

LEONARDO CURIEL ALVES

**CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Melaleuca armillaris***

Trabalho Final do Mestrado Profissional,
apresentado à Universidade do Vale do
Sapucaí, para obtenção do título de Mestre
em Ciências Aplicadas à Saúde.

**POUSO ALEGRE-MG
2020**

LEONARDO CURIEL ALVES

**CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Melaleuca armillaris***

Trabalho Final do Mestrado Profissional,
apresentado à Universidade do Vale do
Sapucaí, para obtenção do título de Mestre
em Ciências Aplicadas à Saúde.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Jaqueline Jóice Muniz

**POUSO ALEGRE-MG
2020**

Alves, Leonardo Curiel

Caracterização do Óleo de *Melaleuca armillaris* / Leonardo Curiel Alves. -- Pouso Alegre: UNIVÁS 2020.

X, 57f.: il

Trabalho Final do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde, Universidade do Vale do Sapucaí, 2020.

Título em Inglês: Characterization of *Melaleuca armillaris* oil

Orientadora: Prof^a. Dr^a Jaqueline Jóice Muniz

Melaleuca, 2. Óleos essenciais, 3. Análise Físico-Química, 4. Caracterização

I. Título

CDD - 615.321

UNIVERSIDADE DO VALE DO SAPUCAI

**MESTRADO PROFISSIONAL EM
CIENCIAS APLICADAS À SAÚDE**

COORDENADORA: Prof^ª. Dr^ª Adriana Rodrigues dos Anjos Mendonça

Linha de Atuação Científico-Tecnológica: Fitoterapia e Plantas Medicinais em Lesões Teciduais

DEDICATÓRIA

Primeiramente dedico meu trabalho a Deus que zelou por minha saúde e me deu tranquilidade para seguir o caminho.

Minha mãe Cleonice Curiel (*in memoriam*) que mesmo doente me deu um amor incondicional.

Minha avó Aparecida que me deu exemplo de garra e fibra para não desistir nos primeiros obstáculos.

Minha filha Laís que incontáveis vezes deixou de brincar e passear por minha ausência.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor JOSÉ DIAS DA SILVA NETO, Pró-reitor de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade do Vale do Sapucaí pelas excelentes aulas e ensinamentos repassados.

À Professora Doutora ADRIANA RODRIGUES DOS ANJOS MENDONÇA, Coordenadora do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde da UNIVÁS pelas orientações dentro da sala de aula, além da dedicação e competência com os alunos.

À Professora Doutora JAQUELINE JÓICE MUNIZ, Professora orientadora do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde da UNIVÁS, por me orientar neste trabalho, tendo uma visão crítica nas correções.

Ao Professor Doutor MANOEL ARAÚJO TEIXEIRA, por me ajudar no direcionamento da linha de atuação.

Aos Professores Doutores do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde da UNIVÁS, por toda a aprendizagem repassada durante as aulas.

Aos Funcionários da Secretaria do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde da UNIVÁS, em especial ao GUILHERME, por prestar todo o apoio necessário ao bom andamento das atividades do mestrado.

Aos Bibliotecários e demais colaboradores da UNIVÁS, em especial à Lucilene, pelas orientações na formatação do trabalho final.

À UNIÃO QUÍMICA FARMACÊUTICA NACIONAL, por incentivar meus estudos e me proporcionar inúmeros cursos aprimorando desta forma meus conhecimentos e desenvolvimento profissional. Em especial, à Farmacêutica Mestre JULIANA MOSCARDINI CHAVASCO e ao Farmacêutico Mestre FLAVIO APPOLINARIO.

À Empresa *WATERS CORPORATION* por acolher a ideia de Caracterização/Padronização do óleo de Melaleuca e me auxiliar nos testes mais complexos, em especial o Sr DAVIDSON OLIVEIRA e o Sr MICHAEL MURGU.

À Empresa *METROHM BRASIL*, por disponibilizar seus especialistas em espectroscopia e titulação potenciométrica durante a realização dos ensaios.

À Empresa Mettler Toledo por me dar suporte nos testes de Termogravimetria.

À *AGILENT TECHNOLOGY* por auxiliar na técnica de cromatografia gasosa.

À Empresa PARTITEC, por empregar seu instrumento de contagem de partícula mais preciso neste plano audacioso.

EPÍGRAFE

“Quando você cuida de alguém que realmente está precisando, você vira um herói. Porque o arquétipo de herói é a pessoa que se precisa, enfrenta a escuridão e segue com amor e coragem, pois, acredita que algo pode ser mudado para melhor.”

Patch Adams

SUMÁRIO

1. CONTEXTO.....	1
2. OBJETIVO.....	7
3.1 Delineamento do estudo	8
3.2 Extração do óleo de <i>Melaleuca armillaris</i>	8
3.3 Caracterização do óleo e Hidrolato de <i>Melaleuca armillaris</i>	9
3.3.1 Densidade.....	9
3.3.2 Análise de pH.....	10
3.3.3 Rotação específica	11
3.3.4 Índice de refração	12
3.3.5 Osmolaridade	14
3.3.6 Viscosidade	14
3.3.7 Contagem de partículas.....	15
3.3.8 Determinação de Umidade.....	17
3.3.9 Análise termogravimétrica.....	18
3.3.10 Identificação de componentes do óleo e Hidrolato de <i>Melaleuca armillaris</i> por Cromatografia	18
3.3.10.1 Cromatografia gasosa.....	18
3.3.10.2 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i> , HPLC)	21
3.3.11 Identificação de componentes do óleo de <i>Melaleuca armillaris</i> por Raman	23
3.3.12 Identificação de componentes do óleo de <i>Melaleuca armillaris</i> por NIR.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1 Descrição dos Resultados	35
4.2 Produto.....	37
5. DISCUSSÃO	38
5.1 Aplicabilidade.....	42
5.2 Impacto para a sociedade.....	42
6. CONCLUSÃO.....	43
7. REFERÊNCIAS.....	44
8. NORMAS ADOTADAS	49
9. APÊNDICE	50
10. FONTES CONSULTADAS.....	57

RESUMO

Contexto: O óleo de *Melaleuca armillaris* (*M. armillaris*) é aplicado em várias formulações farmacêuticas, proporcionando muitos benefícios nas áreas de saúde e estética. É amplamente utilizado como antibacteriano, antifúngico e cicatrizante em lesões teciduais. Entretanto, existem poucos estudos relacionados às características físico-químicas do óleo, o que leva a falta de padronização nos medicamentos e produtos que utilizam o mesmo como principal matéria-prima. **Objetivo:** Caracterizar o óleo essencial de *M. armillaris*. **Métodos:** A obtenção do óleo foi realizada por hidrodestilação, utilizando arraste a vapor. Para avaliar as características físico-químicas do óleo de *M. armillaris* foram empregados os testes: densidade, pH, rotação específica, índice de refração, osmolaridade, viscosidade, contagem de partículas, determinação de umidade e termogravimetria. Para identificar os componentes do óleo de *M. armillaris* foram realizadas as técnicas de: cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massa (HPLC), Raman e infravermelho próximo (NIR). Foi avaliado também os constituintes do hidrolato de *M. armillaris* obtido durante a hidrodestilação. **Resultados:** O óleo de *M. armillaris* apresentou densidade de 0,9146 g/mL, pH 4,36, Rotação específica 2,38, Índice de refração 1,45958, Viscosidade de 3 centipoise, 35901 Partículas $\geq 10\mu\text{m}$ e 1743 Partículas de tamanho entre 10 e 25 μm , Umidade 0,84%, Temperatura de decomposição de 115,19°C e Osmolaridade não foi detectada. Foram identificados 24 compostos por CG, sendo o principal deles o 1,8 cineol, e 145 substâncias químicas por HPLC. Na identificação por Raman obteve-se a transmitância do óleo em 785nm e, pela técnica de NIR, apresentou maior absorbância em 2350nm. No hidrolato de *M. armillaris*, foram detectados, por HPLC, 23 constituintes. **Conclusão:** O óleo de *M. armillaris* foi caracterizado através de análises físico-químicas, permitindo assim futuros estudos com os compostos encontrados e aumentando a possibilidade de aplicação em formulações farmacêuticas.

Palavras-chave: Melaleuca. Óleos Essenciais. Análise Físico-Química. Caracterização.

ABSTRACT

Context: *Melaleuca armillaris* oil (*M. armillaris*) is applied in several pharmaceutical formulations, providing many benefits for the areas of health and aesthetics. It is widely used as an antibacterial, antifungal and healing agent in tissue lesions, however, there are few studies related to the physical-chemical characteristics of the oil, which leads to a lack of standardization in medicines and products that use it as the main raw material. **Objective:** To characterize *M. armillaris* oil. **Methods:** The oil was obtained by hydrodistillation, using steam drag. The following tests were used to evaluate the physicochemical characteristics of *M. armillaris* oil: density, pH, specific rotation, refractive index, osmolarity, viscosity, particle count, assay water and thermogravimetry. To identify the components of *M. armillaris* oil, the following techniques were used: gas chromatography (GC), high performance liquid chromatography with mass detector (HPLC), Raman and near infrared (NIR). The constituents of the *M. armillaris* hydrolate obtained during hydrodistillation were also evaluated. **Results:** The *M. armillaris* oil presented density 0.9146 g/mL, pH 4.36, Specific rotation 2.38, Refractive index 1.45958, Viscosity 3 centipoise; 35901 particles $\geq 10\mu\text{m}$ and 1743 particles between 10 e $25\mu\text{m}$, Humidity: 0.84%, Decomposition temperature 115.19°C , and Osmolarity was not detected. Were identified 24 compounds by CG, being the main one the 1,8 cineol, and 145 chemical substances by HPLC. In Raman identification, the transmittance of the oil was obtained at 785nm and showed the highest absorption at 2350nm by NIR technique. In the *M. armillaris* hydrolate, 23 constituents were detected by HPLC. **Conclusion:** *M. armillaris* oil was characterized through physical-chemical analysis, thus allowing future studies with the compounds found, and increasing the possibility of application in pharmaceutical formulations.

Keywords: Melaleuca. Essencial oil. Chemical Physical Analysis.Characterization.

1. CONTEXTO

Os óleos essenciais ou óleos voláteis, como são conhecidos, são misturas de substâncias lipofílicas, produzidas por plantas aromáticas como parte de seu metabolismo. As características dos óleos tornam possível que os mesmos atuem como agentes de defesa contra insetos, atrativos de polinizadores e antimicrobianos em relação a algumas bactérias e fungos. O óleo é produzido em estruturas de secreção como tricomas glandulares, podendo ser armazenado em vários órgãos da planta, como raízes, rizomas, folhas, frutos e sementes. Tem solubilidade limitada em água, porém são facilmente dissolvidos em éter. São líquidos em temperatura ambiente, menos densos que a água e apresentam baixa estabilidade na presença de calor, luz e umidade (FURTADO *et al.*, 2017).

O crescente interesse em relação aos óleos essenciais deriva de sua capacidade biológica, que incluem efeitos antibacterianos e antioxidantes, dentre outras propriedades (ELMI *et al.*, 2019). Por sua forte fragrância, os óleos essenciais são muito utilizados na indústria como matéria-prima para a fabricação de medicamentos (FURTADO *et al.*, 2017).

Existem inúmeros conglomerados internacionais que negociam óleos essenciais, sendo os mais importantes empregados como matéria-prima para medicamentos, aromas e fragrância, cosméticos e essência para alimentos (BIZZO *et al.*, 2009).

Os óleos essenciais são utilizados com diversas finalidades, como por exemplo, o óleo extraído da copaibeira (*Copaifera langsdorffii*), que tem indicação da medicina tradicional para inúmeras finalidades, das mais diferentes naturezas, e tem sido alvo de estudos, visando novas terapias (PIERI *et al.*, 2009)

Do óleo das sementes do cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*), extrai-se o ácido eugênico, que é incolor e de sabor picante. Apresenta efeito anti-inflamatório e cicatrizante, utilizados no tratamento de náuseas, flatulências, indigestão e diarreia (SILVESTRI *et al.*, 2010).

A *Melaleuca armillaris* (*M. armillaris*) pertence à família Myrtaceae, é nativa da Austrália e Ilhas do Oceano Índico, com floração principalmente em áreas pantanosas próximas aos rios. O principal produto da *M. armillaris* é o óleo essencial *tea tree oil* (TTO), o qual possui ação antimicrobiana e antifúngica contra diversos patógenos humanos (BULDAIN *et al.*, 2018 ; FARAG *et al.*, 2004), sendo utilizado em formulações

tópicas (KONG *et al.*, 2019) e com ação antioxidante (FARAG *et al.*, 2004; CHABIR *et al.*, 2011; RIZK *et al.*, 2012). O TTO pode ser obtido a partir da hidrodestilação de ramos terminais e folhas e sua composição química varia com o método de extração e com a região de cultivo. Dentre os componentes do óleo essencial da espécie, o 1,8 cineol (eucaliptol) é o principal (aproximadamente 30% da composição), seguido pelo terpinen-4-ol (aproximadamente 19%). Estes dois terpenos são considerados como os responsáveis pelas propriedades terapêuticas do óleo essencial da *M. armillaris*. (RIZK *et al.*, 2012; FARAG *et al.*, 2004; BULDAIN *et al.*, 2018). Entre as várias propriedades do TTO, destacam-se sua ação bactericida, cicatrizante, expectorante, fungicida, anti-infecciosa, balsâmica, anti-inflamatória, antisséptica, antiviral, inseticida, imunoestimulante, e ações parasitocidas, antiacne e para tratamento de onicomicose (PAULIELLO *et al.*, 2019).

