação em $+524 \text{ mV}$, tempo de deposição de 100 s , amplitude de pulso de 100 mV , velocidade de varredura 50 mVs^{-1} em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol

A variação de pH foi promovida pela adição de solução $\text{NaOH } 0,1 \text{ molL}^{-1}$ (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de pH e corrente obtidos experimentalmente

pH	I_p (A)
1,8	$5,7 \times 10^{-6}$
2,2	$6,8 \times 10^{-6}$
3,3	$6,9 \times 10^{-6}$
5,3	$3,5 \times 10^{-6}$
7,3	$2,4 \times 10^{-6}$
8,8	$1,8 \times 10^{-6}$

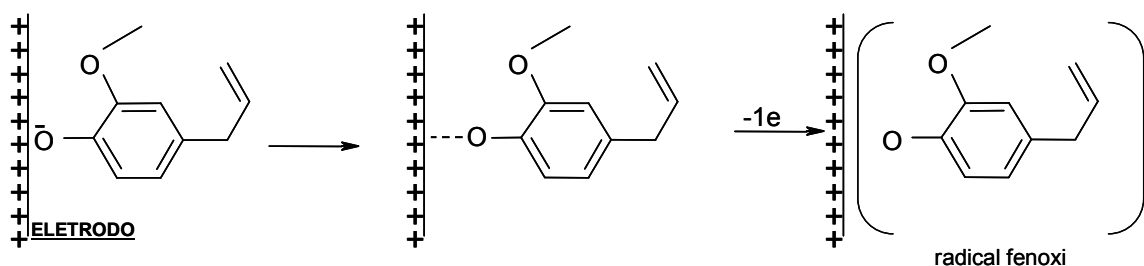


Figura 13. Formação do radical fenóxi a partir da eletrooxidação do eugenol na superfície do eletrodo de carbono vítreo

Quando o ânion fenóxido aproxima-se do eletrodo (Figura 13), torna-se então preferencialmente polarizado assim que a carga negativa é localizada no átomo de oxigênio. A ligação temporária é formada com a superfície positiva do eletrodo e quebra-se com a remoção de um elétron, resultando um radical fenóxi, este radical é estabilizado por meio das estruturas de ressonância que estão na superfície do eletrodo.

Se o pH for suficientemente baixo, o fenol deverá estar completamente não ionizado, e neste caso ocorrerá a reação do íon fenoxônio envolvendo dois elétrons (Figura 14) (VERMILLION, 1964).

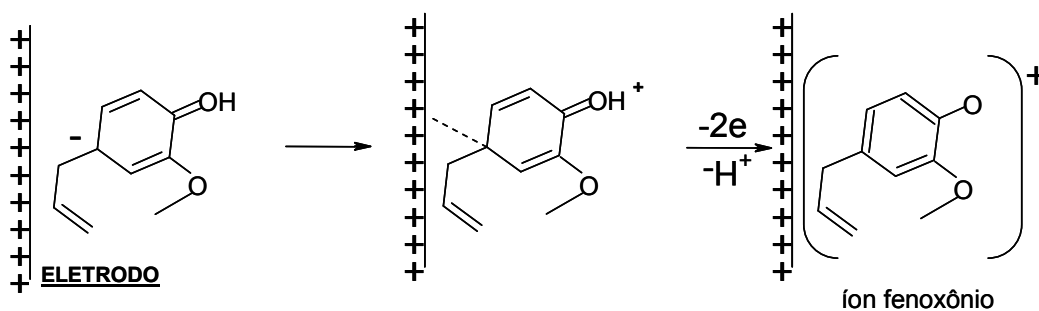


Figura 14. Formação do íon fenoxônio a partir da eletro-oxidação do eugenol

Observa-se o ataque eletrofílico no núcleo aromático do eugenol não ionizado com a remoção irreversível de dois elétrons para dá o íon fenoxônio. Quando o íon aproxima-se do eletrodo torna-se então preferencialmente polarizado.

Se o pH possuir um valor intermediário, ambas as formas do fenol estarão presentes, tanto o fenol ionizado como o não ionizado. Se a velocidade de ionização do fenol é mais

rápida comparada com a velocidade de reação no eletrodo, o ânion fenóxido deveria ser preferencialmente oxidado. Neste caso o pico voltamétrico deveria ter as mesmas características da reação que resulta na formação de um radical livre (HENDENBURG, 1953).

Gaylor *et al*, (1953) estudaram o efeito de inúmeras curvas voltamétricas de substâncias orgânicas, e observaram que tanto o potencial de pico como a altura e sua largura dependem do pH.

Após os estudos realizados optamos pelo pH 3,3, pela melhor definição do voltamograma frente a maior corrente de pico observada.

4.3 Construção da curva analítica e determinação do percentual de eugenol no óleo essencial de canela

As soluções, contendo o padrão de eugenol em concentrações conhecidas foram submetidas às análises voltamétricas, gerando voltamogramas bem definidos (Figura 15). Não foi observado deslocamento no potencial de oxidação.

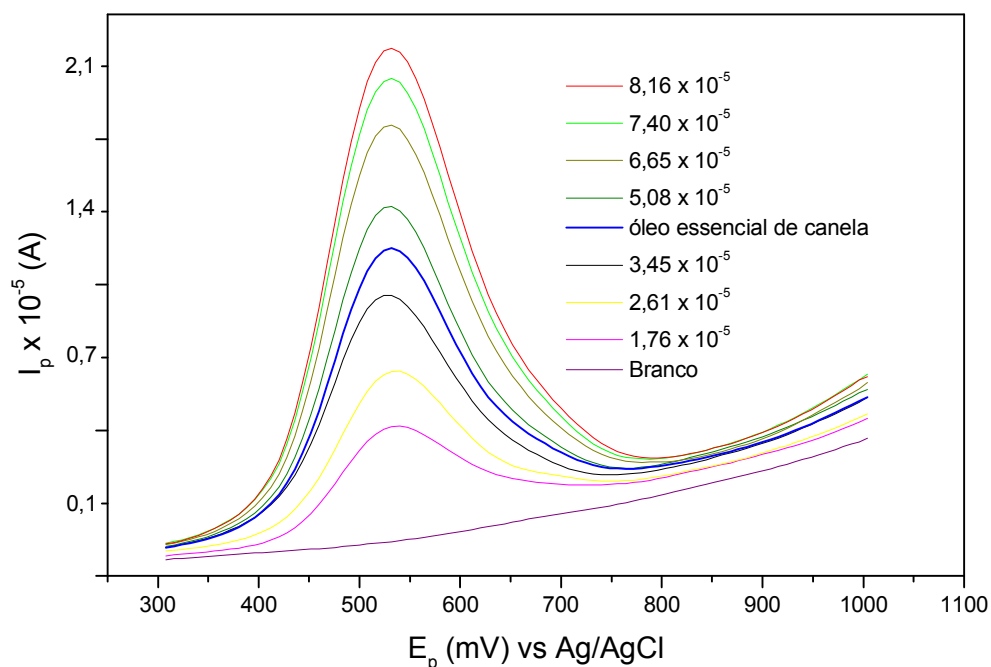


Figura 15. Voltamograma do padrão de eugenol e óleo essencial de canela, obtidos experimentalmente usando potencial de oxidação em +524mV, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV, pH 3,3, velocidade de varredura 40mVs⁻¹ em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol

A curva analítica (Figura 16) foi construída com base em dados experimentais (Tabela 5) obtidos usando o tempo de deposição de 100 segundos, potencial de oxidação de +524mV, amplitude de pulso de 100 mV, velocidade de varredura de 40 mVs⁻¹ e pH 3,3.

Tabela 5. Valores de corrente obtidos experimentalmente a partir de concentrações conhecidas

Leitura (molL ⁻¹)	Ip (A)
1,76x10 ⁻⁰⁵	4,398x10 ⁻⁰⁶
2,61x10 ⁻⁰⁵	6,922x10 ⁻⁰⁶
3,45x10 ⁻⁰⁵	1,039x10 ⁻⁰⁵
5,08x10 ⁻⁰⁵	1,449x10 ⁻⁰⁵
6,65x10 ⁻⁰⁵	1,829x10 ⁻⁰⁵
7,40x10 ⁻⁰⁵	2,045x10 ⁻⁰⁵
8,16x10 ⁻⁰⁵	2,194x10 ⁻⁰⁵

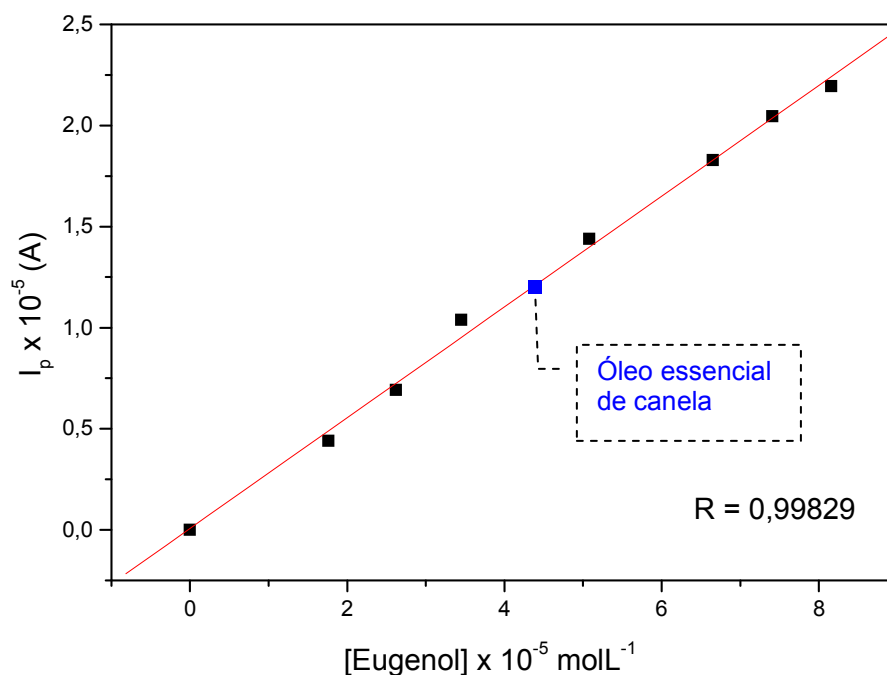


Figura 16. Curva analítica do padrão de eugenol usando potencial de oxidação em +524mV, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV, pH 3,3, velocidade de varredura 40mVs⁻¹ em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol

A concentração de eugenol no óleo essencial de canela foi calculada a partir da equação da reta: $y = 6,42 \times 10^{-8} + 0,2743X$ gerada a partir da curva analítica, com adição de amostra contendo óleo essencial, diluída em eletrólito suporte (tampão BR com 55% etanol).