Na Austrália, estão os principais produtores do óleo essencial da planta, os quais são os principais responsáveis pela dominação das técnicas de cultivo. O mercado consumidor desse óleo está nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de limpeza, sendo os principais centros consumidores a América do Norte e a Europa (CASTRO *et al.*, 2005).

O óleo essencial obtido da *M. armillaris* tem propriedades que favorecem a penetração em tecidos, porém pode sofrer alterações de acordo com a umidade, exposição ao calor e presença de luz (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Outras espécies de Melaleuca incluem a *Melaleuca leucadendra* oriunda da Austrália, conhecida pela produção de óleos essenciais com aroma forte, em que é identificado um quimiotipo com predominância do composto (E)-nerolidol para os óleos de folhas, caule, flores e frutos, de importância no controle de pragas (SILVA *et al.*, 2020).

A *Melaleuca alternifolia* é nativa da Austrália, e o principal produto é o óleo essencial TTO considerado uma alternativa promissora no tratamento de estomatites causadas por próteses, problema recorrente em idosos (OLIVEIRA *et al.*, 2018; FELIPE *et al.*, 2018). Na segunda Guerra Mundial, os combatentes australianos utilizavam o óleo de *Melaleuca alternifolia* de forma tópica, no tratamento de feridas (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Essa espécie é estudada também devido seu efeito antimicrobiano contra patógenos orais, auxiliando na inibição e ação bactericida (GRAZIANO *et al.*, 2016).

Mediante a grande importância ecológica dos óleos voláteis para as plantas que os produzem e a aplicação clínica dos mesmos, há interesse da comunidade científica em investigar as características dos óleos essenciais e de seus constituintes químicos, mesmo com a eficácia comprovada (FURTADO *et al.*, 2017).

As técnicas de amostragem disponíveis hoje têm possibilitado a extração de óleo volátil a partir de quantidades cada vez menores de material vegetal. Por outro lado, apesar das várias atividades biológicas *in vitro* de óleos voláteis e de seus constituintes químicos na literatura, o número de estudos *in vivo*, sobretudo em humanos, ainda é muito pequeno (FURTADO *et al.*, 2017).

Produtos de origem sintética são a maioria nas indústrias farmacêuticas, porém atualmente a produção de medicamentos e produtos fitoterápicos está em ascensão (PAINE e ROE, 2018). Na indústria farmacêutica de medicamentos fitoterápicos, os princípios ativos de origem vegetal constituem o principal grupo de matéria-prima, e, portanto deve-se concentrar toda a atenção possível, sendo que a padronização botânica, qualidade química dos vegetais, verificação da pureza e técnica de extração adequada dos seus princípios ativos, são fatores imprescindíveis para a produção racional destes fitoterápicos (NUNES *et al.*, 2005).

Um dos métodos de extração mais utilizados para a obtenção de óleos voláteis em escala industrial é a destilação por arraste a vapor. Neste procedimento, o vapor de água produzido por um aquecedor separado do destilador é conduzido através de um tubo até encontrar o material vegetal e, devido à alta pressão e temperatura, o tempo de extração é menor. A mistura condensada de água e óleo é coletada em um frasco de vidro e devido à imiscibilidade podem ser facilmente coletados (FURTADO *et al.*, 2017).

A caracterização de matéria-prima vegetal é realizada pela correta qualificação do vegetal. Esse objetivo é alcançado através de adequado protocolo de coleta, de uma correta classificação farmacobotânica e, posteriormente, da determinação de outros parâmetros, como teor de metabólitos, resíduos e perfil qualitativo-cromatográfico (NUNES *et al.*, 2005).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2019), o profissional envolvido no desenvolvimento farmacotécnico deve conhecer amplamente as características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas da matéria-prima, selecionando os adjuvantes farmacotécnicos (excipientes) mais adequados, além de operações unitárias apropriadas para a fabricação.

Técnicas físico-químicas e de identificação são vastamente utilizadas para caracterização de matérias primas vegetais. Dentre elas, destaca-se a densidade, conceituada como a razão da massa de um corpo e de outro corpo definido como padrão, que, na maioria das vezes, é a água destilada (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

O potencial hidrogeniônico (pH) é definido como concentração de íons hidrogênio verificando a acidez presente em uma solução (MONTEIRO *et al.*, 2012).

A rotação específica ou polarimetria é uma técnica conveniente para diferenciar entre si isômeros opticamente ativos a partir da medida de rotação óptica de uma substância. Trata-se de um critério importante de identidade e pureza enantiomérica, podendo ser empregada para fins quantitativos (BRASIL, 2019).

O índice de refração de uma substância é a relação da velocidade da luz no ar e a velocidade da luz na substância. É valioso na identificação de substâncias e na detecção de impurezas. O índice de refração é empregado para caracterizar principalmente gorduras, óleos graxos, ceras, açúcares e solventes orgânicos, bem como alguns fármacos. É utilizado para determinar a pureza de óleos voláteis (BRASIL, 2019).

O teste de osmolalidade tem por finalidade a verificação da pressão osmótica que o óleo exerce sobre uma membrana, é uma forma prática que dá uma medida total da contribuição de vários solutos numa solução pela pressão osmótica da solução, utilizando o equipamento osmômetro (BRASIL, 2019).

Viscosidade é a expressão da resistência de líquidos ao escoamento, ou seja, reflete o deslocamento de parte de suas moléculas sobre moléculas vizinhas. A viscosidade dos líquidos vem do atrito interno, ou seja, das forças de coesão entre as moléculas relativamente juntas. Com o aumento da temperatura, aumenta a energia cinética média das moléculas, reduz o intervalo de tempo que as moléculas passam umas junto das outras, menos efetivas se tornam as forças intermoleculares e menor viscosidade (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

O material particulado consiste em partículas móveis não dissolvidas, além de bolhas de gás, presentes involuntariamente, e se encaixa em duas categorias gerais de fontes: extrínseco e intrínseco. O material extrínseco é aditivo, estranho e imutável, e não faz parte da formulação, geralmente não mudam ao longo da vida do produto. (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

Para a determinação de água em drogas vegetais são empregados três métodos: método gravimétrico (dessecação); método azeotrópico (destilação com tolueno) e método volumétrico (*Karl Fisher*) (BRASIL, 2019). Muitas matérias primas contêm água na forma adsorvida. Como característica, a determinação do teor de água é importante para estabelecer parâmetros de qualidade (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

A análise térmica é um conjunto de técnicas que possibilitam medir as propriedades físico-químicas de uma substância em função da temperatura, por exemplo, se há decomposição de componentes. As técnicas mais comumente utilizadas são as que medem as variações de energia ou de massa de uma substância. O aparelho pode ser

associado a um sistema que possibilita detectar e analisar os produtos voláteis (BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019).

Na análise termogravimétrica, a massa de uma amostra em uma atmosfera controlada é registrada continuamente, em função do tempo. A temperatura da amostra é elevada linearmente com o tempo e gera um gráfico chamado de curva de decomposição. Os fornos de equipamentos de termogravimetria (*thermogravimetric analysis*, TGA) podem variar desde a temperatura ambiente até 1000°C, embora alguns possam ser utilizados em temperaturas até 1600°C permitindo, assim, avaliar as propriedades térmicas da amostra e sua estabilidade (HOLLER *et al.*, 2009). Uma das principais aplicações da técnica é caracterizar matéria prima. (DECURSIO *et al.*, 2018).

As técnicas de separação cromatográfica são métodos em estágios múltiplos, nos quais os componentes de uma amostra são distribuídos entre duas fases, sendo uma denominada de estacionária e outra denominada de móvel. A fase estacionária pode ser empacotada em uma coluna, espalhada em uma camada ou distribuída como um filme. A fase móvel pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. A separação baseia-se na adsorção, distribuição em massa (partição) ou troca iônica, além de estar relacionada com as diferenças entre as propriedades físico-químicas da molécula e dos constituintes da fase estacionária, como tamanho, massa e volume (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

Raman é uma técnica espectroscópica vibracional e, portanto, está relacionada à espectroscopia de infravermelho (IR). Um espectro Raman é gerado pela excitação da amostra através de uma fonte monocromática, normalmente um laser. A espectroscopia Raman é vantajosa, pois medições rápidas e precisas geralmente podem ser feitas sem destruir a amostra e com preparação mínima ou inexistente (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

Um espectro de Raman raramente é suficiente para a identificação de um composto orgânico. Contudo, em conjunto com a espectrometria de massas e outras técnicas de identificação, torna-se uma ferramenta poderosa para caracterização de compostos puros. Os espectros são adquiridos, irradiando-se a amostra com uma fonte de laser monocromática visível ou equivalente ao IR próximo (ARVID *et al.*, 2009). As medições qualitativas de Raman fornecem informações espectrais sobre a estrutura molecular da amostra. Como o espectro Raman é específico para um determinado composto, as medições qualitativas podem ser usadas como um teste de identificação (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

O infravermelho próximo (*Near Infrared*, NIR) identifica uma amostra através de bandas. A faixa de leitura abrange o comprimento de onda curto que se estende de aproximadamente 780 a 1100 nm e comprimentos de onda mais longos, entre 1100 e 2500 nm. As aplicações da análise qualitativa incluem a identificação de matéria-prima, amostra em processo ou produto acabado. Geralmente, a técnica envolve a comparação de um espectro NIR de uma amostra com espectro de referência (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

O óleo de *M. armillaris*, apesar de sua eficácia comprovada, não possui todas as suas características físico-químicas elucidadas e, conseqüentemente, ainda não foi caracterizado para tal aplicação. Dessa maneira, faz-se necessário um estudo realize estes testes e, assim, atenda às necessidades do mercado interno e externo de matéria-prima vegetal.

2. OBJETIVO

Caracterizar e identificar de componentes do óleo essencial de *Melaleuca
armillaris*.

3. MÉTODOS

3.1 Locais de realização do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Botânica da Universidade do Vale do Sapucaí (UNIVÁS), no Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico da empresa União Química Farmacêutica Nacional, ambos localizados no município de Pouso Alegre-MG. Além disso, foram utilizados os laboratórios das empresas Agilent Technolog, Metrohm, Partitec, Mettler Toledo e Waters Corporation, situadas na cidade de São Paulo-SP.

3.2 Extração do óleo e do hidrolato de *Melaleuca armillaris*

A extração do óleo e do hidrolato de *M. armillaris* foi realizada por destilação, utilizando autoclave 2540 Greco e condensador, disponíveis no laboratório de botânica da UNIVAS.

Foram utilizados 5kg de folha seca de *M. armillaris* (Figura 1) para obtenção de 150 mL de óleo essencial. A autoclave, após atingir temperatura adequada, arrastou o vapor e óleo até o condensador (Figura 2), onde o mesmo foi circundado por uma lâmina de água, que fez os compostos saírem do estado gasoso e migrarem para o estado líquido. Os líquidos que não são solúveis entre si formam duas fases e o óleo, por apresentar densidade menor, fica na parte superior (Figura 3).



Figura 1. Folhas secas de *Melaleuca armillaris* para extração do óleo (Laboratório de Botânica – UNIVAS).



Figura 2. Condensador para separação por hidrodestilação de compostos voláteis do óleo de *Melaleuca armillaris* (Laboratório de Botânica – UNIVAS).



Figura 3. Separação das fases oleosa e aquosa do óleo de *Melaleuca armillaris* (Laboratório de Botânica – UNIVAS).

3.3 Caracterização físico-química do óleo de *Melaleuca armillaris*.

Para caracterizar o óleo de *M. armillaris* foram realizados os testes físico-químicos de densidade, pH, rotação específica, índice de refração, osmolaridade, viscosidade, contagem de partículas, determinação de teor água (umidade), termogravimetria e identificação dos componentes do óleo de *M. armillaris* por cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), Raman e NIRS. Esses testes são vastamente utilizados para matérias primas vegetais (BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019).

3.3.1 Densidade

O densímetro é um equipamento que fornece a densidade de líquidos sem a necessidade de balança, utilizando o princípio de Arquimedes, que baseia-se na

flutuabilidade. A calibração do equipamento é realizada a uma temperatura de referência e para confiabilidade do teste o equipamento deve estar devidamente limpo e seco. O instrumento é indicado para a determinação de densidades em líquidos puros ou de soluções de determinado soluto, sendo de extrema importância para a caracterização de materiais (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

O Densímetro 30 PX[®] (Mettler Toledo, Brasil) (Figura 4), utilizado no presente trabalho, é um instrumento de medição portátil adequado para determinação da densidade de líquidos utilizando o método do corpo oscilante. Os resultados são calculados e exibidos automaticamente juntamente com a identificação da amostra, temperatura, coeficiente de temperatura, data, hora e identificação do instrumento, podendo ser via interface infravermelha integrada, ser transferido para o computador ou uma impressora.

Antes de realizar o teste, foi avaliada a descrição do óleo que, segundo Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2019), deve ser um líquido incolor a amarelo pálido. Devido ao caráter oleoso da amostra, o instrumento foi ambientado com álcool isopropílico para evitar possível interferência da água residual utilizada para limpar o equipamento, e desta forma eliminar erros nos resultados, ressaltando a importância da rinsagem do equipamento com óleo a ser analisado. A leitura da amostra foi realizada no Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico da União Química Farmacêutica Nacional S/A.



Figura 4. Equipamento Densímetro 30 PX[®] (Mettler Toledo, Brasil) aspirando amostra (União Química Farmacêutica Nacional S/A- Unidade de Pouso Alegre).

3.3.2 Análise de pH

Para avaliação do pH do óleo de *M. armillaris*, foi utilizado o equipamento pHmetro modelo 913 (Metrohm, Estados Unidos) (Figura 5). Uma alíquota da amostra de aproximadamente 20mL foi introduzida em um béquer de 50mL. Em seguida, o eletrodo que estava submerso em uma solução de cloreto de potássio (KCl) 3 molar (M), foi lavado com água ultrapurificada e o orifício superior foi aberto para equilibrar a pressão no interior do eletrodo e permitir a leitura. Posteriormente, o bulbo do eletrodo foi imerso na amostra e a medida de pH realizada. Para dar confiabilidade ao teste, o equipamento foi calibrado com tampões de pH 4, 7 e 9 e os resultados obtidos para pH assimétrico e *slope*, que são parâmetros utilizados para medir sensibilidade e eficiência do eletrodo.



Figura 5. pHmetro modelo 913 (Metrohm, Estados Unidos) (União Química Farmacêutica Nacional S/A- Unidade de Pouso Alegre).

3.3.3 Rotação específica

O teste de rotação específica, ou rotação óptica, foi realizado como complemento para identificação de componentes do óleo de *M. armillaris* e através dele foi determinado desvio angular fornecido pela amostra, sendo o equipamento utilizado para a execução do teste um polarímetro ADP220 Alemmar® (Bellingham & Stanley, Estados Unidos) (Figura 6).

A leitura foi realizada de forma direta, sem nenhum preparo da amostra, e o teste executado no Laboratório de Controle de Qualidade Físico Químico da União Química Farmacêutica Nacional S/A em equipamento devidamente calibrado. A temperatura da amostra foi mensurada, pois a mesma deve ser realizada a 20°C.

Antes do início do teste, foi realizado um “autozero” no equipamento utilizando ar e posteriormente a amostra foi inserida dentro do tubo de vidro, próprio do

equipamento, e colocada na câmara de leitura (Figura 7). O *display* do equipamento, após alguns segundos, forneceu o valor do ângulo de rotação, permitindo medir o valor da luz polarizada. A rotação específica é calculada levando em consideração a umidade da matéria prima (BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019).



Figura 6. Polarímetro ADP220 Alemmar[®] (*Bellingham & Stanley*, Estados Unidos) (União Química Farmacêutica Nacional S/A- Unidade de Pouso Alegre).



Figura 7. Compartimento de amostra do polarímetro ADP220 Alemmar[®] (*Bellingham & Stanley*, Estados Unidos) (União Química Farmacêutica Nacional S/A- Unidade de Pouso Alegre).

3.3.4 Índice de refração

Para atingir a precisão teórica de 0,0001, erro máximo permitido entre o valor teórico e o valor obtido, é necessário calibrar o instrumento contra um padrão fornecido pelo fabricante e verificar frequentemente o controle de temperatura e o instrumento, determinando o índice de refração de água destilada, que é 1,3330 em 20°C, 1,3325 aos

25°C; embora a temperatura padrão para medidas farmacopéica seja 25°C, muitas das especificações de índice de refração nas monografias individuais pedem a determinação do valor em 20°C. A temperatura deve ser cuidadosamente ajustada e mantida, uma vez que o índice de refração varia significativamente com a temperatura (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

O teste foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade Físico Químico da União Química Farmacêutica Nacional S/A e, antes da realização da análise, o refratômetro digital automático ATAGO RX 5000 ALPHA (Cetec, Brasil) passou por uma verificação utilizando água a 25°C (Figura 8).

Após preenchimento de todo o orifício e ajuste da temperatura no *display*, realizou-se a verificação e posteriormente a leitura da amostra (Figura 9).



Figura 6. Refratômetro digital automático ATAGO RX 5000 ALPHA (Cetec, Brasil) (União Química Farmacêutica Nacional S/A- Unidade de Pouso Alegre).



Figura 7. *Display* do equipamento refratômetro digital automático ATAGO RX 5000 ALPHA (Cetec, Brasil) com as informações da calibração realizada com água (União Química Farmacêutica Nacional - Unidade de Pouso Alegre).

3.3.5 Osmolaridade

O equipamento para avaliação de osmolaridade consiste de um contêiner refrigerado para a medida, sistema de medição de temperatura munido de um termosensor (termopar) e dispositivo de medição de diferentes potenciais que são convertidos em medidas de osmolaridade (BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019).

O osmômetro utilizado foi o Vapro modelo 5520 (Wescor, Estados Unidos), que foi calibrado com padrão de 290mmol/kg, 100mmol/kg e 1000mmol/kg, para assegurar precisão do resultado (Figura 10). A limpeza do termopar do equipamento foi realizada com água e posteriormente com uma solução de hidróxido de amônio 10M. Para realizar a leitura do óleo de *M. armillaris* empregou-se uma pipeta de *Pausteur* com capacidade para aspirar 10ul, volume este dispensado no orifício metálico do equipamento. Após inserção da amostra, a membrana de papel foi recolhida pelo equipamento para leitura no termopar.



Figura 8. Osmômetro Vapro modelo 5520 (Wescor, Estados Unidos) (União Química Farmacêutica Nacional S/A-Unidade de Pouso Alegre).

3.3.6 Viscosidade

O teste de viscosidade foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade Físico Químico da União Química Farmacêutica Nacional S/A. O equipamento utilizado foi viscosímetro BROOKFIELD modelo LVDV (BrasEq, Brasil), que através de um *display* permite que seja ajustada a rotação por minuto e tipo de acessório rotacional utilizado para determinação (*Spindle*). O equipamento foi ajustado para uma velocidade

de 10 rotações por minuto (RPM), e posteriormente foi realizado auto ajuste para certificar que não haveria nenhum tipo de interferência, em seguida foi selecionado o *spindle* número 34 (Figura 11). A unidade dinâmica análoga do Sistema Internacional de Unidades (SI) para viscosidade é o *centipoise* (BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019).



Figura 9. Acessório *Spindle* 34 utilizado no viscosímetro BROOKFIELD modelo LVDV (BrasEq, Brasil) (União Química Farmacêutica Nacional S/A - Unidade de Pouso Alegre).

3.3.7 Contagem de partículas

Foi utilizado um contador de partículas com funcionamento baseado no princípio de bloqueio de luz, que possibilita determinação do tamanho das partículas e seu número conforme suas dimensões.

O contador HIAC, modelo 8000A (fabricante Hach, Brasil) realiza a leitura com auxílio de um amostrador acoplado, sugando 5 ml por 3 vezes, descartando a primeira leitura e realizando os cálculos com as outras duas (Figura 12).

Dos canais de leitura, um canal fornece resultados para partículas menores que 10 μ m e outras partículas maiores que 25 μ m. Foram utilizadas membranas Millex de característica lipofílica com tamanho de 0,22 e 0,45 μ m, que eram substituídas a cada 5mL de óleo filtrado.



Figura 10. Contador de partículas HIAC, modelo 8000A (fabricante Hach, Brasil) (União Química Farmacêutica Nacional S/A- Unidade de Pouso Alegre).

Devido ao alto número de partículas encontradas no óleo foi realizada a filtração, pois o material particulado pode ter indício de contaminação oriundo do processo de extração, manipulação após a coleta ou poluição. O óleo foi filtrado com membranas filtrantes de $0,22\ \mu\text{m}$ e $0,45\ \mu\text{m}$ (marca Millipore[®], Brasil) (Figura 13 e 14) e direcionado a um equipamento (empresa Partitec) com 16 canais de detecção de partículas (Figura 15).



Figura 11. Filtração do óleo de *Melaleuca armillaris* com membrana lipofílica (Millipore[®], Brasil) (Laboratório de botânica - UNIVÁS).



Figura 14. Amostras do óleo de *Melaleuca armillaris* após filtração (Laboratório de botânica- UNIVÁS).



Figura 15. Equipamento Klotz (Laboratório da empresa Partitec).

3.3.8 Determinação de Umidade

A análise de Umidade foi realizada no laboratório da empresa *Metrohm* utilizando o equipamento *Karl Fischer 915 KF Ti-Touch*[®] (fabricante Metrohm, Suíça). Antes de iniciar a realização da análise, o equipamento foi condicionado com solução de *Karl Fischer* para equilíbrio e eliminação de água.

A análise foi realizada em duplicata para minimizar risco de possíveis erros analíticos. A quantidade pesada para a primeira amostra foi 1,3831 gramas e para a segunda amostra foi 1,3743 gramas. No momento em que a titulação começou um gráfico de volume por tempo foi fornecido pelo *software* acoplado no equipamento e após alguns minutos ocorreu formação da inflexão da curva e volume constante, desta forma os resultados foram exibidos pelo programa.

3.3.9 Análise termogravimétrica

A análise foi realizada no laboratório da empresa Mettler Toledo, o modelo do equipamento utilizado foi o TGA, DSC[®] (fabricante Mettler Toledo, Estados Unidos) (Figura 16). A amostra foi depositada em uma pequena panela feita de platina e a temperatura do equipamento foi programada. Posteriormente, 80,3182 mg da amostra foi inserida no equipamento e o mesmo foi programado com uma variação de temperatura de 30°C até 600°C com taxa de aquecimento de 10°C por minuto.



Figura 16. Equipamento TGA, DSC[®] (Mettler Toledo, Estados Unidos), utilizado para o teste de termogravimetria.

3.3.10 Identificação de componentes do óleo e Hidrolato de *Melaleuca armillaris* por Cromatografia

Diversas técnicas são utilizadas para a separação e identificação dos constituintes dos óleos. No presente estudo foram utilizadas cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa, sendo que a escolha é dependente da complexidade e quantidade de amostras do óleo a ser analisado. Para óleos pouco complexos utiliza-se a cromatografia líquida de alta eficiência, e para a separação dos óleos voláteis a técnica mais utilizada é a cromatografia gasosa (FURTADO *et al.*, 2017).

3.3.10.1 Cromatografia gasosa

No presente estudo foi elaborado um novo método de identificação do óleo de *M. armillaris* por cromatografia gasosa. Foi utilizado como método comparativo o desenvolvido no estudo de Falci *et al.*, 2015.

Foi desenvolvido um método que apresentou perfil cromatográfico semelhante ao demonstrado na literatura, porém com tempo e risco de contaminação reduzidos, denominado *Carrier over*, utilizando *Flame ionization detector*, já que o método comparativo utilizou detector seletivo de massas.

A identificação dos compostos do óleo foi realizada no laboratório da empresa *Agilent Technology* através de método desenvolvido sem utilização de *headspace*, utilizando amostrador modelo 7693, *Agilent*[®] (Estados Unidos) (Figuras 17-22). O solvente utilizado para a extração dos componentes do óleo foi o diclorometano marca: *Merck*/ lote: K51006944911, sendo indispensável à utilização de *vials* de 2mls de vidro sem cortes no septo para que o solvente e os analitos não sofressem perdas significativas de componentes. As condições cromatográficas para o novo método estão descritas no Quadro 1.



Figura 17. Cromatógrafo Gasoso modelo 7890B *Agilent*[®] (*Estados Unidos*) (Laboratório científico *Agilent Technology*).



Figura 18. Amostrador para cromatografia gasosa modelo 7693 *Agilent*[®], *Estados Unidos* (Laboratório científico *Agilent Technology*).

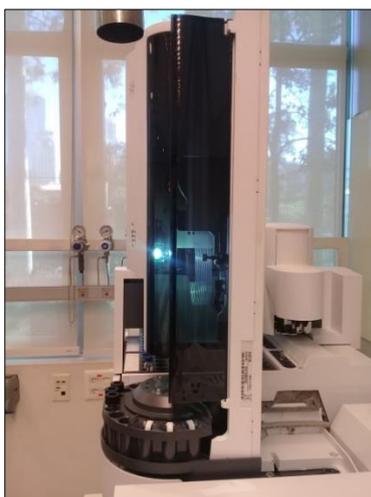


Figura 19. Amostrador para cromatografia gasosa modelo G4513, *Agilent*[®], Estados Unidos (Laboratório científico *Agilent Technology*).

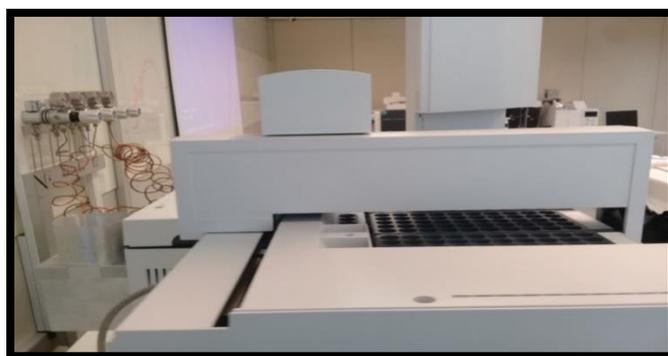


Figura 20. Rack de *vials* do amostrador G4513, *Agilent*[®], Estados Unidos (Laboratório científico *Agilent Technology*).