A leitura de corrente observada para o óleo essencial foi de $1,22 \times 10^{-5}$ A. Usando a equação da reta, temos: $X = 4,43 \times 10^{-5}$ molL⁻¹, levando em consideração a pureza do padrão de eugenol (98 %), demais cálculos referentes as diluições, e calculando em termos

percentuais, concluímos que o óleo essencial de canela possui um teor de 64,31 % de eugenol em sua composição.

4.4 Validação da metodologia analítica

4.4.1 Faixa de linearidade

A análise para determinação da faixa de linearidade do método, foi realizada a partir de acréscimos sucessivos de concentrações conhecidas de eugenol, o pH do sistema foi mantido em 3,3; amplitude de pulso usada foi de 100mV, tempo de deposição de 100s, velocidade de varredura igual a 100mVs^{-1} e o potencial de oxidação considerado para leitura da corrente foi (+524mV).

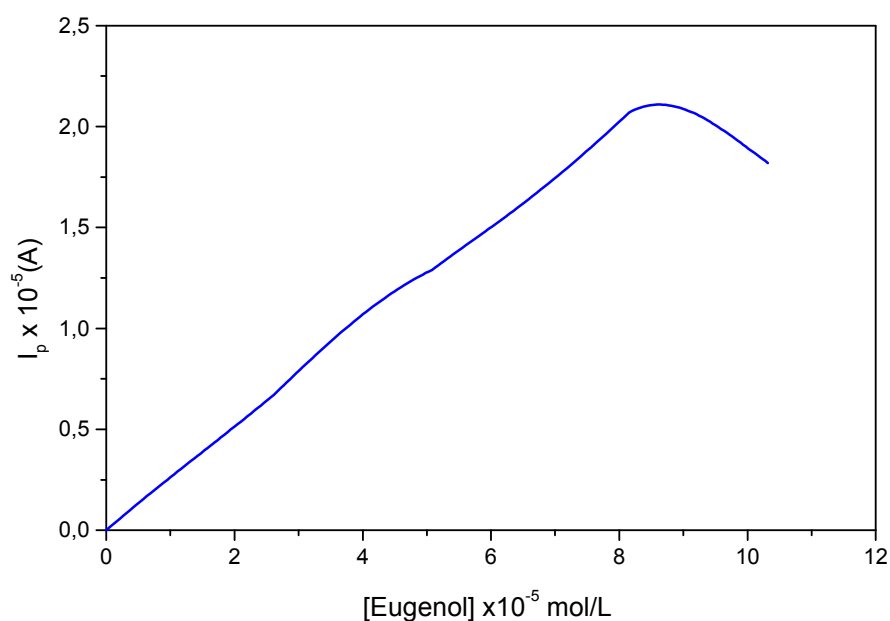


Figura 17. Variação da Corrente (I_p) com o aumento da concentração de eugenol para determinação da faixa de linearidade, usando potencial de oxidação em +524mV, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV, pH 3,3, velocidade de varredura 40mVs^{-1} em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol

De acordo com os resultados obtidos (Figura 17), verificamos o desvio da linearidade a partir da concentração $9,611 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$, pois a partir desta concentração verificamos diminuição na corrente causando desvio de proporcionalidade entre corrente e concentração. O decréscimo ocorre devido à saturação da superfície do eletrodo. Para intervalo de

concentração acima do intervalo de linearidade, haverá a necessidade de diluição até sua adequação a faixa de linearidade do método proposto.

4.4.2 Faixa de trabalho

Tabela 6. Valores de corrente e concentração de eugenol obtidos experimentalmente

Leitura	I_p (A)	[eugenol] (molL^{-1})
1	0	0
2	$2,62 \times 10^{-06}$	$8,89 \times 10^{-06}$
3	$5,26 \times 10^{-06}$	$1,76 \times 10^{-05}$
4	$7,30 \times 10^{-06}$	$2,62 \times 10^{-05}$
5	$9,68 \times 10^{-06}$	$3,45 \times 10^{-05}$
6	$1,34 \times 10^{-05}$	$4,27 \times 10^{-05}$
7	$1,42 \times 10^{-05}$	$5,08 \times 10^{-05}$
8	$1,64 \times 10^{-05}$	$5,87 \times 10^{-05}$
9	$1,93 \times 10^{-05}$	$6,65 \times 10^{-05}$
10	$2,27 \times 10^{-05}$	$7,41 \times 10^{-05}$
11	$2,33 \times 10^{-05}$	$8,16 \times 10^{-05}$

Para determinação da faixa de trabalho, usamos 11 pontos da curva analítica (Tabela 6), obedecendo ao limite de linearidade (Figura 18).

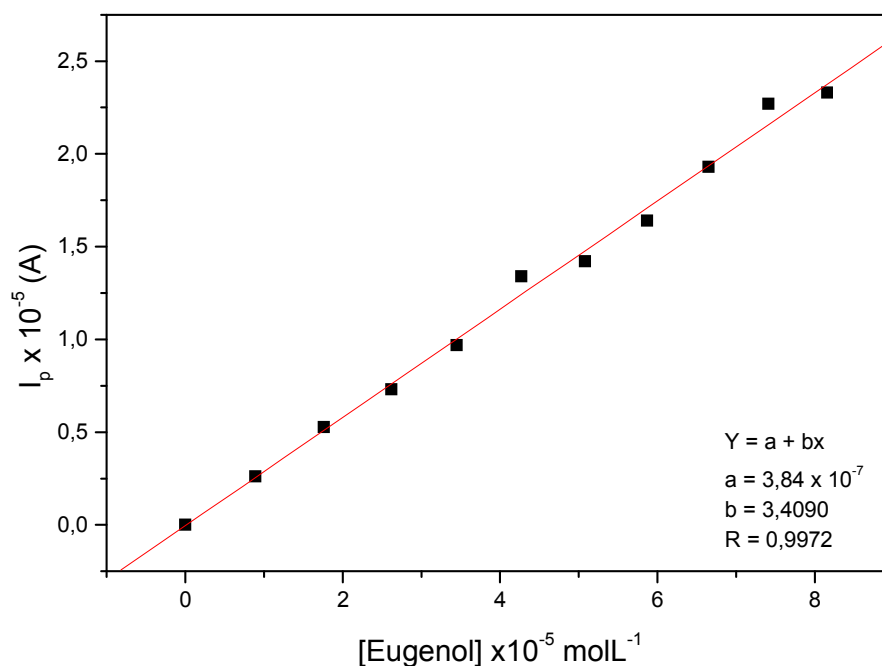


Figura 18. Variação da corrente (I_p), com o aumento da concentração de eugenol, para determinação da faixa de trabalho, usando potencial de oxidação em +524mV, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV, pH 3,3, velocidade de varredura 40mVs^{-1} em solução hidro-alcóolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol

A melhor correlação foi obtida restringindo-se a faixa superior de trabalho (FST) à concentração de $8,16 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ (Figura 18). Os pontos desta curva fornecem o coeficiente de correlação igual a 0,9972, considerado linear no intervalo proposto. A faixa de trabalho a ser considerada deverá está compreendida no intervalo entre o limite de quantificação do método e a faixa superior de trabalho.

4.4.3 Seletividade

A determinação da seletividade foi efetuada usando as medidas de correntes obtidas a partir de soluções contendo padrão de eugenol puro (Tabela 7), e amostras de óleo essencial com adição do padrão (Tabela 8). As análises foram realizadas em replicatas, para determinação do desvio padrão, obedecendo às mesmas condições experimentais, e comparando-se os resultados de variâncias usando o teste F, que corresponde a divisão das variâncias: S_1^2 / S_2^2 .

As condições analíticas consideradas no teste de seletividade foram: pH 3,3, amplitude de pulso 100mV, tempo de deposição de 100 segundos, velocidade de varredura 100 mVs^{-1} .

Tabela 7. Valores de corrente, desvio padrão e variância, obtidos a partir da adição de 300 μL da solução estoque contendo padrão de eugenol, correspondente a concentração de $2,80 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$.

Leitura	$I_p \times 10^{-6}(\text{A})$	(desvio padrão) S_1	(variância) S_1^2
1	9,655		
2	7,884		
3	7,868		
4	7,944	0,6531	0,4265
5	7,821		
6	8,257		
7	8,421		

Tabela 8. Valores de corrente, desvio padrão e variância, obtidos a partir da adição de 200 μL da solução estoque contendo óleo essencial de canela em 100 μL da solução estoque contendo padrão de eugenol

Leitura	$I_p \times 10^{-6}(\text{A})$	(desvio padrão) S_2	(variância) S_2^2
1	6,1785		
2	7,6274		
3	6,1495		
4	6,5304	0,5014	0,2515
5	6,7707		
6	6,7368		
7	7,4346		

Com base nos valores das variâncias calculados para ($n=7$) obteve-se o valor calculado $F_{7,7} = 0,4265 / 0,2515 = 1,70$ que é menor do que o $F_{\text{tabelado}} = 4,28$ (6 graus de liberdade para 95% de confiança). Conclui-se que para os parâmetros e condições estabelecidas, o método pode ser considerado seletivo, ou seja, detecta apenas o potencial do pico de oxidação da substância eugenol no intervalo proposto. A adição de óleo essencial de canela ao padrão de eugenol não provoca mudanças no comportamento dos voltamogramas e mantém o potencial de oxidação constante na região de +524 mV, o efeito matriz não é observado. A determinação quantitativa deverá ser realizada a partir de curva analítica ao invés de adição padrão.