Figura 21. Linha de gases: Hidrogênio, Nitrogênio, Hélio e Ar sintético para cromatografia gasosa (Laboratório científico *Agilent Technology*).

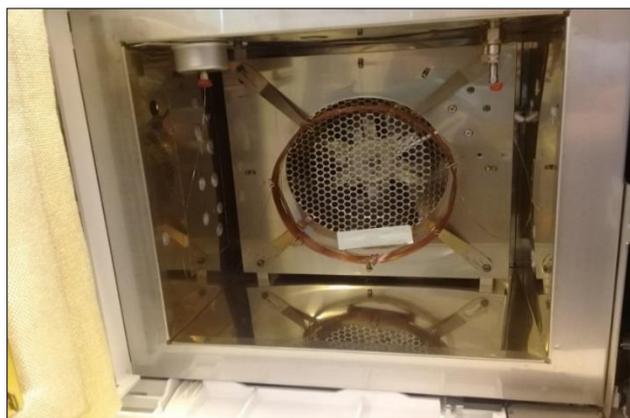


Figura 22. Coluna cromatográfica *Agilent* ligada no forno do equipamento de cromatografia gasosa (Laboratório científico *Agilent Technology*).

Quadro 1: Parâmetros da Cromatografia Gasosa para análise do óleo de *Melaleuca armillaris*

Volume de ar amostrado: 0,2 μ L
Coluna: DB 5 - 30m x 320 μ m x 0,25 μ m
Gas Carreador: HE (Pureza:99,9999):
Injetor: 260C,
Forno: 0min >200°C (7,5°C/min); 250°C (0 min) >250°C (15°C/min); (0 min)
Tempo de corrida: 26 min
Detector: Detector de chama
Temperatura de aquecimento do vial: 80 °C
Tempo de aquecimento do vial: 1 minuto
Modo: Divisão (Split)
Razão da Divisão: 5:1
Profundidade da agulha no frasco: 15mm
Amostra: A amostra foi dissolvida em diclorometano 1:1

3.3.10.2 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (*High performance liquid chromatography, HPLC*)

Para realizar a identificação dos compostos do óleo e do hidrolato de *M. armillaris*, foi utilizada cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas.

Comparou-se o cromatograma obtido com uma biblioteca de 6000 compostos do próprio equipamento, auxiliando assim a identificação de outras substâncias.

A análise de cromatografia líquida foi realizada no laboratório de aplicação da empresa *Waters Corporation*. O equipamento utilizado foi o *ACQUITY H-class UPLC, XEVO®* (Fabricante *Waters*, Estados Unidos) (Figura 23). As condições cromatográficas foram elaboradas nesse estudo e estão descritas nos Quadros 2-4.



Figura 23. Cromatógrafo líquido com espectrômetro de massas AcquityH G2 XS qtof®

Quadro 2. Parâmetros da Cromatografia Líquida de Alta eficiência para análise do óleo de *Melaleuca armillaris*

Coluna	Acquity HCLASS UPLC HSS T3 2.1 X100MM, 1.8um
Temperatura da coluna	40°C
Volume de injeção	0,3 -1,0 µL
Fase móvel A	AGUA + 0,1% de Ácido fórmico V / V
Fase móvel B	METANOL + 0,1% de Ácido fórmico V / V
Purga da agulha	AGUA + 0,1% de Ácido fórmico V / V
Lavagem da agulha	ACETONITRILA + 0,1% de Ácido fórmico V / V
Lavagem do selo	AGUA, METANOL 80: 20 V / V
Fluxo	0,5 Gradiente

Quadro 3. Parâmetros de gradiente utilizando cromatógrafo líquido para análise do óleo de *Melaleuca armillaris*.

Tempo (minutos)	Fluxo (ml/min)	Canal A	Canal B
Inicial	0,5	99,0	1
7,5	0,5	99,0	1
8,0	0,5	1,0	99,0
8,1	0,5	1,0	99,0
10,0	0,5	99,0	1

Quadro 4. Parâmetros da corrida utilizando detector de massas para análise do óleo de *Melaleuca armillaris*.

Detector utilizado	Espectrômetro de massas Leu- Enk (M+H), M/Z 556.2771
Lockmass	01 s a cada 15 s
Software	MassLynx 4.1 Unifi 1.8
Modo de detecção	Detector de ionização
Tempo de Varredura	0,2 s/spectro

A análise de cromatografia líquida utilizando detector de espectrômetro de massas foi realizada utilizando o *software Mass lynx 4.1 UNIFI 1.8*. As amostras foram injetadas sem a utilização de diluente e a fase móvel utilizada foi água e ácido fosfórico, o referido reagente tem a capacidade de separar os íons. As identificações foram realizadas através de um espectrômetro de massas que converte a molécula em íons que são separados no espectrômetro de acordo com a razão massa sobre carga.

3.3.11 Identificação de componentes do óleo de *Melaleuca armillaris* por Raman

O teste foi realizado no laboratório da empresa *Metrohm*. O equipamento utilizado foi o Raman, modelo Mira M3 (fabricante Metrohm, Estados Unidos) (Figura 24). A amostra foi introduzida em um *vial* próprio para o equipamento e posteriormente colocada em um compartimento para a leitura.



Figura 24. Raman, modelo Mira M3 (fabricante Metrohm, Estados Unidos)

3.3.12 Identificação de componentes do óleo de *Melaleuca armillaris* por NIR

O teste foi realizado no laboratório da empresa *Metrohm* utilizando equipamento de espectroscopia de infravermelho próximo Modelo NIRS XDS[®] (fabricante Metrohm, Estados Unidos) (Figura 25). Foi introduzida na *probe* do *laser* uma ponteira própria para a leitura de amostras líquidas utilizando um anel de acordo com a viscosidade do óleo e posteriormente realizou-se leitura espectral do óleo da *M. armillaris*.

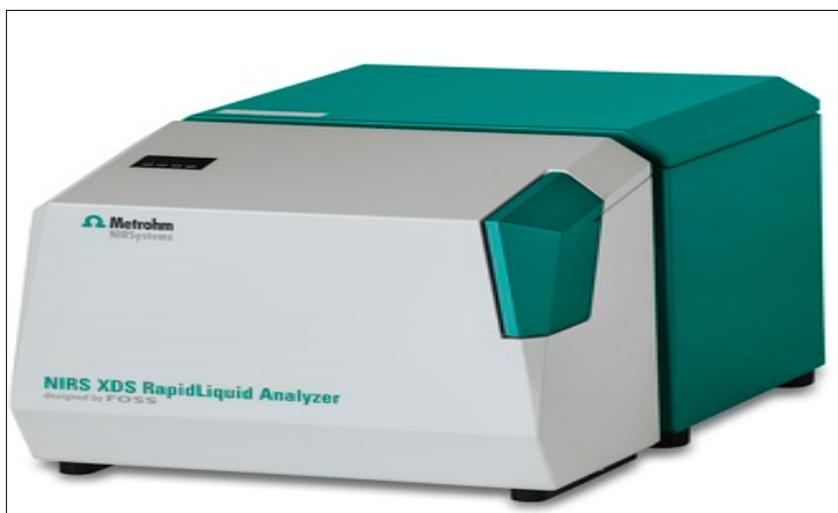


Figura 25. Equipamento de espectroscopia de infravermelho próximo Modelo NIRS XDS[®] (fabricante Metrohm, Estados Unidos)

4. RESULTADOS

4.1 Descrição dos resultados

O óleo de *M. armillaris* extraído foi submetido a análises físico-químicas que possibilitaram traçar características e padrões de trabalho desta matéria-prima. Além disso, o hidrolato obtido na extração, foi avaliado quanto a seus componentes (Tabela 1).

Tabela 1. Características físico-químicas do óleo de *Melaleuca armillaris*

Parâmetro	Resultado
Densidade	0,9146g/mL
pH	4,36
Rotação específica	2,38°
Índice de refração	1,45958
Osmolaridade	Não detectada
Viscosidade	3 centipoise
Número de partículas $\geq 10\mu\text{m}$	35901
Número de partículas entre 10 e 25 μm	1743
Umidade	0,84%
Temperatura de decomposição	115,19°C
Identificação por CG	24 compostos ^a
Identificação por HPLC (óleo <i>M. armillaris</i>)	145 moléculas ^b
Identificação por HPLC (hidrolato <i>M. armillaris</i>)	23 moléculas ^c
Identificação por RAMAN	Absorção em 785nm
Identificação por NIR	Absorção em 2350nm

CG: Cromatografia Gasosa

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High performance liquid chromatography*)

NIR: Infravermelho próximo (*Near infrared*)

^a = descritos na Tabela 2

^b = descritos na Tabela 3

^c = descritos na Tabela 4

O valor de densidade da *M. armillaris* avaliado em Densímetro 30PX foi de 0,9146g/mL obtida com uma temperatura de 20,3° C (Apêndice 1). Para o teste de pH o valor obtido foi de 4,36 em uma temperatura de 25°C (Apêndice 2). O teste de rotação específica apresentou valor de 2,38°. O resultado do teste foi obtido através de cálculo realizado na base anidra (Apêndice 3), conforme preconizado em Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2019). O valor obtido para teste de índice de refração da água, utilizada como substância de calibração do instrumento foi de 1,33250, conforme leitura demonstrada na figura 9 e o resultado para o óleo de *M. armillaris* foi de 1,45958

(Apêndice 4). Para o teste de osmolaridade o sensor do equipamento conhecido como termopar ou *termocouple* não detectou oscilação em seu capilar, não sendo possível medir a osmolaridade do óleo. Foi encontrado para o teste de viscosidade um resultado de 3 centipoise. Para o teste de contagem de partículas foi obtido um resultado de 35901 de partículas maiores que 10 μm e 1743 para partículas entre 10 e 25 μm (Apêndice 5). Foram utilizadas membranas com poros de filtração de tamanho 0,45 μm (Apêndice 6) e 0,22 μm (Apêndice 7) e houve maior retenção de material particulado utilizando membrana 0,22 μm .

Ao se utilizar o teste Karl Fisher para determinação do teor de água (umidade), obteve-se o valor de 0,84% (Apêndice 8).

Foi observado, a partir da utilização do teste de Termogravimetria, que os componentes do óleo de *M. armillaris* se decompõem a partir de 115,19°C (Apêndice 9).

O teste de identificação dos compostos do óleo de *M. armillaris* por cromatografia gasosa com o método desenvolvido no presente estudo identificou 24 compostos, observados como picos nos cromatogramas. A Figura 26 destaca o pico do 1,8 Cineol, o principal componente do óleo de *M. armillaris*. A Figura 27 ilustra a quantificação de todos os picos do óleo de *M. armillaris*, incluindo o 1,8 Cineol (eucaliptol). Na Tabela 2 estão presentes as informações dos compostos detectados no óleo de *M. armillaris*. O tempo de retenção (TR) é o momento (em minutos) em que cada componente do óleo de *M. armillaris* foi observado como pico na cromatografia gasosa; o tempo de retenção relativo é em referência ao pico principal (1,8 cineol); a porcentagem na amostra (%A) é a quantidade do composto observada no óleo de *M. armillaris*. Os compostos foram nomeados de acordo com as informações contidas na literatura (Falci *et al*, 2015).

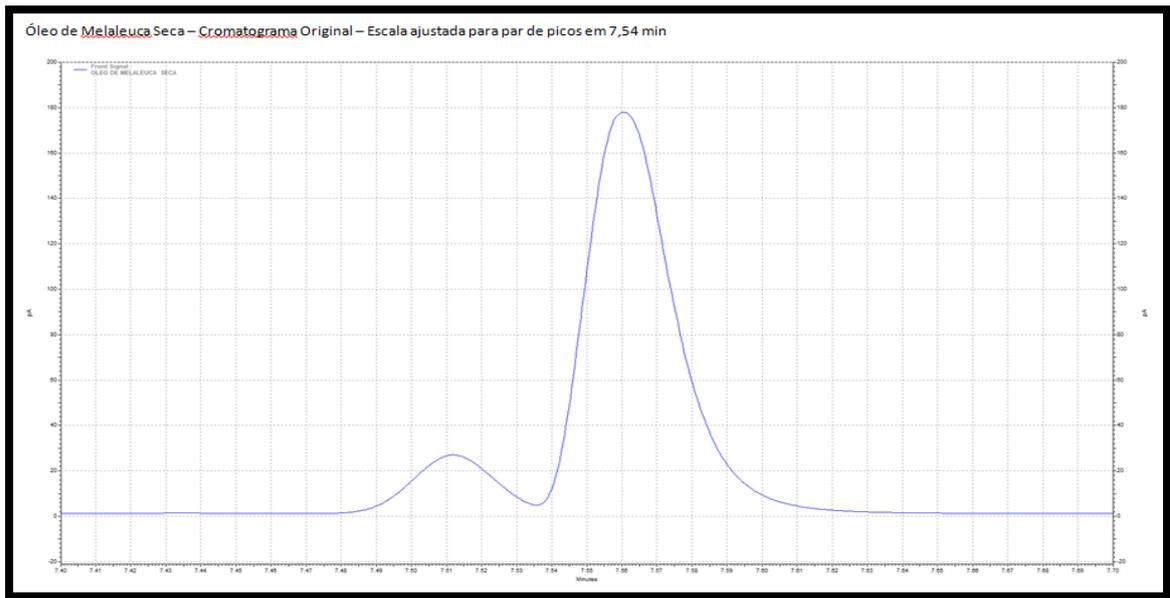


Figura 26. Cromatograma do óleo de *Melaleuca armillaris* destacando o pico de 1,8 Cineol.

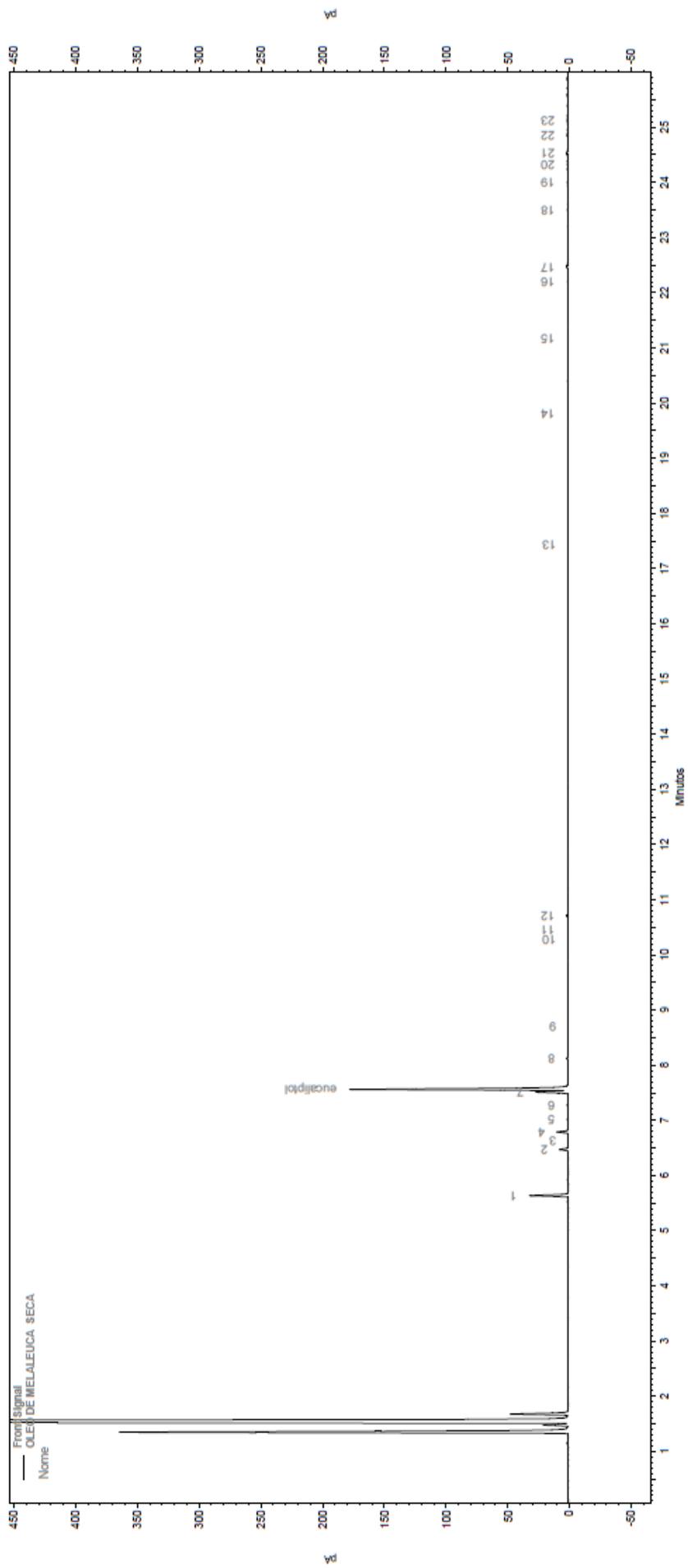


Figura 27. Cromatograma do óleo de *Melaleuca armillaris* com todos os picos obtidos

Tabela 2. Compostos detectados no óleo de *Melaleuca armillaris* utilizando cromatografia gasosa

Pico	TR (minutos)	TR relativo	Nome do composto	%A
1	5,64	0,75	Trimetil biciclico hepteno	11,63
2	6,47	0,86	Dimetil metileno biciclico heptano	2,58
3	6,64	0,88	Mirceno	0,04
4	6,79	0,90	Metileno metiletenil ciclohexano	3,28
5	7,02	0,93	Metil metiletilideno ciclohexano	0,22
6	7,28	0,96	Tetrametil benzeno	0,23
7	7,51	0,99	Limonemo	9,42
8	7,56	1,00	Eucaliptol	69,70
9	8,12	1,07	Terpineno	0,41
10	8,70	1,15	Isopropilideno metil biciclico hexano	0,08
11	10,28	1,36	Terpineol isômero	0,02
12	10,45	1,38	Terpineol isômero	0,09
13	10,70	1,42	Terpineol isômero	0,45
14	17,43	2,31	Decahidro trimetil metileno	0,12
15	19,81	2,62	Ciclopropuzuleno	0,06
16	21,17	2,80	Aloaromadendreno	0,05
17	22,20	2,94	Octahidro tetrametil ciclopropazuleno	0,10
18	22,47	2,97	Hexahidro Dimetil metil etil naftaleno	0,66
19	23,50	3,11	desconhecido	0,08
20	24,00	3,17	desconhecido	0,05
21	24,32	3,22	Globulol	0,09
22	24,53	3,24	Octahidro Dimetil metil etenil azuleno	0,38
23	24,85	3,29	Eudesmol	0,12
24	25,12	3,32	Hexahidro Dimetil metiletil naftaleno	0,09

TR = Tempo de retenção

TR relativo = tempo de retenção em relação ao 1,8 cineol

%A = porcentagem do componente na amostra

Pela técnica de HPLC acoplada a detector de massas identificou-se os componentes do óleo e do hidrolato de *M. armillaris* através dos picos cromatográficos (Figura 28). A Tabela 3 mostra as 145 substâncias químicas detectadas no óleo de *M. armillaris* e na Tabela 4 contêm as 23 substâncias químicas detectadas no hidrolado de *M. armillaris*. Em ambas as tabelas estão presentes, além da substância, sua respectiva massa molecular e a massa molecular da substância de referência (massa considerada).

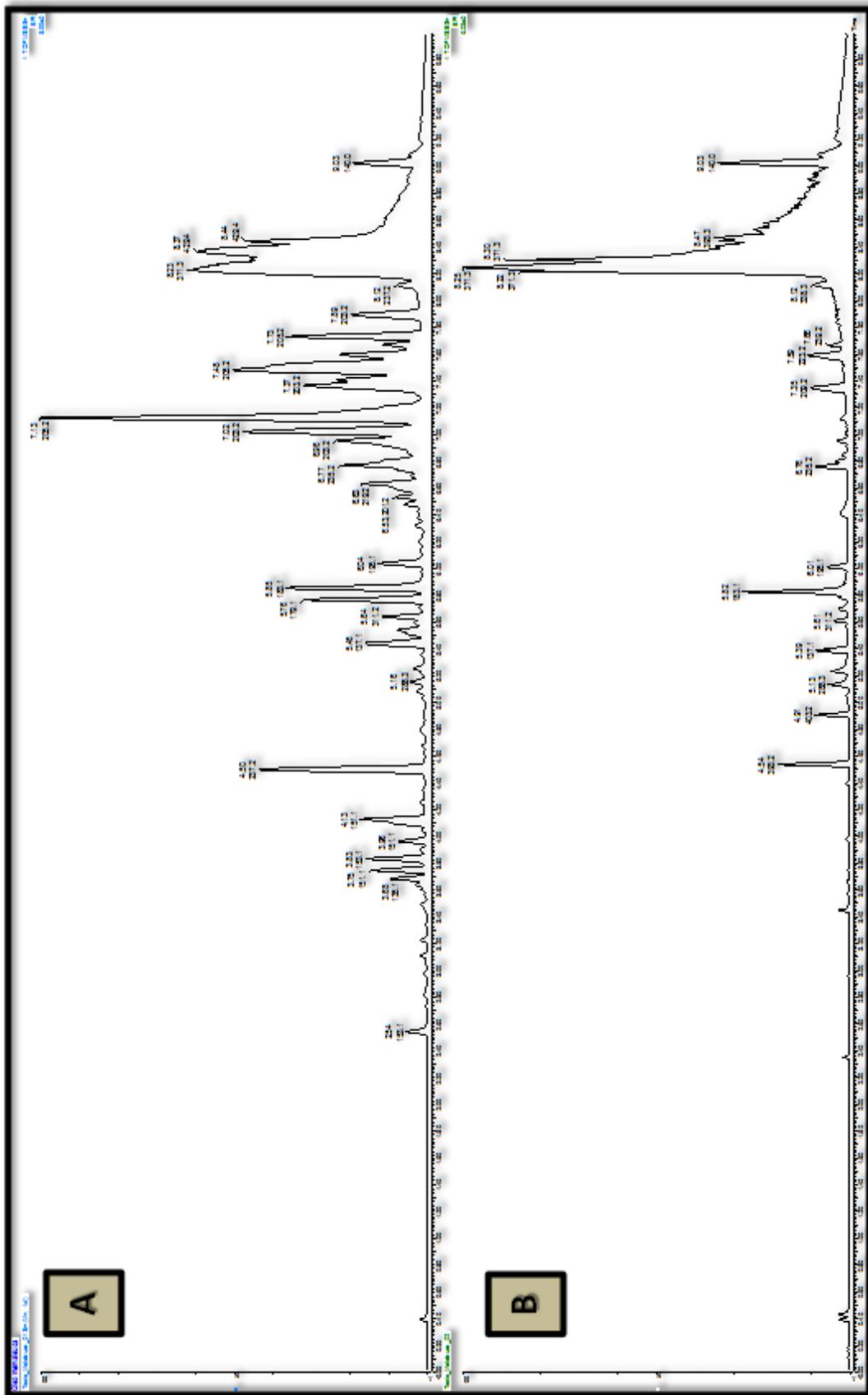


Figura 28 . Cromatograma de óleo (A) e do hidrolato (B) de *Melaleuca armillaria* obtido por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado à detector de massa

Tabela 3. Componentes do óleo de *Melaleuca armillaris* identificados em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector de massas.

	Identificação do componente	Massa considerada (Dalton)	Massa observada (Dalton)
1	Acetato de trans carveol	194.13068	194.1309
2	Esculentosídeo A	826.43509	826.4318
3	Gomisin S	418.19915	418.1985
4	Oxifilediol B	238.15689	238.1571
5	Cimidahuside H	618.37678	618.3742
6	Benzoato de Benzila	212.08373	212.0840
7	B Mirceno	136.12520	136.1255
8	Vellerdiol	236.17763	236.1779
9	Deoxypaeonisuffrone	182.09429	182.0945
10	Dihydroeugenol	166.09938	166.0996
11	Oxyphyllendiol B	238.15689	238.1570
12	Δ 1(10)-Aristoleno-9-ol	220.18272	220.1827
13	1 β -Hydroxycolartin	268.16746	268.1680
14	Dihydroactinidiolide	180.11503	180.1154
15	Dihydroeugenol	166.09938	166.0995
16	3-fenil-2-butanona	148.08882	148.0893
17	(25R)-Spirostan-4-ene-3,12-dione	426.27701	426.2751
18	Nardosinona	250.15689	250.1572
19	Δ 1(10)-Aristoleno-9-ol	220.18272	220.1829
20	Dihydroeugenol	166.09938	166.0996
21	Timol Isobutirato	220.14633	220.1462
22	Δ 1(10)-Aristoleno-9-ol	220.18272	220.1830
23	M Isopropiltolueno	134,10955	134.1099
24	3-fenil-2-butanona	252.17254	252.1730
25	14(R)-Hydroxy-7 β -isovaleroyloxyprop-8(10)en-2-one	336.23006	336.2304
26	Nardosinona	250.15689	250.1575
27	Dihydroeugenol	166.09938	166.0996
28	Orientalol E	254.18819	254.1887
29	Nardosinona	250.15689	250.1572
30	Cavacrol	150.10447	150.1047
31	Nardosinona	250.15689	250.1575
32	Nardosinonediol	252.17254	252.1729
33	Cumeno	120.09390	120.0944
34	25-O-Acetil-cimigenol	530.36074	530.3582
35	Progesterona	314.22458	314.2253
36	Cloridrato de Dietilamina	108.05800	108.0579
37	Debilone	234.16198	234.1624
38	3 β -Hudrosantamarine-1- β -D-glucopyranoside	428.20463	428.2040
39	1-metil-3-(1-metil-etil)-benzeno	148.12520	166.0995
40	Dictamnol	178.13577	178.1359
41	Vellerdiol	236.17763	236.1777
42	Furanodieno	216.15142	216.1516
43	Shizonol	168.11503	168.1152
44	Nardosinona	250.15689	250.1573