4.4.4 Teste de recuperação

Neste trabalho, o teste de recuperação foi realizado a partir da leitura de corrente em três concentrações diferentes e em três etapas. Na primeira etapa foi efetuada a leitura da solução contendo padrão de eugenol (PE), na segunda etapa foi efetuada a leitura da solução contendo o óleo essencial de canela (OC), na terceira etapa foi efetuada a leitura correspondente a mistura das soluções estoques padrão de eugenol óleo essencial de canela (Tabela 9).

A diferença entre as leituras da mistura de soluções estoques, e leitura da solução estoque de óleo essencial, deverá ser igual ao valor da leitura da solução estoque contendo o padrão de eugenol.

O resultado ideal é de uma recuperação de 100 %, mas evidentemente o valor obtido aceitável estará ao redor de 100 % dentro do erro experimental do método (INMETRO, 2003).

O teste de recuperação foi efetuado usando pH 3,3, amplitude de pulso 100mV, tempo de deposição de 100 segundos, velocidade de varredura 40mVs^{-1} .

Tabela 9. Valores de corrente de pico para cálculo de recuperação do método

Padrão de eugenol (real) (A)	Óleo essencial de canela (A)	Recuperação %
$2,62 \times 10^{-06}$		94,90
$1,42 \times 10^{-05}$	$1,22 \times 10^{-5}$	95,11
$2,33 \times 10^{-05}$		95,05

O resultado aponta uma recuperação de 95 %. O percentual de recuperação está associado provavelmente aos desvios da metodologia analítica, considerando perdas nas transferências de volumes e limpeza dos eletrodos envolvidos na análise.

4.4.5 Limite de detecção

O limite de detecção do método (LDM) foi calculado levando em consideração a menor concentração aceitável do analito, para um nível de confiança de 95% e 5 replicatas (Tabela 10).

Tabela 10. Valores de corrente e concentração para determinação do limite de detecção do método.

Leitura	Corrente (A)	[Eugenol] mol/L	S ₂ curva	Inclinação
1	2,71x10 ⁻⁰⁶	9,21x10 ⁻⁰⁶		
2	2,73 x10 ⁻⁰⁶	9,28x10 ⁻⁰⁶		
3	2,66 x10 ⁻⁰⁶	9,03x10 ⁻⁰⁶		
4	2,72 x10 ⁻⁰⁶	9,25x10 ⁻⁰⁶	3,08 x 10 ⁻⁰⁸	0,274
5	2,74 x10 ⁻⁰⁶	9,32x10 ⁻⁰⁶		
Média	2,71x10 ⁻⁰⁶	9,22x10 ⁻⁰⁶		

Usando a equação (7), temos:

$$t_{\text{tabelado}}(4,4; 95\%) = 2,776$$

$$\text{Inclinação da Curva} = 0,274$$

$$\text{Desvio padrão da curva} = 3,08 \times 10^{-8}$$

$$\text{LDM} = 2,776 \times 3,08 \times 10^{-8} / 0,274$$

$$\text{LDM} = 3,12 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$$

Para a metodologia proposta, a menor concentração do analito que se pode determinar com um nível de confiança de 95 % é $3,12 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Abaixo desta concentração a detecção estará comprometida, devendo ser tomados outros parâmetros e condições adequadas à nova faixa de trabalho.

4.4.6 Limite de Quantificação

Para determinação do LQM do presente método, que apresentou o desvio padrão da curva de $3,08 \times 10^{-08}$ e inclinação da curva analítica 0,274 (Tabela 10), utilizou-se a equação (08)

$$\text{LQM} = 10 \times 3,08 \times 10^{-08} / 0,274$$

A menor concentração do analito que se pode quantificar usando a metodologia proposta é $1,12 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

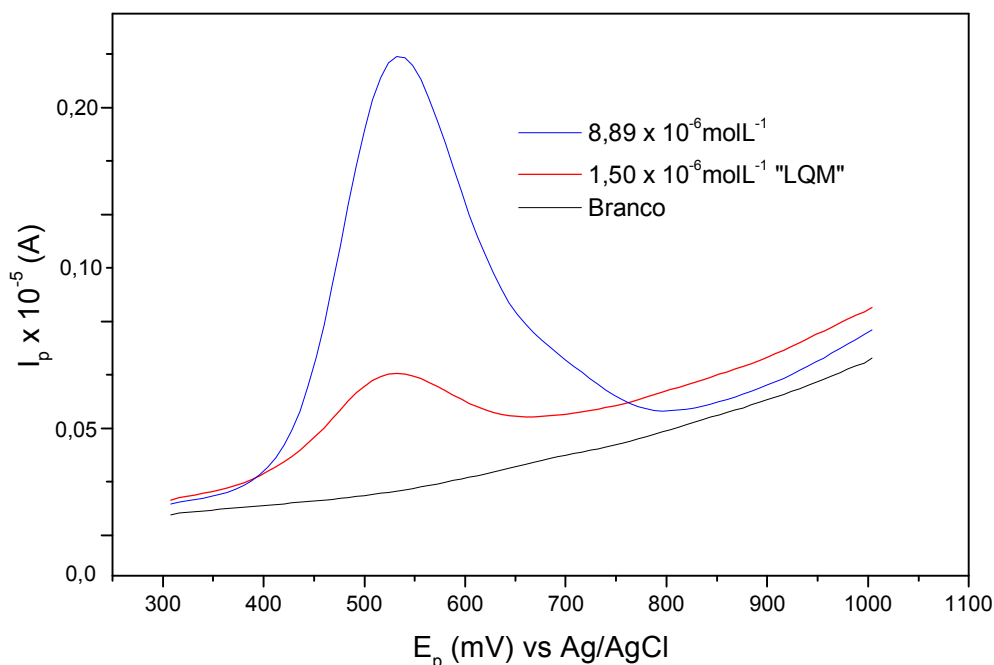


Figura 19. Voltamograma de Pulso Diferencial do LQM em comparação com a menor concentração usada na curva analítica, obtido usando potencial de oxidação em $+524 \text{ mV}$, tempo de deposição de 100 s , amplitude de pulso de 100 mV , pH 3,3, velocidade de varredura 40 mVs^{-1} em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol

Uma amostra de concentração próxima ao limite de quantificação do método foi analisada, levando em consideração as condições otimizadas (Figura 19). A corrente de pico observada foi de $5,64 \times 10^{-07} \text{ A}$, revelando uma concentração de $1,44 \times 10^{-07} \text{ mol.L}^{-1}$ a partir da curva analítica. O erro associado a leitura do LQM foi de 0,4%, considerado estatisticamente válido.

Outras concentrações abaixo do LQM poderão ser quantificadas, mas deverão seguir outros parâmetros e condições otimizadas para uma nova faixa de concentração.

4.4.7 Cálculo de Precisão

A precisão da metodologia analítica foi obtida usando os cálculos de repetitividade e reprodutibilidade. As condições de análise foram fixadas em: pH 3,3, amplitude de pulso 100 mV , tempo de deposição de 100 segundos , velocidade de varredura 100 mVs^{-1} .

4.4.7.1 Determinação da Repetitividade

A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinado por meio da análise de padrões, material de referência ou adição a branco em várias concentrações na faixa de trabalho. Sugere-se 7 (sete) ou mais repetições para o cálculo do desvio padrão para cada concentração, chamado desvio padrão de repetitividade (INMETRO, 2003).

A repetitividade foi determinada, utilizando o mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmas condições e repetições em curto espaço de tempo (Tabela 11).

Para o cálculo de repetitividade foi considerada uma amostra de concentração desconhecida de eugenol, a corrente foi determinada experimentalmente, e a concentração de eugenol foi obtida usando a curva analítica.

Tabela 11. Valores de corrente e concentração e desvio padrão para determinação da repetitividade do método

Leitura	Corrente (A)	[Eugenol] mol/L	Repetitividade (S_2)
1	$1,23 \times 10^{-06}$	$3,88 \times 10^{-06}$	
2	$1,22 \times 10^{-06}$	$3,84 \times 10^{-06}$	
3	$1,25 \times 10^{-06}$	$3,95 \times 10^{-06}$	
4	$1,19 \times 10^{-06}$	$3,73 \times 10^{-06}$	
5	$1,24 \times 10^{-06}$	$3,91 \times 10^{-06}$	$7,18 \times 10^{-08}$
6	$1,22 \times 10^{-06}$	$3,84 \times 10^{-06}$	
7	$1,24 \times 10^{-06}$	$3,91 \times 10^{-06}$	
Média	$1,23 \times 10^{-06}$	$3,87 \times 10^{-06}$	

Uma ferramenta usada para avaliar a repetitividade do método, foi o desvio padrão relativo (D.P.R.) que quando expresso em percentagem é denominado de coeficiente de variação (C.V.).

$$D.P.R. = \frac{S_2}{\bar{x}} \text{ (Equação 11),}$$

substituindo os valores, temos: $D.P.R. = \frac{7,18 \times 10^{-8}}{3,87 \times 10^{-6}} = 1,86 \times 10^{-2}$, expressando em forma percentual, temos:

$$C.V. = \frac{S_2 \times 100}{\bar{x}} = 1,86\% \text{ (Equação 12)}$$

O intervalo de confiança é uma expressão condicionante de que a média real (μ), provavelmente tem uma posição dentro de certa distância da média medida. Este foi calculado levando em consideração um nível de confiança de 95 %.

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{tS_2}{\sqrt{n}} = 3,87 \times 10^{-6} \pm \frac{2,447 \times 7,18 \times 10^{-8}}{\sqrt{7}} = 3,87 \times 10^{-6} \pm 6,64 \times 10^{-8} \text{ mol/L} \quad \text{(Equação 13)}$$

O coeficiente de variação obtido e o intervalo de confiança foram considerados insignificantes frente a metodologia utilizada e as várias etapas do processo.

4.4.7.2 Determinação da Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do método foi testada usando uma amostra de concentração desconhecida de eugenol, analisada em sete dias consecutivos. Usamos o z-score como ferramenta de avaliação da reprodutibilidade do método. A corrente foi obtida experimentalmente, e a curva analítica foi usada para determinação da concentração da espécie.