45	Debilone	234.16198	234.1622
46	3 β Hydrohyatractylon	232.14633	232.1466
47	m-Isopropiltolueno	134.10955	134.1098
48	Nardosine	250.15689	250.1573
49	Δ 1(10)- Aristolen-9-ol	220.18272	220.1832
50	Debilone	234.16198	234.1624
51	Epi- α - Bisabolol	222.19837	222.1986
52	Furanodieno	216.15142	261.1518
53	Debilone	234.16198	243.1625
54	Δ 1(10)- Aristolen-9-ol	220.18272	220.1828
55	Debilone	234.16198	234.1622
56	Debilone	234.16198	234.1623
57	Δ 1(10)- Aristolen-9-ol	220.18272	220.1831
58	Chenodiol	392.29266	392.2914
59	(-) Calameneno	202.17215	202.1722
60	Metileugenol	178.09938	178.0993
61	Vellediol	236.17763	236.1779
62	(-) Calameneno	202.17215	202.1724
63	1 metil-3-(1metil-etil)-benzene	148.12520	148.1256
64	Bufalin	386.24571	386.2463
65	Orientalol E	254.18819	254.1889
66	Vellediol	236.17763	236.1779
67	Spinasterone	410.35487	410.3555
68	Calameneno	202.17215	202.1726
69	3,3 5,5 Tetramethoxy-trans-stilbene	300.1347	300.1347
70	Piperitone	152.12012	152.1202
71	Debilone	234.16198	234.1625
72	Flavenochromane	440.18350	440.1818
73	Apocinina	166.06299	166.0633
74	Turmerone	218.16707	218.1674
75	Campest-7,24(28)-dien-3 β -ol	398.35487	398.3544
76	Turmerone	218.16707	218.1873
77	Debilone	234.16198	234.1624
78	1-Metil-3(1-metil-etil)-benzeno	148.12520	148.1257
79	1-Metil-3(1-metil-etil)-benzeno	148.12520	148.1256
80	Nardosino	252.17254	252.1730
81	Δ 7-Stigmasterol	410.35487	410.3553
82	2-octifenol	206.16707	206.1675
83	Debilone	234.16198	234.1624
84	Turmerone	218.16707	218.1677
85	m-Isopropiltolueno	134.10955	134.1099
86	Δ (10)-Aristolen-9-ol	220.18272	220.1830
87	Dendronobilin B	284.16237	284.1611
88	Ergot-7,22-diene-3 β ,5 α ,6 β -triol	430.34470	430.3445
89	Allyl Disulfide	146.02239	146.0228
90	Carvacrol	150.10447	150.1048
91	1,3-cicloctadieno	108.09390	108.0942
92	m-Isopropiltolueno	134.10955	134.1100
93	Epi- α -Bisabolol	222.19837	222.1988
94	Δ (10)-Aristolen-9-ol	220.18272	220.1832
95	Calameneno	202.17215	202.1728
96	Chenodeoxycholic acid	392.29266	392.2908

97	Turmerone	218.16707	218.1677
98	Turmerone	218.1607	218.1674
99	Tetratriacontanamine	493.55865	493.5580
100	Guaiene	204.18780	204.1881
101	Calameneno	202.17215	202.1725
102	Turmerone	218.16707	218.1675
103	Vellerdiol	236.17763	236.1780
104	Cavacrol	150.10447	150.1048
105	Guaienes	204.18780	204.1882
106	Metil arteannate	248.17763	248.1784
107	1-Metil-3-(1 metil-etil)-benzeno	148.12520	148.1257
108	Turmerone	218.16707	218.1677
109	Calameneno	202.17215	202.1728
110	Piperitone	152.12012	152.1204
111	β -Myrceno	136.12520	136.1257
112	Nardosinone	250.15689	250.1573
113	Dehidrololiolide	194.09429	194.0946
114	14(R) Hydroxy-7 β - isovaleroyloxyoplop-8(10)-en-2-one	218,16707	218,1677
115	Turmerone	218.16707	218.1677
116	Chenodeoxycholic acid	392.29266	392,2908
117	2 α -Acetoxycostic acid	292.16746	292.1683
118	Diisobutyl phatel	278.15181	278.1527
119	Sinenofuranol	238.19328	238.1939
120	3-Butanone	72.05751	72.0575
121	Guaiene	204.18780	204.1884
122	Vellerdiol	236.17763	236.1781
123	Turmerone	218.16707	218.1676
124	Carvacrol	150.10447	150.1049
125	Guaiene	204.18780	204.1881
126	Chenodeoxycholic acid	392.29266	392.2908
127	Turmerone	218.16707	218.1678
128	Calameneno	202.17215	202.1726
129	1-Methyl-3-(1 methyl-ethyl)-benzeno	148.12520	148.1258
130	Debilone	234.16198	234.1627
131	Dictamnol	178.13577	178.1361
132	Guanina	204.18780	204.1884
133	Chenodeoxycholic acid	392.29266	392.2908
134	Epi- α -Bisabolol	222.29837	222.1989
135	Calamenene	202.17215	202.1728
136	Atractylodin	182.07316	182.0736
137	Guaiene	204.18780	204.1885
138	Calameneno	202.17215	202.1728
139	Vellerdiol	236.17763	236.1782
140	Olibanumols I	428.36543	428.3654
141	Calameneno	202.17215	202.1727
142	Δ 7- Stigmasterol	410.35487	410.3552
143	Guaiene	204.18780	204.1886
144	Guaiene	204.18780	204.1886
145	Stigmast-4-en-6 β -ol-30ne	428.36543	428.3653

Tabela 4. Componentes do hidrolato de *Melaleuca armillaris* identificados em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector de massas

Identificação do componente		Massa considerada (Dalton)	Massa observada (Dalton)
1	Cornutaside D	766.45034	766.4520
2	Apocinina	166.06299	166.0633
3	Guaiene	204.18780	204.1878
4	Spinasterone	410.35487	410.3558
5	Bis(2-ethylhexyl)phthalate	390.27701	390.2771
6	Methyl arteannuate	248.17763	248.1777
7	B Mirceno	136.12520	136.1256
8	Diisobutyl phatel	278.15181	278.1520
9	Dehydrololiolide	194.09429	194.0948
10	Sinenofuranol	238.19328	238.1935
11	Isofucosterol	412.37052	412.3700
12	Allyl disulfide	146.02239	146.0226
13	Picfeltarraenin IA	762.41904	762.4171
14	Tetratriacontanamine	493.55865	493.5582
15	Debilone	234.16198	235.1696
16	Gomisin	402.20424	402.2043
17	Galbelgin	372.19367	372.1986
18	Cubenol	222.19837	222.1986
19	Atractylodin	182.07316	182.0737
20	2-butanona	72.05751	72.0573
21	Muberrofuran N	392.19876	392.2001
22	Spinasterone	410.35487	410.3556
23	Isofucosterol	412.37052	412.3705

Na identificação dos componentes do óleo de *M. armillaris* pela técnica Raman, observou-se as bandas e a intensidade nas quais os compostos são absorvidos. Um laser de comprimento de onda único foi emitido a 785nm sendo possível verificar o espalhamento da luz emitida (Figura 29).

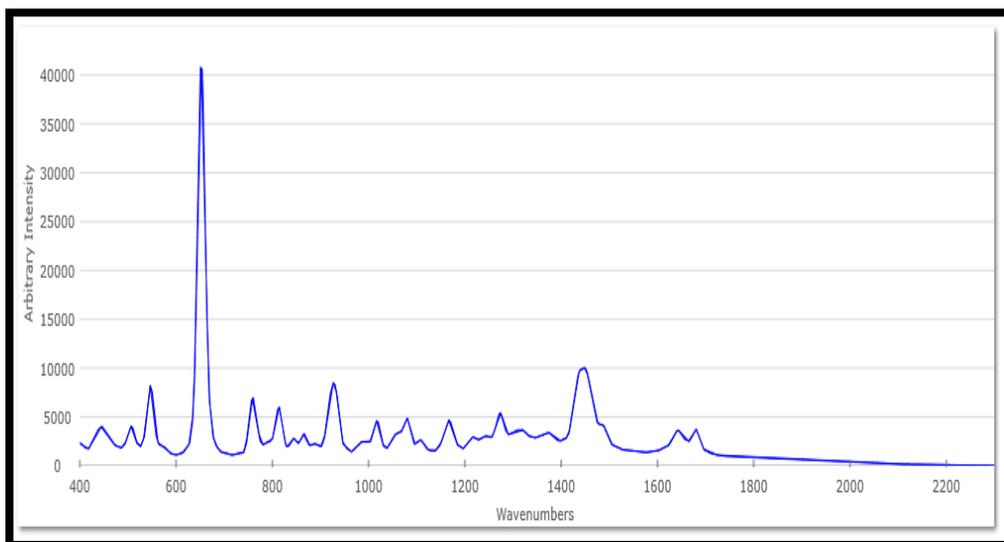


Figura 29. Espectro obtido através da leitura do óleo de *Melaleuca armillaris* utilizando a técnica de Raman.

Na identificação dos componentes do óleo de *M. armillaris* pela técnica NIR, observou-se maior absorção em aproximadamente 2350nm (Figura 30).

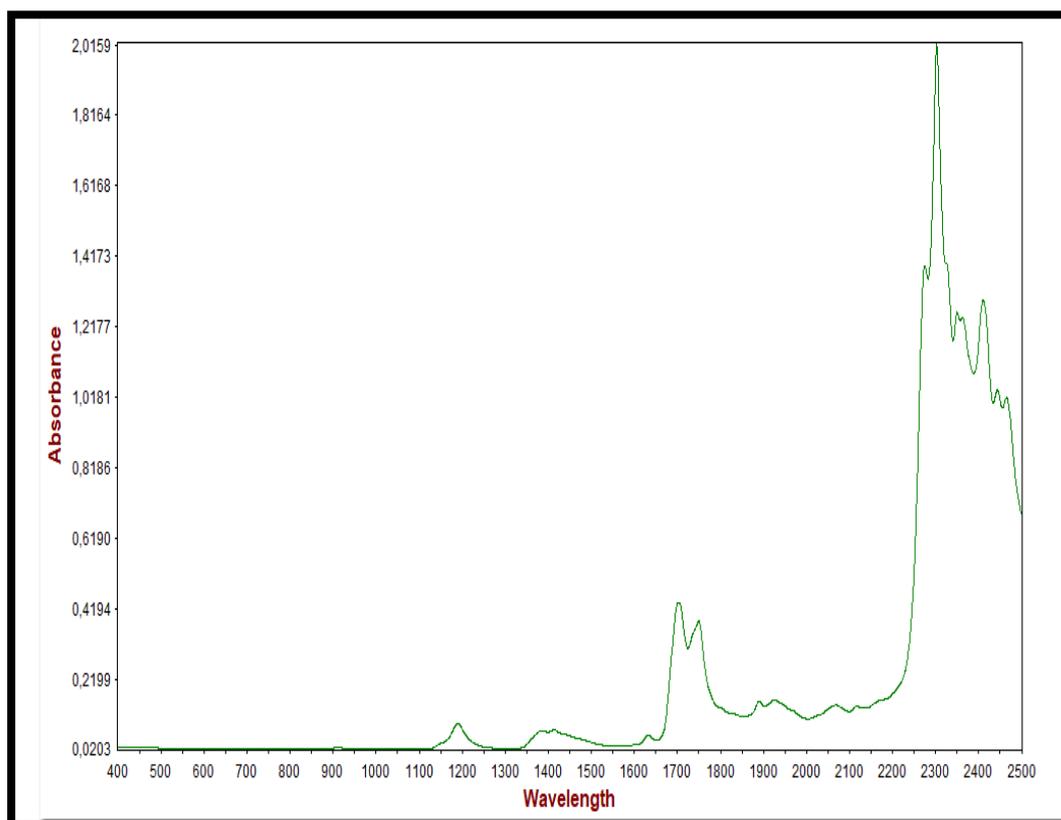


Figura 30. Espectro de *Melaleuca armillaris* obtido com a utilização do equipamento NIRS XDS

4.2 Produto

Os produtos do presente estudo são:

- Artigo em desenvolvimento a ser publicado em revista científica.
- Depósito de patente em fase de busca de anterioridade

(Inovação: protocolo para realização de cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência para o óleo essencial de *Melaleuca armillaris*).

-Laudo de caracterização do óleo essencial e Hidrolato de *Melaleuca armillaris*
(Figura 31)

LAUDO DE CARACTERIZAÇÃO
Óleo essencial de *Melaleuca armillaris*

TESTES	RESULTADO
Densidade	0,9146g/mL
pH	4,36
Rotação específica	2,38°
Índice de refração	1,45958
Osmolaridade	Não detectada
Viscosidade	3 centipoise
Número de partículas $\geq 10\mu\text{m}$	35901
Número de partículas entre 10 e $25\mu\text{m}$	1743
Umidade	0,84%
Temperatura de decomposição	115,19°C
Número de compostos identificados por Cromatografia Gasosa	24
Número de compostos identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	145
Identificação por RAMAN	Absorção em 785nm
Identificação por NIR	Absorção em 2350nm

Observações: O teste de densidade foi realizado utilizando o equipamento Densímetro 30PX[®] (Mettler Toledo, Brasil). Para análise de pH foi utilizado pHmetro modelo 913 (Methron, Estados Unidos). Para avaliar rotação específica foi utilizado Polarímetro ADP 220 Alemmar (Bellinghan & Stanley, Estados Unidos). Índice de refração foi avaliado utilizando refratômetro digital automático Atago RX5000 Alpha (Cetec, Brasil). A osmolaridade foi medida em osmômetro Vapro, modelo 5520 (Wescor, Estados Unidos). A viscosidade foi avaliada em viscosímetro Brookfield LVDV (BrasEq, Brasil). As partículas foram contadas em Contador HIAC, modelo 8000A (Hach, Brasil). A umidade foi avaliada em Karl Fischer 915 KF Ti-Touch (Methron, Suíça). A temperatura de decomposição foi avaliada por termogravimetria em TGA, DSC[®] (Mettler Toledo, Estados Unidos). O cromatógrafo gasoso utilizado foi o 7890 Agilent (Estados Unidos). Para HPLC foi utilizado o cromatógrafo ACQUITY H-Class UPLC Xevo (Waters, Estados Unidos). Para identificação por Raman foi utilizado o Mira M3 (Metrohn, Estados Unidos) e para o NIR foi utilizado o NIRS XDS (Methron, Estados Unidos).