Tabela 12. Valores de corrente e concentração para determinação da reprodutibilidade do método

Leitura	Corrente (A)	[Eugenol] mol/L	Reprodutibilidade (S₂)
1º Dia	1,25 x 10 ⁻⁰⁶	3,95 x 10 ⁻⁰⁶	
2º Dia	1,32 x 10 ⁻⁰⁶	4,20 x 10 ⁻⁰⁶	
3º Dia	1,48 x 10 ⁻⁰⁶	4,79 x 10 ⁻⁰⁶	
4º Dia	1,21 x 10 ⁻⁰⁶	3,80 x 10 ⁻⁰⁶	4,0 x 10 ⁻⁰⁷
5º Dia	1,42 x 10 ⁻⁰⁶	4,57 x 10 ⁻⁰⁶	
6º Dia	1,30 x 10 ⁻⁰⁶	4,13 x 10 ⁻⁰⁶	
7º Dia	1,48 x 10 ⁻⁰⁶	4,79 x 10 ⁻⁰⁶	

A estatística robusta foi usada para o tratamento dos dados experimentais. O objetivo é medir o desvio em relação ao valor atribuído de maneira a permitir comparação com critérios de desempenho. O índice z foi analisado a partir do gráfico de reprodutibilidade (Figura 20), construído usando os resultados de concentração obtidos nos sete dias de análise (Tabela 12).

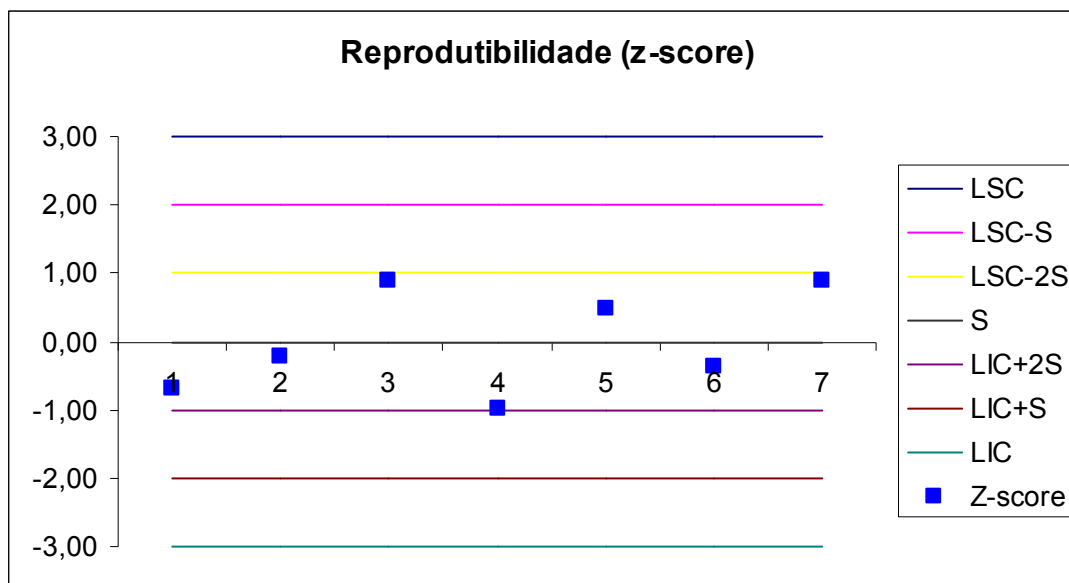


Figura 20. Gráfico do z-score para verificação da reprodutibilidade do método

Observando os resultados obtidos experimentalmente, verificamos que os valores de z , apresentaram valores satisfatórios, dentro do intervalo de controle ($z \leq 2$), o gráfico foi obtido a partir do tratamento dos dados em planilha, usando Microsoft Excel 2007.

De acordo com a orientação sobre validação de método de ensaios do INMETRO, é competência do observador, a análise crítica e aceitação ou não dos resultados referentes a precisão e exatidão obtidos experimentalmente.

4.4.8 EXATIDÃO

Grau de concordância entre os resultados das medições de um mensurado, efetuadas sob condições variadas de medição.

Segundo orientações do INMETRO, a validação de um procedimento analítica não normalizada está associada às figuras de méritos e comparação do método com metodologia normalizada, ou usando de material de referencia para comparação dos resultados experimentais. Como não existem métodos normalizados para determinação de eugenol em óleos essenciais, optamos por fazer uso de material de referencia para avaliação da metodologia proposta.

O cálculo de exatidão foi possível a partir da leitura de uma solução contendo o padrão de referência de concentração $2,42 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$.

A exatidão foi expressa em forma do erro, calculado a partir da equação (9):

$$ER = \frac{X_{Lab} - [eugenol]_{real}}{[eugenol]_{real}} \times 100$$

Tabela 13. Concentração de eugenol obtidos experimentalmente, para determinação da exatidão

Leitura	[Eugenol] molL ⁻¹	S ₂	Erro
1	2,39x10 ⁻⁰⁶		
2	2,44x10 ⁻⁰⁶		
3	2,36x10 ⁻⁰⁶	2,95x10 ⁻⁸	0,83%
4	2,39x10 ⁻⁰⁶		
5	2,41x10 ⁻⁰⁶		
Média	2,40x10 ⁻⁰⁶		

4.4.9 Determinação de eugenol em outras matrizes

A metodologia otimizada para determinação de eugenol em óleo essencial de canela, foi aplicada em outras matrizes de interesse científico. As matrizes testadas foram orégano (*Origanum*) e pimenta dióica (*Pimenta dioica* L.).

4.4.10.1 Determinação de eugenol em óleo essencial de orégano

Os óleos essenciais de orégano foram extraídos usando os mesmos procedimentos já descritos anteriormente. O voltamograma do óleo essencial de orégano (Figura 21) apresentou dois processos sobrepostos, necessitando de estudos aprofundados para identificação das reações que se processam. Esse óleo essencial foi escolhido propositalmente para testar a interferência dos demais constituintes com potencial de oxidação na região próxima ao eugenol. Foi feito acréscimo de volumes conhecidos de eugenol ao sistema sendo observado aumento apenas no pico de oxidação do eugenol, ou seja, os demais constituintes não causaram interferência no sinal analítico para a determinação de eugenol no óleo essencial de orégano. A quantificação foi realizada, levando em consideração o potencial de oxidação do eugenol em +524mV.

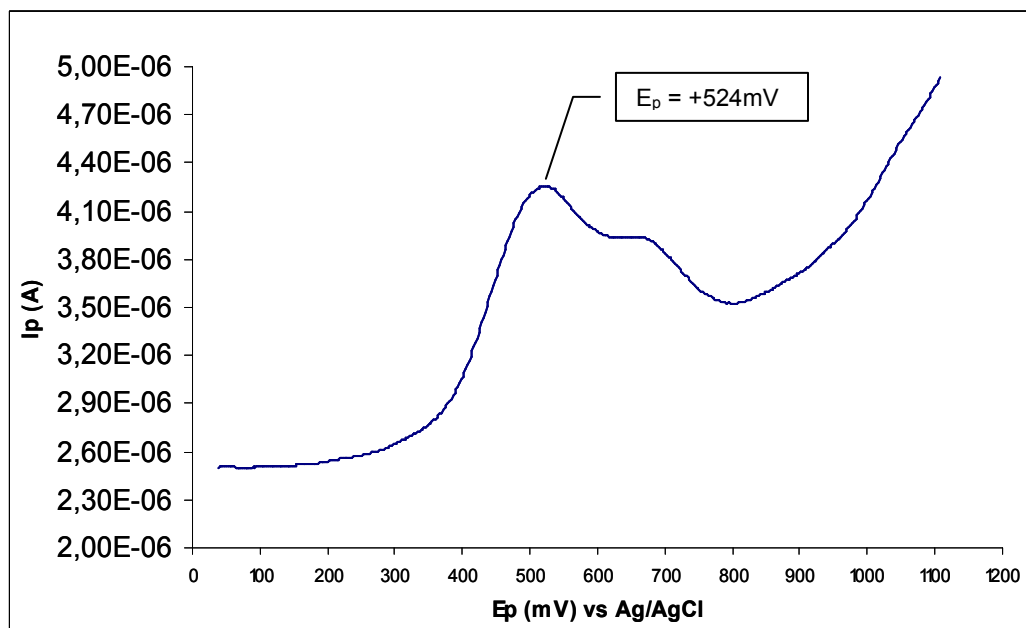


Figura 21. Voltamograma de pulso diferencial do orégano, obtido usando potencial de oxidação em +524mV, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV, pH 3,3, velocidade de varredura 100mVs^{-1} em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol

A corrente obtida foi de $4,12 \times 10^{-6}$ A, o que corresponde a uma concentração de $1,43 \times 10^{-5}$ mol/L, efetuando-se os cálculos referentes à diluição, concluindo-se que o óleo essencial de orégano possui 20,2% de eugenol em sua composição.

4.4.10.2 Determinação de eugenol em óleo essencial das folhas de *Pimenta dioica* L

O óleo essencial usado neste trabalho foi extraído e analisado por Mouchrek (2000), usando dentre outras, a técnica de espectrometria na região do ultravioleta (Figura 21).

A determinação quantitativa do eugenol por espectrofotometria de UV foi acompanhada pelo aumento da absorção da banda do grupo aromático ($\lambda_{\text{max}} = 280$ nm), em função do aumento da concentração de eugenol no óleo. A curva de adição padrão é caracterizada pelo coeficiente de correlação ($r = 0,9995$) e desvio padrão de 0,021 (MOUCHREK, 2000).