RESPONSÁVEL: FARMACÊUTICO LEONARDO CURIEL ALVES

Pag 1/1

Figura 31. Laudo de caracterização do óleo essencial de *Melaleuca armillaris*

5. DISCUSSÃO

A pesquisa científica acerca da eficácia do uso dos óleos essenciais é necessária para uso dos mesmos nas indústrias farmacêutica e cosmética (BRITO, 2013). Além disso, a caracterização de óleos essenciais também se faz necessária para identificação de novos compostos e conseqüentemente aplicações em estudos clínicos.

O óleo de *Melaleuca armillaris* vem sendo utilizado em vários estudos *in vitro* e *in vivo* (RIZK *et al.*, 2012; YVON *et al.*, 2012; CHABIR *et al.*, 2011; BULDAIN *et al.*, 2018), porém ainda não foram pesquisados todos os seus elementos com potencial de atuação (OLIVEIRA *et al.*, 2011; YVON *et al.*, 2012; CHABIR *et al.*, 2011). Sendo assim, no presente trabalho foram utilizadas técnicas de referência para avaliar as características do óleo de *M. armillaris* e, a partir desse estudo, o óleo poderá ter seu uso padronizado.

A densidade do óleo de *M. armillaris* foi avaliada, pois é um parâmetro de importância na caracterização de materiais utilizados na produção de medicamentos, para evitar erros na formulação, problemas na otimização de processos de fabricação, além de verificar a presença de impurezas (OLIVEIRA *et al.*, 2013). O valor encontrado para o teste de densidade da *M. armillaris* (0,9146g/mL) foi muito próximo ao que, segundo Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2019), é a especificação de densidade da *Melaleuca alternifolia* (0,885 a 0,906g/mL). Pequenas variações devido à vidraria ou instrumento utilizado para fazer o teste podem ocorrer e a espécie da planta também influencia.

Em escala industrial, o valor de densidade é muito importante para determinação de volume de envase. Resultados muito discrepantes do esperado podem ser indício de adulteração ou algum outro tipo de desvio de qualidade. Outro óleo de densidade próxima ao da *M. armillaris*, porém com ações distintas, é o extraído das sementes da Noz-Moscada (*Myristicae fragrans aetheroleum*) que, segundo Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2019), é de 0,885 a 0,905 g/mL.

A avaliação do pH é de extrema importância, pois esse é o principal fator de influência na decomposição de fármacos. A associação de fármacos com valores de pH distintos pode gerar instabilidade, aumentando o risco de incompatibilidade (MONTEIRO *et al.*, 2012). Além disso, se o produto a utilizar o óleo for utilizado, for destinado à aplicação tópica, o controle do pH cutâneo é necessário, devido à agressividade de produtos tópicos inadequados (RICCI *et al.*, 2002). O pH ácido da *M. armillaris* encontrado no presente estudo favorece sua ação antimicrobiana, já que valores

de pH entre 6,5 e 7,5 são os mais favoráveis para o desenvolvimento da maioria dos microorganismos, tanto deteriorantes quanto patogênicos (JACOBI *et al.*, 2019).

O teste de rotação específica ou polarimetria auxiliou na identificação do óleo de *M. armillaris*, demonstrando que ocorreu um desvio da luz polarizada em 2,38°. A rotação específica para *M. alternifolia* está entre 5-15°, e o resultado pode ser influenciado por diversos fatores como temperatura e constituintes químicos distintos (BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019).

O índice de refração é empregado para caracterizar principalmente gorduras, óleos graxos, ceras, açúcares e solventes orgânicos, bem como alguns fármacos. É utilizado para determinar a pureza de óleos voláteis. O valor obtido para o óleo de *M. armillaris* (1,45958) está pouco abaixo dos valores que se encontra para *M. alternifolia* (1,475 – 1,482), possivelmente pela diferença química entre os óleos (BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019).

A pressão osmótica ou osmolaridade desempenha um papel crítico em todos os processos biológicos que envolvem difusão de solutos ou transferência de fluidos através de membranas (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019). O equipamento não detectou leitura para osmolaridade do óleo de *M. armillaris*, o que significa que em temperatura ambiente não há evaporação dos componentes desse óleo..

No teste de viscosidade, o valor obtido mostra baixa resistência do fluido ao escoamento. A baixa viscosidade influencia diretamente nas características de cremes e pomadas, garante estabilidade e qualidade do medicamento fitoterápico e auxilia na aceitação por parte do consumidor, já que essa depende da aparência, sensação pelo contato inicial com a pele, espalhabilidade e oleosidade residual depois da aplicação (LOCH *et al.*, 2011). A baixa viscosidade do óleo de *M. armillaris* proporciona tais resultados e também facilita o envase do óleo, utilizando máquinas em escala industrial.

O material particulado consiste em material sólido ou líquido sob a forma de partículas, gerando alterações na fotossíntese, composição química do solo e modificações no crescimento e reprodução de plantas. A vegetação exposta a poluentes atmosféricos apresenta lesões como quedas de flores e alterações físicas ou químicas (MOSCOSO-VANEGAS *et al.*, 2019). Para o teste de material particulado, o alto número de partículas pode ser o indício de poluentes oriundos do ambiente, coleta e outros que levam a efeitos indesejáveis na formulação. A filtração utilizando membranas de 0,22µm mostrou-se eficiente na remoção de material particulado, mostrando, então, a necessidade de filtração do óleo antes da incorporação do mesmo como princípio ativo. Observou-se que, devido ao grande número de partículas presente no óleo, o processo de filtração

necessita de trocas frequentes da membrana, e, portanto, para utilização do mesmo em escala industrial, deverá ser desenvolvido e validado um novo método de filtração.

O óleo de *M. armillaris* apresentou baixo teor de água (umidade), o que é favorável a utilização do mesmo em formulações. O óleo de calêndula, por exemplo, apresenta valor maior para umidade (10%). A umidade de óleos essenciais interfere na qualidade da formulação, na vida de prateleira e estabilidade do mesmo. Quantidade elevada de água incorporada ao óleo influencia de forma negativa a formulação final. O excesso de água em matérias-primas vegetais possibilita a ação de enzimas, além de propiciar o desenvolvimento de fungos e bactérias (BORGES *et al.*, 2005).

A análise de termogravimetria demonstra a temperatura inicial de decomposição do óleo e apresentou valores que permitem o seu armazenamento fora da geladeira, o que evitaria o aumento de umidade, hidrólise e outros fenômenos. Além disso, o teste também permitiu a determinação de cinzas que avaliou a quantidade de impurezas inorgânicas presentes na matéria-prima, como exemplo, íon metálico.

A identificação por cromatografia gasosa é uma técnica eficiente para a identificação de compostos, embora tenha o custo elevado, principalmente em relação a consumíveis e gases utilizados. Os métodos cromatográficos fizeram um grande progresso e alcançaram uma ampla aceitação como ferramenta analítica qualitativa e quantitativa de análise de medicamentos, em estabilidade de mistura e outros (MEREY *et al.*, 2017).

No presente estudo foi desenvolvido um novo método de cromatografia gasosa, em que o tempo de corrida cromatográfica foi reduzido de 39 para 26 minutos, comparado ao de Falci *et al.*, 2015. Outra vantagem alcançada pela substituição do método foi o ajuste da seringa do injetor parametrizada somente para coleta do gás formado pela ebulição do diclorometano (solvente), que pode diminuir significativamente os fenômenos de contaminação. Com a cromatografia gasosa foram identificados 24 compostos químicos no óleo de *M. armillaris*, sendo que o principal deles foi o 1,8 Cineol, assim como já estudado (OLIVEIRA *et al.*, 2011; Rizk *et al.*, 2012; CHABIR *et al.*, 2011; FARAG *et al.*, 2004; BULDAIN *et al.*, 2018).

O teste de identificação utilizando HPLC com espectrômetro de massa permitiu a identificação de 145 compostos do óleo de *M. armillaris*, utilizando como comparação o banco de dados Unifi[®]. Tais compostos não são identificados com técnicas usuais, porém, o número de picos exibidos no cromatograma é menor que o número total de picos demonstrados na tabela, pois a técnica tem alta sensibilidade e resolução e vários picos não são aparentes por ter baixa intensidade, ficando abaixo do sinal dos compostos

mais abundantes, ocultados na linha de base; esses picos só podem ser visualizados extraindo o cromatograma do espectrômetro. Como o equipamento reconhece isômeros, alguns dos compostos aparecem de forma repetida. Além da identificação por massa, o equipamento emite a fórmula molecular dos compostos encontrados.

São inúmeras as possibilidades de estudo com os compostos do óleo de *M. armillaris*, assim como as formulações. Além do 1,8 Cineol e Terpinen-4-ol, que possuem ações como: anti-helmíntica (FARAG *et al.*, 2004), antioxidante (YVON *et al.*, 2012), anti-inflamatória e relaxante muscular (PEREIRA-GONÇALVES *et al.*, 2018), antimicrobiana (SAGAVE *et al.*, 2015), ação protetora em lesão gástrica (ROCHA CALDAS *et al.*, 2015), outros exemplos de constituintes do óleo são: o Furanodiene, que inibe o crescimento de células de leucemia HL-60 e induz a apoptose de células de câncer (ZHONG *et al.*, 2012); Benzoato de benzila, com ação acaricida; Apocinina, com ação antioxidante (MARCHI *et al.*, 2016); Carvacrol, com ação conservante de alimentos (Llana-Ruiz-Cabello *et al.*, 2016), entre outros.

O óleo de *M. armillaris* tem muitas propriedades a serem exploradas. Seus compostos podem diversificar a sua utilização, porém mais estudos devem ser realizados com finalidade de elucidar os efeitos.

Foi observado que o hidrolato e o óleo de *M. armillaris* apresentam perfis cromatográficos diferentes, sendo que o hidrolato não apresenta alguns componentes encontrados no óleo por se tratar de um subproduto, sendo assim, possuem propriedades e ações distintas.

Na identificação do óleo de *M. armillaris* por Raman, o espectro mostrou uma identidade única para o óleo de *M. armillaris* (comprimento de onda de 785nm), sendo que qualquer espectro obtido com a mesma técnica apresentando bandas diferentes pode ser indício de adulteração, problemas na obtenção óleo, contaminação cruzada ocasionada por limpeza inadequada dos aparatos de extração. Da mesma maneira, na espectrofotometria NIR, obteve-se uma identidade única para o óleo de *M. armillaris* (absorção em 2350nm).

Uma das limitações do estudo foi a não avaliação de presença de metais pesados no óleo de *M. armillaris*, por indisponibilidade de instrumentos. A presença de metais pesados pode inviabilizar a utilização do óleo em formulações, por isso é de grande importância a sua avaliação.

5.1 Aplicabilidade

A caracterização do óleo de *M. armillaris* permite a padronização na utilização do mesmo e também resultados mais previsíveis em formulações que o utilizem. Além disso, a identificação dos compostos do óleo auxilia na criação de novos produtos e medicamentos, diversificando a aplicação do óleo de *M. armillaris* na área da saúde. O conhecimento da biomassa do óleo de *M. armillaris* permite também identificar possíveis interações com outras substâncias químicas que podem levar riscos aos pacientes.

5.2 Impacto para a sociedade

Para a indústria farmacêutica, principalmente aquelas voltadas à produção de fitoterápicos, a caracterização da matéria-prima utilizada é de extrema importância para garantir um produto de qualidade para o consumidor.

A caracterização do óleo de *M. armillaris* aumenta o interesse em investimentos e comercialização do mesmo. Além disso, com os componentes do óleo já identificados, há maior possibilidade de estudos clínicos que beneficiarão a população, que terá disponível mais opções de produtos fitoterápicos, que, na maioria dos casos, possui valor mais acessível comparado aos sintéticos.

6. CONCLUSÃO

O óleo de *M. armillaris* foi caracterizado utilizando diferentes técnicas e seus componentes foram identificados.

7. REFERÊNCIAS

Bizzo HR, Hovell AMC, Rezende CM. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova* 2009; 31(3): 588–94.

Borges DB, Farias MR, Simoes CMO, Schenkel EP. Comparação das metodologias da Farmacopeia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. *Rev. bras. farmacogn* 2005; 15(3): 229-36.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia brasileira. 6.ed. Brasília: Anvisa; 2019.

Brito, A. M. G., Rodrigues, S. A., Brito, R. G., & Xavier-Filho, L. Aromaterapia: da gênese a atualidade. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2013; 15(4 suppl 1); 789-93.

Buldain D, Buchamer AV, Marchetti ML, Aliverti F, Bandoni A, Mestorino N. Combination of Cloxacillin and Essential Oil of *Melaleuca armillaris* as an Alternative Against *Staphylococcus aureus*. *Front Vet Sci*. 2018; 5(177): 1-6.

Castro C, Lopes MS, Lelis AP, Gonçalves LAJ. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* cheel. *Sociedade de Investigações Florestais*. 2005; 29 (2): 241-9.