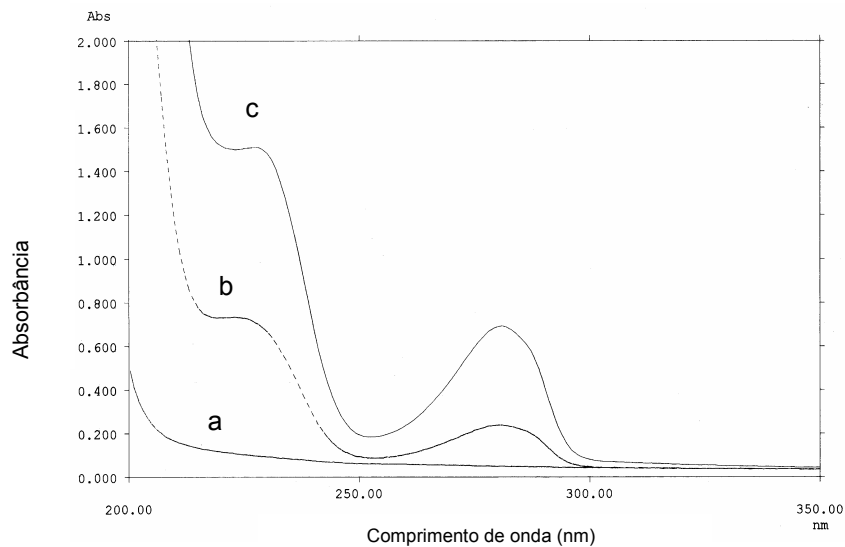


Figura 22. Espectros de absorção no UV. a) mistura etanol/água à 60 %. b) óleo essencial e C) padrão de eugenol (MOUCHREK, 2000).

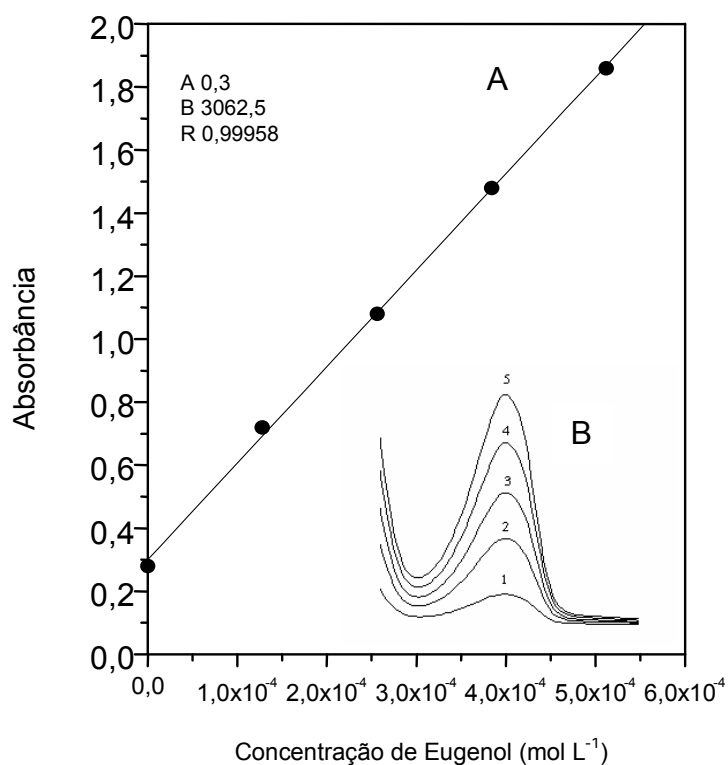


Figura 23. (A) Curva de adição padrão de solução contendo 20 μL de solução estoque preparada com 100 μL de amostra de óleo essencial, em 10 mL de mistura etanol/água a 60 %. (B) Espectros de absorção da amostra e das concentrações de padrão de eugenol: (1) amostra; (2) $1,28 \times 10^{-4}$; (3) $2,56 \times 10^{-4}$; (4) $3,85 \times 10^{-4}$ e (5) $5,12 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (MOUCHREK, 2000).

A partir da curva de adição padrão (Figura 23), Mouchrek (2000) concluiu que a amostra de óleo essencial das folhas de *Pimenta dióica* L, continha um percentual de 81,60% de eugenol em sua composição.

No presente trabalho, aplicou-se a técnica eletroanalítica otimizada na mesma amostra usada pelo autor (Mouchrek 2000), e os resultados mostraram que o voltamograma apresentou o mesmo comportamento do padrão de eugenol, assim como o óleo essencial de canela.

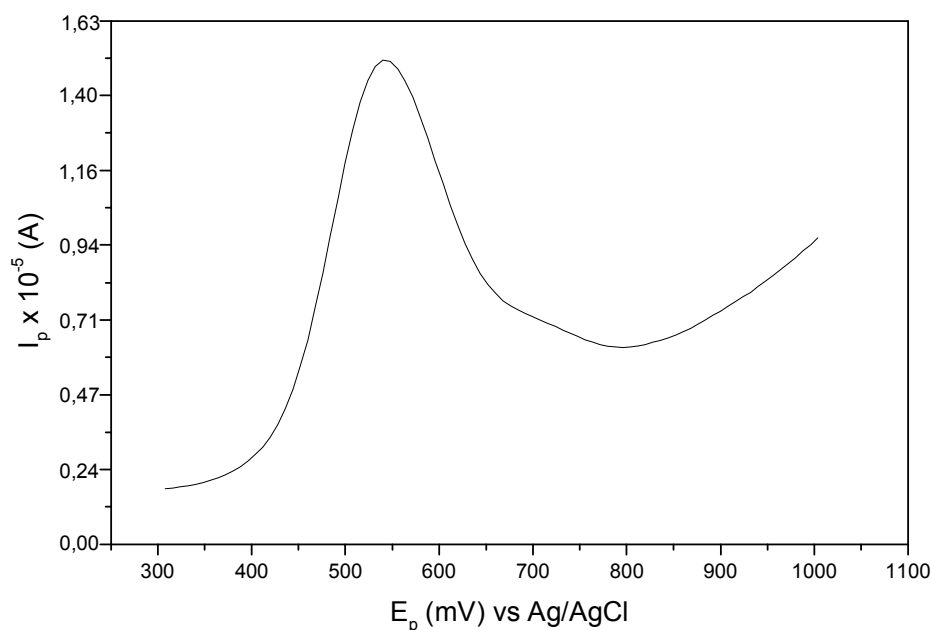


Figura 24. Voltamograma de pulso diferencial do óleo essencial da *Pimenta dióica* L, obtido usando potencial de oxidação em +524mV, tempo de deposição de 100s, amplitude de pulso de 100mV, pH 3,3, velocidade de varredura 100mVs^{-1} em solução hidro-alcoolica contendo mistura de tampão BR e 55% de etanol

A corrente de pico determinada foi de $1,51 \times 10^{-5}$ A, que corresponde à concentração de $5,4 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, representando o percentual de 78,31 % de eugenol em sua composição.

A literatura aponta percentuais de eugenol em torno de 77,9%, no óleo essencial de *Pimenta dioica* L (Pierucci, 2005) .

Tabela 14 Comparação de resultados entre as diferentes técnica analíticas

Técnica	% eugenol
UV (Mouchrek 2000)	81,60 %
Voltametria de Redissolução	78,31 %
CG-MS (Pierucci, 2005)	77,9 %

Comparando os valores obtidos (tabela 14), observamos uma ligeira concordância entre os valores, a diferença entre os resultados pode ser explicada pelo fato das técnicas eletroanalítica e cromatográfica serem mais seletivas que a técnica de UV.

CAPITULO 5

CONCLUSÃO

Ainda que o método empregado neste trabalho não seja uma inovação na determinação de eugenol em óleos essenciais, alguns dos parâmetros avaliados foram melhorados quando comparados com a literatura, tais como o LD e LQ

Embora não tenha sido possível comprovar por completo o mecanismo eletroquímico envolvido, foram obtidos resultados importantes no sentido de esclarecer o comportamento do eugenol no eletrodo de carbono vítreo, tanto da etapa de deposição, como redissolução, sendo o pH de fundamental importância neste processo

Nos ensaios eletro-analíticos, o potencial de oxidação de (+524 mV) pode ser considerado seletivo para determinação de eugenol em óleos essenciais, por voltametria cíclica e pulso diferencial, uma vez que não sofreu alterações no decorrer dos estudos;

Apesar de apresentar resultados satisfatórios, a validação da metodologia analítica é um procedimento aceitável (validação interna), entretanto este pode ser mais amplo desde que se faça um interlaboratorial;

Os limites de detecção do método (LDM) e limites de quantificação do método (LQM) foram determinados levando em consideração a matriz de interesse, podendo ser alterados de acordo com o nível de confiança a ser aplicado. A técnica apresentou boa sensibilidade analítica, com aplicação no intervalo compreendido entre o LQM = $1,12 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ e o limite superior da faixa de trabalho (LST = $8,16 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$);

O procedimento analítico apresentou resultados satisfatórios quando aplicados para determinação de eugenol em óleos essenciais de outras espécies vegetais, testadas na presença de prováveis interferentes e em comparação com outra técnica analítica;

O presente estudo demonstrou a potencialidade da utilização das técnicas eletroanalíticas apresentando respostas precisa e exata para a análise do eugenol em óleos essenciais, com voltamogramas bem definidos e boa sensibilidade analítica.

SUGESTÕES PARA NOVOS TRABALHOS

Uso da metodologia proposta para determinação de outros compostos fenólicos de origem vegetal;

Determinação Voltamétrica de eugenol em amostras de fármacos comerciais, visando controle de qualidade;

Aplicação da metodologia na determinação de eugenol na urina de Odontólogos ou pessoas submetidas a contato prolongado em consultórios dentários;

Otimização do procedimento usando eletrodo quimicamente modificado, para verificação de desempenho na determinação de eugenol;

Estudo da cinética de reação e determinação do mecanismo de eletro-oxidação do eugenol contido em óleos vegetais;

Avaliação do comportamento eletro analítico do eugenol frente a outros tipos de eletrólitos com variação no pH do meio;

Promover a otimização do procedimento usando planejamento fatorial para melhorias do desempenho do método;

CAPITULO 6

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de e de ensaio e calibração. **ABNT**, 2ª ED. Rio de Janeiro-RJ. 2005. 31p.

ABNT ISO/IEC Guia 43-1/1999 Ensaio de Proficiência por Comparações Interlaboratoriais. ABNT, 1ª ED. Rio de Janeiro – RJ. 2005. 34 p.

AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. S. V.; NETO, A. A.; ARANHA, H. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processo de eletrodo. **Quím. Nova**. 2004, 27, 813.

ALEIXO, Luiz Manoel. VOLTAMETRIA: CONCEITOS E TÉCNICAS. Universidade Eustadual de Campinas – Instituto de Química. São Paulo. 1994. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com.br>>. Acesso em 14 de Janeiro de 2008.

ALFREDO, Edson, SOUZA, Emanuel Soares de, MARCHESAN, Melissa Andréia *et al.* Effect of eugenol-based endodontic cement on the adhesion of intraradicular posts. **Braz. Dent. J.** 17, no.2, p.130-133. 2006.

AMARAL, F.M.M.; COUTINHO, D.F.; RIBEIRO, M.N.S. & OLIVEIRA, M.A. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís, Maranhão. **Rev. Brasileira de Farmacognosia** 13(1): 27-30. 2003.

AMORIM, M. B., **Estudo da reatividade de derivados do safrol frente ao cloreto de alumínio**. 1989. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais), Núcleo de pesquisas de Produtos Naturais (NPPN), Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ.

BANCKHEET, E. Y. Micro determination of eugenol, thymol and vanillin in volatile oils and plants. **Pharmacognosy**, Department, Faculty of Pharmacy, Assiut University, Egypt. 9. 3. p. 134-140. 1998. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-565\(199805/06\)9:3<134::AID-PCA398>3.0.CO;2-9](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-565(199805/06)9:3<134::AID-PCA398>3.0.CO;2-9)> Acesso em: 18 jul 2007

BARCLAY, L.R.C.; XI, F. and NORRIS, J.Q. Antioxidant properties of phenolic lignin model compounds. **J. Wood. Chem. Technol.**, 17. P. 73 - 90, 1997.

BARD, J. A., FALKNER, L. R., *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*, **John Wiley & Sons**, New York, 1 ed., p. 121-155, 1980.

BRETT, O. M. A., BRETT, A. M., *Electrochemistry. Principles, Methods and Applications*, Oxford University Press, New York, 1 ed., p. 25, 13-138, 1993.

BARROS, N., Benício de; PIMENTEL, Maria Fernanda; ARAUJO, Mário César Ugolino. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Quím. Nova**, São Paulo, 25, n. 5, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01000422002000500024&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 19 Set 2007.

BENARROZ, M. O.; FONSECA, A. S.; ROCHA, G. S.; FRYDMAN, J. N. G.; ROCHA, V. C.; PEREIRA, M. O.; BERNARDO-FILHO, M. Cinnamomum zeylanicum extract on the radiolabelling of blood constituents and the morphometry of red blood cells: In vitro assay.

Applied Radiation and Isotopes, 66(2), 139-146. Publisher: Elsevier Ltd., CODEN: ARISEF ISSN: 0969-8043. **Journal written in English.** AN 2007:1467867 2008.

BIDOIA, E.D. & NOTOYA, E.Y. - Tratamento eletrolítico de efluente contendo fenol., *Arq.Inst.Biol.*, São Paulo, v.71, (supl.), p.1-749, 2004

BRETT, O. M. A., BRETT, A. M., *Electrochemistry. Principles, Methods and Applications*, Oxford University Press, NewYork, 1 ed., p. 25, 13-138, 1993

BROWN, C. J.; EATON R. A. Toxicity of chromated copper arsenate (CCA)-treated wood to non-target marine fouling communities in Langstone Harbour, **Portsmouth. Mar. Pollut. Bull.** 42 p. 310-318. 2001.

BROWN, P.D., MORRA, M.J. Glucosinolate-containing plant tissues as bioherbicides. **Agric. Food Chem.** 43(12). P. 3070 – 3074. 1995.

BROWN, P.D., MORRA, M.J., MCCAFFREY, J.P., AULD, D.L. & WILLIAMS III, L. Allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. **J. of Chemical Ecology**. 17. p.2021-2034. 1991.

BUFFLE, J.; TEECIER-WAEBER, M-L. Voltammetric environmental trace-metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements. **Trends in Analytical chemistry**, 24, p. 172-191, 2005.

CAI, L. and WU, C.D. Compounds from *Syzygium aromaticum* Possessing Growth Inhibitory Activity Against Oral Pathogens. **J. Nat. Prod.**, 59, 10, 987 - 990, 1996.

CAÑIGUERAL, S.; Dellacassa, E. & Bandoni, A.L. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿ indicadores de dependência o factores de desarrollo? **Acta Farmacéutica Bonaerense** 22(3): 265-278, 2003

CARDOSO. J. L. **Desenvolvimento de sistemas portáteis de monitoramento eletroquímico**. 2007. 146f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHUN, S-S., VATTEM, D.A., Lin, Y-T. and Shetty, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* . **Process Biochemistry**, 40. p.809-816. 2005.

CLEVINGER, J.F. Apparatus for volatile Oil Determination. **American Perfumer and Essential Oil Review**. p. 467-468, 1928

CLIFFORD, A.A., BASILE, A. & AL-SAIDI, S.H.R. A comparison of the extraction of clove buds with supercritical carbon dioxide and superheated water. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry** 364:635-637. 1999.

COHEN, B.I.; VOLOVICH, Y.; MUSIKANT, B.L.; DEUTSCH, A.S.; The effects of eugenol and epoxy-resin on the strength of a hybrid composite resin. **J Endodont.** 28 p.79-82. 2002.

COMNINELLIS, C. & PULGARIN, C. Anodic-oxidation of phenol for waste-water treatment. *J. Appl. Electrochem.*, v.21, p.703-708, 1991.

COSTA, Paulo R. R.. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 23, n. 3, 2000. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=ciarttext&pid=S010042200000300013&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 19 Out 2007.

COSTA, A. F. Farmacognosia. v. I, Fundação Calouste-Gulbenkian (3ª ed), Lisboa. 1975. 295p.

CRACKER, L.E.; Simon, J.E. Herbs, Species and Medicinal Plants. **Phoenix, Oryx Press**, v.1. 329p. 1987.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. de A.; ALENCAR, J. W. de. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza: UFC-Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, 1981. 210 p.

DANZER, K.; FRESENIUS **J. Anal. Chem.** 351, 30. 1995.

DELESPAUL, Q., BILLERBECK, V.G., ROQUES, C.G., MICHEL, G., MARQUIER-VINUALES, C. & BESSIERE, J.M. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. **J. of Essential Oil Research.** 12. p.256-266. 2000.

DISTASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**, São Paulo: Editora da UNESP, 1996, 230p.

DORMAN, H.J.D. & DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J. of Applied Microbiology** 88:308-316. 2000.

EL-HAG, E.A., EL-NADI, A.H. & ZAITOON, A.A.. Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). **Phytotherapy Research.** 13. p. 388-392. 1999.

EURACHEM/ CITAC, 3ª ed.,2003.**Guia para Expressão da Incerteza de Medição**. Versão Brasileira. Rio de Janeiro – RJ. 2003. 120p.

FERREIRA, M.; GIZ, M. J; FILHO, G. T. Estudo por microscopia de força atômica (AFM) do filme polimérico produzido durante a eletro-oxidação do fenol. In: **23ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2000, [Poços de Caldas – MG]. **Anais do 23ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química** [Poços de Caldas – MG]:[s.n.], 2000, p. 0259. Disponível em:
<<https://www.sbq.org.br/ranteriores/23/resumos/0259/index.htm>>. Acesso em 15 de outubro 2007.

FRANCISCO, M. S. P.; CARDOSO, W. S.; KUBOTA, L. T.; GUSHIKEM, Y. Eletrocatalytic oxidation of phenolic compounds using an electrode modified with Ni(II) porphyrin adsorbed on SiO₂/Nb₂O₅-phosphate synthesized by the sol-gel method. **J. of Electroanalytical Chemistry**: 602, 29-36. 2007.

FRIEDMAN, J. & WALLER, G.R.. Seeds as allelopathic agents. **J. of Chemical Ecology**. 9. p.1107-1117. 1983.

GALSTER, H.- *pH Measurements*. Ed. VCH; Weiheim; 1991.

GARZA PE, FERNÁNDEZ JML. Revista ADM, Asociación Dental Mexicana. FDIXXV Congresso Nacional e internacional. ADM 1998; 55: 46-50

GATTREL, M. and. KIRK, D. W. A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study of the Passive Film Produced during Aqueous Acidic Phenol Electro-oxidation **J. Electrochem. Soc.**, Volume 139, Issue 10, pp. 2736-2744 (October 1992)

GAYLOR, V. F., ELVING, P. J. and CONRAD, A. L. – Polarographic Oxidation of Phenolic Compounds. **Analytical Chemistry** 25, p.1078. 1953.

GIACOMELLI, F.C.; TIMBOLA, A. K.; GIACOMELLI, C.; LEAL, P. C.; SPINELLI, A. Estudos preliminares sobre a oxidação eletroquímica do eugenol e do bis- eugenol em meio hidro-alcoólico. In: **XI Encontro de Química da Região Sul**, 5., 2003, Pelotas, RS. **Anais do XI Encontro de Química da Região Sul** [Rio Grande do Sul], 2003.

GONCALVES, Debora. **Síntese, caracterização e propriedades de poliaminofenol e polimetoxianilina**. 1993. 208 f. **Dissertação (Mestrado) Instituto de Química de São Carlos**: UFSCar, CCET-Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia. Universidade de São Paulo, São Carlos, SP. 1993

GOSSSEL TA. Relieving the pain of toothache. **US-Pharm**. 11. p.23-4,28,31-2. 1986.

GOTTLIEB, Otto and MAGALHAES, Maurp .Communications Occurrence of 1-Nitro-2-phenylethane in *Ocotea pretiosa* and *Aniba canelilla*. **J. Org. Chem.**, 24, 12, p 2070 - 2071, 1959, 10.1021/jo01094a050. Disponível em: <http://pubs3.acs.org/acs/journals/toc.pageincoden=joceah&indecade=5&involume=24&inissue=12>> Acesso em: 22 setembro 2007.

GRAJOWER, R.; HIRSCHFELD, Z.; ZALKIND, M. Compatibility of a composite resin with pulp insulating material: a scanning electron microscope study. **J Prosthet Dent**. 32 p.70-7. 1974.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. Tradução de João Alberto Portela e Oswaldo Esteves Barcia. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. 2005, 876p.

HASLAM, E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action **J. Nat. Prod.**, 59, 2, p.205 - 215, 1996. Disponível em: http://pubs3.acs.org/acs/journals/doilookup?in_doi=10.1021/np960040%2b> Acesso em 12 Junho 2007.

HENDENBURG, J. F. and FREISER, H, - Anodic Voltammetry of Phenols – **Analytical Chemistry** 25, p. 1355 -1358. 1953

ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION . Q2A. **Text on validation of analytical procedures**, Geneva, March 1995.

IWAHASHI, O.; SYAMUSDIN, S., TATI S. and SASTRODIHARDJO, S.. Attractiveness of Methyl Eugenol to the Fruit Fly *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae) in Indonesia. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 89, n. 5, p. 653 - 660, 1996.

JHAM, G.N., DHINGRA, O.D., JARDIM, C.M. & VALENTE, V.M. Identification of the major fungitoxic component of cinnamon bark oil. **Fitopatologia Brasileira** v. 30:404-408. 2005.

JIROVETZ, L., BUCHBAUER, G., RUZICKA, J., Shafi, M. P., Rosamma, M. K. Analysis of *Cinnamomum zeylanicum* Blume leaf oil from south India. **J. Essent. Oil Res.**, 13: 442-443. 2001.

JULIAN, D.B. and RUBY, w.r. – “ The use of the Stationary Platinum microeletrode in the Determination of half-Wave potentials” – **J. of the American Chemical society** 72, 4719 (1950)

KAPLAN, A. E., PICCA, M., MACCHI, R. L. & MOLGATINI, S. L. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: an in vitro evaluation. **Endodontics and Dental Traumatology** .15, p. 42-45, 1999.

KISSINGER, P. T.; HEINEMAM W. R. Cyclic Voltammetry. **J. of Chemicals Education**, p. 702-706, 1983.

KOCHUMMEN, K.M.. *Family: Lauraceae, Tree Flora of Malaya*. v.4, p.124-132, Longmans, Kuala Lumpur (1989).

KOKETSU, Midori et al . Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** , Campinas, v. 17, n. 3, 1997 . Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611997000300017&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 19 janeiro 2007.

KUNTZE, E. K.; MOTHEO, A. J. A eletrooxidação de compostos modelo de lignina envolvendo eletrodos modificados com polianilina. In: **23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2000, Poços de Caldas. **23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2000.

LACATELLI, C. Heavy metals in matrices of food interest: Sequential Voltametry determination at trace and ultra trace level of copper, lead, cadmium, zinc, arsenic, selenium, manganese and iron in meals. **Eletroanalysis**.16. p.1478. 2004.

LEITE, F., Validação em análise química, São Paulo, **Ed. Átomo**, 4. p.159-243, 2002.

LIMA, M. P.; ZOGHBI, M. G.; ANDRADE, E. H. A. SILVE, T. M. D.; FERNANDES, C. S .Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Acta Amaz.** , Manaus, v. 35, n. 3, 2005 . Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-9672005000300009&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 25 outubro 2007

LINGARD, GL, DAVIES, EH, FRAUNHOFER, JAV. The interaction between lining materials and composite resinrestorative materials. **J Oral Rehabil.** 8. p.121-9. 1983.

LION CORPORATION, JAPAN. **Odorless and nonirritant cosmetics containing eugenol and its derivatives.** JP 09241116 A2. sep. 16, 1997.

MAEDA, J.A., BOVI, M.L.A., BOVI, O.A. & LAGO, A.A. Germination of clove seeds - effect of temperature, fruit pulp and fungicide treatment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** 26. p.893-899. 1991.

MALAFAIA, Osvaldo et al . Os fitoterápicos e seu potencial na cicatrização em cirurgia. Acta Cir. Bras. , São Paulo 2008 . Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01026502006000800001&lng=pt&nrm=iso . Acesso em: 17 Janeiro 2008.

MATOS, F.J.A. Farmácias vivas, 2ª ed. **Rev. E atual**, Fortaleza: EUFC, 184p. 1996.

MAZZAFERA, Paulo. Allelopathic effects of the alcoholic extract of clove and eugenol. **Rev. bras. Bot.**, v.26, n.2, ISSN 0100-8402. São Paulo. 2003.

MELO, Joabe Gomes de et al . Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). Acta Bot. Bras. , São Paulo, v. 21, n. 1, 2007 . Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01023062007000100004&lng=pt&nrm=iso . Acesso em: 20 dezembro 2007. doi: 10.1590/S0102-33062007000100004

MORALES, A.; RICHTER, P.; TORAL, M. 1., Voltammetric Behaviour of Nitrofurazone, Furazolidone and Other Nitro Dericatives of Biological Importance, **Analyst**, Cambridge, 112, p. 965-970, 1987.

MOREIRA, Ana Vlândia Bandeira; MANCINI-FILHO, Jorge. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. Rev. Nutr. , Campinas, 17, n. 4, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S14152732004000400002&lng=pt&nrm=iso . Acesso em: 17 Janeiro 2008.

MOUCHREK, Victor Elias Filho. **Estudos analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl.** 2000. 124 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP., 2000.

MYINT, S., DAUD, W.R., MOHAMAD, A.B., KADHUM, A.A.. Gas chromatographic determination of eugenol in ethanol extract of cloves, **J Chromatogr B Biomed. Appl.** 1996 Apr 26;679(1-2):193-5.

NASCIMENTO, G.G.F., LOCATELLI, J., FREITAS, P.C. & SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian J. of Microbiology** 31:247-256. 2000

NASCIMENTO, J.E.; LACERDA, E.U.; NASCIMENTO, V.T.; MELO, J.G.; ALVES, B.S.; SILVA, L.G.M.; RAMOS, M.A.; LIMA, C.S.A.; ALBUQUERQUE, U.P. & AMORIM, E.L.C. Produtos a base de plantas medicinais comercializados em Pernambuco – Nordeste do Brasil. **Acta Farmacêutica Bonaerense** 24(1): 113-122. 2005a

NASCIMENTO, V.T.; LACERDA, E.U.; MELO, J.G.; LIMA, C.S.A.; AMORIM, E.L.C. & ALBUQUERQUE, U.P. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). **Rev. Brasileira de Plantas Mediciniais** 7(3): 56-64. 2005b.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J. of Chromatography. A, Volume 1054, Issues 1-2**, 29. p. 95-111. October 2004,

NAKAMURA, C. V. ; UEDA-MAKAMURA.; BANDO, E.; MELO, A. F. N.; CORTEZ, D. A. G. & DIAS FILHO, B. P. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essencial oil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n.5. p.675-678, 1999

OLMSTEAD, M., HAMILTON, R., NICHOLSON, R. 5., Theory of cyclic voltammetry for a dimerization reaction initiated electrochemically, **Anal. Chem.**, Washington, vol. 41, p. 260-267, 1969.

OMS-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. ISSN: Boletim Informativo. Brasília: Ministério da Saúde, agosto 2002. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/farmacovigilancia/boletim_oms.htm>. Acesso em 04 ago. 2007.

ORTIZ, E.L. **The Encyclopedia of Herbs, Spices, and Flavourings**. Dorling Kindersley Publishers, London. 1992.

OUATTARA, B., SIMARD, R.E., HOLLEY, R.A., PIETTE, G.J.P. & BEGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International J. of Food Microbiology**. 37. p.155-162. 1997.

PAIGE, H.; HIRSCH, S.M.; GELB, M.N.. Effect of temporary cements on crow-to-composite resin core bond strength. **J Prosthet Dent**. 55. p. 49-52 1986.

PANTOJA, E, K. K.: **A eletrooxidação de compostos modelo de lignina envolvendo eletrodos modificados com polianilina**. 2000. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – USP - SC

Patel, Kirti; Ali, Sadaquat; Sotheeswaran, Subramanium; Dufour, Jean-Pierre. Composition of the leaf essential oil of *Cinnamomum verum* (Lauraceae) from Fiji Islands. **J. of Essential Oil-Bearing Plants**, 10(5), 374-377. Publisher: Har Krishan Bhalla & Sons, CODEN: JEOPFB ISSN: 0972-060X. 2007

PEUTZFELD, A.; ASMUSSEN, E. Influence of eugenol-containing temporary cement on the efficacy of dentin bonding systems. **Eur J Oral Sci**. 107. p.65-9. 1999.

PIERUCCI, Paola; MARONGIU, Bruno; PIRAS, Alessandra; PORCEDDA, Silvia; CASU, Rita. Comparative Analysis of Supercritical CO₂ Extract and Oil of *Pimenta dioica* Leaves. **J. Essent. Oil Res.**, 17, 530-532 (September/October 2005)

PINTO, A. C. . O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Quím. Nova**, Brasil,18, p. 608-615, 1995. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1995/vol18n6/v18_n6_16.pdf . Acessado em 04 jun 2007.

POLZIN, Gregory M; STANFILL, Stephen B; BROWN, Candace R; ASHLEY, David L; WATSON, Clifford H. Determination of eugenol, anethole, and coumarin in the mainstream cigarette smoke of Indonesian clove cigarettes. **Food and Chemical Toxicology** 45 1948–1953. 2007.

PRIEFERT, H., RABENHORST, J. & STEINBUCHER, A. Biotechnological production of vanillin. *Applied Microbiology Biotechnology*. 56. p. 296-314. 2001.

RAINA, V.K., SRIVASTAVA, S.K., AGGARWAL, K.K., SYAMASUNDAR, K.V. & KUMAR, S. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. **Flavour Fragrance Journal** 16:334-336. 2001.

RAO, Y. R., PAUL, S. C., DUTTA, P. K.. Major constituents of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*. **Indian Perfum.**, 32: 86-89.1988.

REISBICK, M.H.; BRODSKY, J.F. Strength parameters of composite resins. **J Prosthet Dent**. 26. p. 178-85.1971.

RICE, E. L. Allelopathy, 2nd ed. Academic Press, Orlando.1984.

RIEDER, A.; DORES, E. F. G. de C.; HIGA, N.; MORAES, M. P. L. de. Alterações no teor de matéria orgânica de solos e provável efeito no poder de proteção ambiental nas bordas do pantanal diante da poluição por pesticidas. **Pesticidas: R. Ecotox. E Meio Ambiente**, Curitiba, 10, jan./dez., p. 87-112, 2000

RIZZINI, C.T. & MORS, W.B. 1995. **Botânica Econômica Brasileira**. Rio janeiro, Âmbito Cultural Edições LTDA. 241p.

ROBBERS, James E.; Speedie, MARILYN K; TYLER, Varro E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology** Lippincott Williams & Wilkins, Jan. 1996, 337 p.

SABAA, Magdy W.; MOHAMED, Riham R. Organic thermal stabilizers for rigid poly(vinyl chloride). Part XIII: Eugenol (4-allyl-2-methoxy-phenol). **Polymer Degradation and Stability**, 92. p.587e595. 2007

SAFAVI, Afsaneh;MALEKI, Norouz and TAJABADI, Fariba. Highly stable electrochemical oxidation of phenolic compounds at carbon ionic liquid electrode. *Analyst*, 2007, 132, 54–58 **This journal is The Royal Society of Chemistry**. 2007. Disponível em: <http://www.rsc.org/ej/AN/2007/> Acesso em 04 de janeiro de 2008.

SANTOS, A. S.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; LUZ, A. I. R.; MAIA, J. G. S. Sesquiterpenes on Amazonian Piper Species. *Acta Amazonica*, 28, n. 2, p. 127-130, 1998.

SANTURIO, Janio Morais et al . Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de Salmonella enterica de origem avícola. Cienc. Rural , Santa Maria, 37, n. 3, 2007 . Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01034782007000300031&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 17 Janeiro 2008.

SENANAYAKE, U. M., LEE, T. H., WILLS, R. B. H. Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 822-824.1978.

SERRANO SHP; GIL, E. S. Métodos Eletroquímicos. In: Eric de Souza Gil. (Org.). Controle Físico Químico de Qualidade de Medicamentos. 1 ed. Campo Grande-MS: Uniderp, 22, p. 363-399.2005.

SHUOMINGSHU, Faming Zhuanli Shenqing Gongkai. **Traditional chinese medicine capsules with anti-inflammatory and analgesic effects.**), CODEN: CNXXEV CN101099833 A 20080109 Patent written in Chinese. Application: CN 1001-2194 20070719. AN 2008:46578. 2008

SILVA JR., ADEMÁRIO, Í. da; FILHO, H da C A.; SILVA, R C. Testes de desempenho de eletrodos: eletrodos de referência. *Química Nova* , São Paulo, 23, n. 4, 2000. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=01000422000000400014&lng=pt&nrm=iso Acesso em:19 Out 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre:Editora da UFSC, 1999, 821p.

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutr.* , Campinas., 15, n. 1, 2002. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141552732002000100008&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 19 Out 2007.

SOLOMONS,T.W. Graham. **Química Orgânica 2.** Tradução de Horacio Macedo. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 1996, 777p

SOUZA, André Rubio de et al . Influência do eugenol na microdureza da resina composta utilizando sistemas adesivos atuais. *Pesqui. Odontol. Bras.* , São Paulo,14, n. 3, 2000. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S15174912000000300009&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 19 Out 2007.

SOUSA, C. D.; TIMBOLA, A. K.; GIACOMELLI, C.;SPINELLI, A. Perfil voltamétrico de flavonóides com e sem o grupo –o-rutinosídeo no anel C. In: XI Encontro de Química da Região Sul, 5., 2003, Pelotas, RS. **Anais do XI Encontro de Química da Região Sul** [Rio Grande do Sul], 2003.

SOUZA, Djenaine de; MACHADO, Sergio A. S.; AVACA, Luis A.. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química. Nova**, São Paulo, 26, n. 1, 2003 . Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_rtext&pid=S01000422003000100015&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 19 Out 2007.

SQUELLA, J. A.; LETELIER, M. E.; LINDERMEYER, L.; NUNES-VERGARE, L. J., Redox behaviour of nifuroxazide: generation of the one-electron reduction product, **Chem. Biol. Interac.**, Oxford, 99, p. 227-238, 1996.

TAIZ, L. e ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre, Artmed Editora, 2004, 719 p.

THOMAS, J., GREETHA, K., SHYLARA, K. S. Studies on leaf oil and quality of *Cinnamomum zeylanicum*. **Indian Perfum.**, 31: 249-251. 1987.

TIKU, A. B., ABRAHAM, S. K., and KALE, R.K.,. Eugenol as an *in vivo* radioprotective agent. **Journal of Radiation Research**, 45. p. 435-440. 2004.

TIMBOLA, Ana K.; SOUZA, Cristine D., GIACOMELLI, Cristiano; SPINELLI, Almir. Electrochemical Oxidation of Quercetin in Hydro-Alcoholic Solution. **J. Braz. Chem. Soc.** 17, No. 1, 139-148, 2006

TSAO, R. & YU, Q. Nematicidal activity of monoterpenoid compounds against economically important nematodes in agriculture. **Journal of Essential Oil Research** 12:350-354. 2000.

USP - UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, Rockville, MD, p. 1776-1777, 1995. SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharm. Technol.** p.12-20, jun.1998.

VAN DER LINDER, W. E. and DIEKER, J. W. – “Glassy Carbon as Electrode Material in Electroanalytical Chemistry”. **Analytica Chimica Acta.** 119. p. 1. 1980.

VARIYAR, P. S., BANDYOPADHYAY, C. On some chemical aspects of *Cinnamomum zeylanicum*. **PAFAI J.**, 10: 35-38. 1989.

VERMILLION, F.J.J. and PEARL, I.A. Anodic Reactions of Simple Phenolic Compounds. **Journal of the Electrochem. Soc.**, 111, Issue 12, pp. 1392-1400 December 1964

VERNON, F; RICHARD, H. La canelle. In: Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles. Massy: CDIUPA, 1976. 2, p. 21-45 (CDIUPA. Serie Syntheses Bibliographiques, 10).

VIANA, M. J. G.; PALHANO, J. G. da; SANTOS, A. S.; MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Visualização de acesso às informações sobre plantas aromáticas da Amazônia: construção de banco de dados de espécies investigadas quanto a composição química de seus óleos essenciais. 47, n. 1. 1998. **Anais da Associação Brasileira de química**, p. 57-63.

VIEIRA, R.A. Validação científica de plantas medicinais como fator catalisador no desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional. **Revista Saúde e Ambiente** 2(1/2): 57-64, 2001.

VIM – Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de Metrologia : portaria INMETRO nº 029 de 1995 / INMETRO, SENAI - Departamento Nacional. 5. ed. 72 p.-- Rio de Janeiro: Ed. SENAI, 2007.

VOGEL A. I. **Análise inorgânica Quantitativa. Tradução de Horácio Macedo.**, Rio de Janeiro: LTC – livros Técnicos e Científicos S.A., 1992. 712p.

WALKER, J.T. & MELIN, J.B. *Mentha x piperita*, *Mentha spicata* and effects of their essential oils on *Meloidogyne* in soil. **Journal of Nematology** . 28. p.629-635. 1996.

WANG, J.; **Analytical Electrochemistry**; VCH Publishers: New York, 1994

WANG, J., **Analytical Electrochemistry**, 2º. Ed., Wiley-VHC, New York, p. 1-124, 2000.

Wazzan, al- K. A.; Harbi, al- A. A.; Hammad, I.A. The effect of eugenol-containing temporary cement on the bond strength of two resin composite core materials to dentin. **J Prosthodont**. 6. p.37-42. 1997.

WONG, T.T.Y.; MCLNNIS, D.O.; NISHIMOTO, J.I. Relationship of sexual maturation rate to response of Oriental fruit fly strains (Diptera: Tephritidae) to methyl eugenol. **J. Chem. Ecol.**, 15, n. 4, p. 1399 - 1405, 1989.

YUKAWA, T.A., KUROKAWA, M., SATO, H., YOSHIDA, Y., KAGEYAMA, S., HASEGAWA, T., NAMBA, T., IMAKITA, M., HOZUMI, T. & SHIRAKI, K. Prophylactic treatment of cytomegalovirus infection with traditional herbs. **Antiviral Research**. 32. p.63-70. 1996.

ZITTEL, H. E. and MILLER, F. J. – “A Glassy Carbon Electrode for Voltammetry”. **Analytical Chemistry** 37, 2. p. 200-203, .1965.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. Growing wild in the Brazilian Amazon. **Flavour and Fragrance Journal**, 13, p. 47-48. 1998a.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S. Volatile constituents of the resins from *Protium subserratum* (Engl.) Engl. And *Tetragastris panamensis* (Engl.) Kuntz. **Journal of Essential Oil Research**, 10, p. 325-326, 1998b.

SUGESTÕES PARA NOVOS TRABALHOS

Uso da metodologia proposta para determinação de outros compostos fenólicos de origem vegetal;

Determinação Voltamétrica de eugenol em amostras de fármacos comerciais, visando controle de qualidade;

Aplicação da metodologia na determinação de eugenol na urina de Odontólogos ou pessoas submetidas a contato prolongado em consultórios dentários;

Otimização do procedimento usando eletrodo quimicamente modificado, para verificação de desempenho na determinação de eugenol;

Estudo da cinética de reação e determinação do mecanismo de eletro-oxidação do eugenol contido em óleos vegetais;

Avaliação do comportamento eletro analítico do eugenol frente a outros tipos de eletrólitos com variação no pH do meio;

Promover a otimização do procedimento usando planejamento fatorial para melhorias do desempenho do método;

Cavalcante, Glene Henrique Rodrigues
Validação de método para determinação eletroanalítica de eugenol em
óleo essencial da espécie *Cinnamomum zeylamicum* (Canela)/ Glene
Henrique Rodrigues Cavalcante – 2008
86f.

Impresso por computador (fotocópia).
Orientador: Dr. Edmar Pereira Marques.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão,
Programa de Pós Graduação em Química Analítica, São Luís, 2008.

1. Canela - óleo essencial – determinação. 2. Cinnamomum
zeylanicum. 3. Eugenol. I. Marques, Edmar Pereira, orient.. II.
Título

CDU 633.833.543