Chabir N, Romdhane M, Valentin A, et al. Chemical study and antimalarial, antioxidant, and anticancer activities of *Melaleuca armillaris* (Sol Ex Gateau) Sm essential oil. *J Med Food*. 2011; 14(11): 1383-8.

Decursio DA, Barbosa GM, Loureiro ZM. Avaliação da composição química e radiopacidade de diferentes pastas de hidróxido de cálcio. *Rev Odontol Bras Central* 2018; 27(80): 19-23.

- Elmi A, Ventrella D, Barone F, Carnevali G, Filippini G, Pisi A, Bacci, M. *In Vitro* Effects of Tea Tree Oil (*Melaleuca alternifolia* Essential Oil) and its Principal Component Terpinen-4-ol on Swine Spermatozoa. *Molecules* 2019; 24(6): 1071.
- Falci SPP, Teixeira MA, Chagas PF, Martinez BB, Loyola ABAT, Ferreira LM, Veiga DF. Antimicrobial activity of *Melaleuca* sp. oil against clinical isolates of antibiotics resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 2015; 30(6): 401- 406.
- Farag RS, Shalaby AS, El-Baroty GA, Ibrahim NA, Ali MA, Hassan EM. Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. *Phytother Res.* 2004; 18(1): 30-5.
- Felipe LO, Junior WFS, Araujo KC, Fabrino DL. Lactoferrin, Chitosan and *Melaleuca alternifolia*: Natural products that show promise in candidiasis treatment. *Brazilian Journal of Microbiology* 2018; 49(2): 212-19.
- Furtado, Nieve Araçari Jacometi Cardoso (Ed.);Veneziani, Rodrigo Cassio Sola (Ed.);Ambrósio, Sérgio Ricardo (Ed.). *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu, 2017. 566p., il.
- Graziano TS, Calil CM, Sartoratto A, Franco GC, Groppo FC, Cogo-Müller K. In vitro effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on growth and production of volatile sulphur compounds by oral bacteria. *J Appl Oral Sci.* 2016; 24(6): 582-9.
- Holler FJ, Skoog D, Crouch RS. *Princípio de análise instrumental*. 6.ed. São Paulo: Bookman; 2009; p. 1056.
- Jacobi RV, Fronza N, Vargas Júnior A, Carvalho VS, Fujinawa Mf, Silveira SM. Potencial do óleo essencial de tomilho na sanitização de rúcula. *Ciência e agrotecnologia* 2019; 43:1-10
- Kong Q, Zhang L, An P, Qi J, Yu X, Lu J, Ren X. Antifungal mechanisms of α -terpine ol and terpine-4-alcohol as the critical components of *Melaleuca alternifolia* oil in the inhibition of rot disease caused by *Aspergillus ochraceus* in postharvest grapes. *Journal of Applied Microbiology.*2019; 126: 1161-74

Llana-Ruiz-Cabello, M., Maisanaba, S., Puerto, M., Prieto, A. I., Pichardo, S., Moyano, R., Cameán, A. M. Genotoxicity evaluation of carvacrol in rats using a combined micronucleus and comet assay. *Food and Chemical Toxicology*.2016; 98: 240-50.

Loch CR, Marco MG, Schwedersky MB, Haas SE. Avaliação físico-química e determinação do comportamento reológico de emulsões de cetoconazol 2% comercializados em farmácias magistrais no município de Erechim/RS. *Revista Brasileira de Farmácia* 2011; 92(4): 299-305.

Marchi KC, Ceron CS, Muniz JJ, De Martinis BS, Tanus-Santos JE, Tirapelli CR. NADPH Oxidase Plays a Role on Ethanol-Induced Hypertension and Reactive Oxygen Species Generation in the Vasculature. *Alcohol and Alcoholism*. 2016; 51(5): 522-34.

Merey HA, Ramadan KN, Diab SS, Moustafa AA. Chromatographic methods for the simultaneous determination of binary mixture of Saxagliptin HCL and Metformin HCL. *Bulletin of Faculty of Pharmacy* 2017; 55(2): 311-7.

Monteiro C, Coelho RMC, Ferreira AMA, Sorgin MAP, Da luz MGP. Potencial hidrogeniônico de soluções de antibióticos submetidas a condições ambientais: ensaio preliminar. *Rev Esc Enferm USP* 2012; 46 (2): 311-9.

Moscoso-Vanegas DL, Monroy-Morocho LM, Narváes-Vera MA, Espinoza-Molina CE, Astudillo-Alemán L. Efecto fitotóxico del material particulado pm10 recolectado en el área urbana de la ciudad de Cuenca, Ecuador. *Iteckne* 2019; 16(1): 12-20.

Nunes RS, Lira AAM, Ximenes E, Silva JA, Santana DP. Padronização da matéria-prima vegetal e determinação da atividade antimicrobiana do extrato bruto *da Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) frente ao *Streptococcus mutans*. *Rev Bras Farmacognosia* 2005; 86(2): 80-3.

Pieri, F. A., Mussi, M. C., Moreira, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*.2009 11(4), 465–472.

Oliveira ACM, Fontana A, Negrini TC, Nogueira MNM, Bedra TBL, Andrade CR, Spolidorio, DMP. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. *Rev Bras de Plantas Mediciniais* 2011; 13(4): 492–9.

Oliveira BM, Melo Filho JM, Afonso JC. A densidade e a evolução do densímetro. *Rev Bras de Ensino de Física* 2013; 35(1): 1601-10.

Oliveira FL, Ferreira J S W, Correia AK. Leite *FD Lactoferrin, chitosan and Melaleuca alternifolia* natural products that show promise in candidiasis treatment. *Brazilian Journal of Microbiology* 2018; 49(2): 212-9.

Paine MF, Roe AL. "Green Medicine": The Past, Present, and Future of Botanicals. *Clin Pharmacol Ther.* 2018; 104(3): 410-5.

Pauliello KE, Souza DMST, Filho MM, Teixeira MA, Mendonça ARA. *Journal of Medicinal Plants Research: Antihistaminic action of Melaleuca armillaris ointment.* 2019,13(10): 236-41

Pereira-Gonçalves Á, Ferreira-da-Silva FW, de Holanda-Angelin-Alves CM, Cardoso-Teixeira AC, Coelho-de-Souza AN, Leal-Cardoso JH. 1,8-Cineole blocks voltage-gated L-type calcium channels in tracheal smooth muscle. *Pflugers Arch.* 2018; 470(12): 1803-13.

Ricci GL, Rigo LG, Beraldo PMG, Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *Investigação Clínica, Laboratorial e Terapêutica. An bras Dermatol* 2002; 77(5): 563-9.

Rizk M, Ibrahim N, El-Rigal N. Comparative in vivo antioxidant levels in *Schistosoma mansoni* infected mice treated with praziquantel or the essential oil of *Melaleuca armillaris* leaves. *Pak J Biol Sci.* 2012; 15(20): 971-8.

Rocha Caldas GF, Oliveira AR, Araújo AV, et al. Gastroprotective Mechanisms of the Monoterpene 1,8-Cineole (Eucalyptol). *PLoS One*. 2015; 10(8): 1-17.

Sagave, L., Gressler, L. T., Flores, F. C., Silva, C. B., Vargas, A. P. C., Lovato, M., Botton, S. A. Atividade de nanoformulações de Melaleuca alternifolia e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2015; 67(1): 221–6.

Silva, Milena M. C. da; Camara, Claudio A. G. da; Moraes, Marcilio M. de; Melo, João P. R. de; Santos, Rodrigo B. dos; Neves, Roberta C. S. Insecticidal and Acaricidal Activity of Essential Oils Rich in (E)-Nerolidol from *Melaleuca leucadendra* Occurring in the State of Pernambuco (Brazil) and Effects on Two Important Agricultural Pests. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2020; 31(4): 813–20.

Silvestri JDF, Paroul N, Czyewski E, Lerin L, Rotava I, Cansian RL, Treichel H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb). *Revista Ceres* 2010; 57(5): 589–94.

United States Pharmacopeia: USP42-NF37. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention; 2019.

Yvon Y, Raelison EG, Razafindrazaka R, et al. Relation between chemical composition or antioxidant activity and antihypertensive activity for six essential oils. *J Food Sci*. 2012; 77(8): 184-91.

Zhenbiao Li, Nan Wang, Yingying Wei, Xiurong Zou, Shu Jiang, Feng Xu, Hong fei Wang, and Xing feng Shao, Terpinen-4-ol Enhances Disease Resistance of Postharvest Strawberry Fruit More Effectively than Tea Tree Oil by Activating the Phenylpropanoid Metabolism Pathway: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020; 4-34.

Zhong Z, Dang Y, Yuan X, Guo W, Li Y, Tan W, Wang Y. Furanodiene, a Natural Product, Inhibits Breast Cancer Growth Both in vitro and in vivo. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2012; 30(3): 778–90.

8. NORMAS ADOTADAS

Normas para elaboração do Trabalho de Conclusão do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde, da Universidade do Vale do Sapucaí. Pouso Alegre –MG. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.univas.edu.br/mpcas/docs/normas.pdf>.

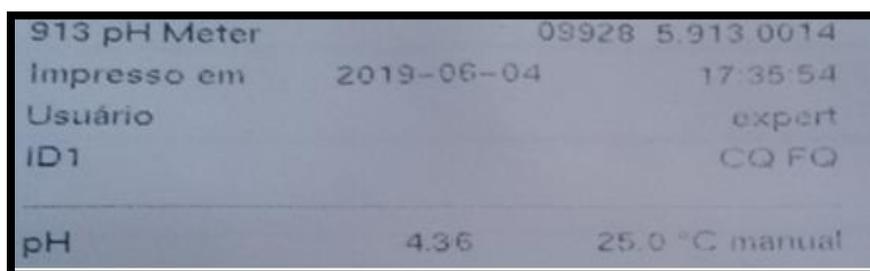
9. APÊNDICE

Apêndice 1. Valor de densidade do óleo de *Melaleuca armillaris* avaliado em Densímetro 30 PX (União Química Farmacêutica – Unidade de Pouso Alegre)



Fonte: Autor, 2019

Apêndice 2. pH do óleo de *Melaleuca armillaris* avaliado em 25°C.



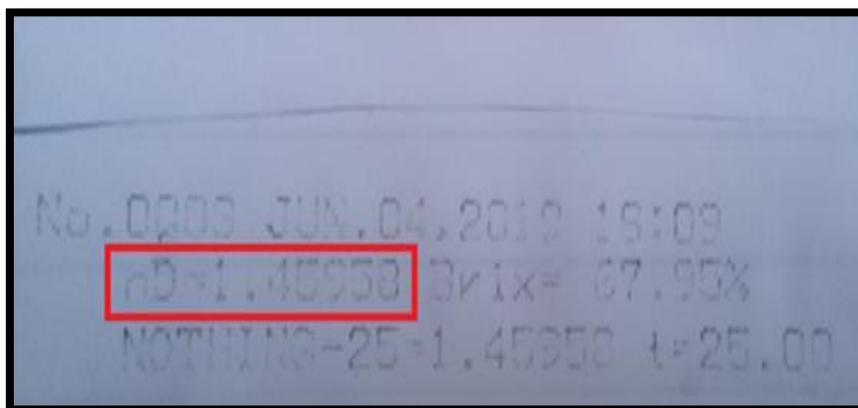
Fonte: Autor, 2019

Apêndice 3. Cálculo de rotação específica

$\alpha = \frac{a}{l \times d}$	$\alpha = \frac{4,32}{2 \times 0,9146}$	$\alpha = 2,36$
Rotação Específica =	$\frac{\alpha \times 100}{100 - \text{umidade}}$	
Rotação específica =	$\frac{2,36 \times 100}{100 - 0,84}$	
Rotação específica = 2,38		

α = Rotação observada no display do equipamento ($a=4,32$) conforme figura 6
 l = Comprimento do tubo do polarímetro em decímetro (2 decímetros)
 d = Densidade relativa do líquido (Obtida no teste de densidade)
 Umidade = umidade determinada por Karl Fischer (0,84%)

Apêndice 4. Índice de refração do óleo de *Melaleuca armillaris* avaliado em 25°C.



Fonte: Autor, 2019

Apêndice 5. Contagem de partículas presente no óleo de *Melaleuca armillaris* avaliado em equipamento HIAC 8000A

06/04/19 19:25:31 Counter 1			
Sample ID:		OLEO-MEL SECA	
Sample ID:		070519	
Elapsed time:		00:00:05.00	
Run 2		Counts/1.00 mL:	
Chan:	Size (um):	Cum1:	Diff:
1	10.00	4786.8	4554.6
2	25.00	232.20	232.20
06/04/19 19:25:31 Counter 1			
Sample ID:		OLEO-MEL SECA	
Sample ID:		070519	
Average of 2		Counts/1.00 mL:	
Chan:	Size (um):	Cum1:	Diff:
1	10.00	2793.4	2277.3
2	25.00	116.10	116.10
06/04/19 19:25:31			
Sample volume:		5.00	mL
Pooled volume:		150.00	mL
Number of containers: 10			
Pc at 10 um:		35901	
Pc at 25 um:		1743	
Product Fails USP 264799>			

Apêndice 6. Contagem de partículas entre 1 e 50 μm presentes no óleo de *Melaleuca armillaris* avaliado após filtração, utilizando filtro 0,45 μm

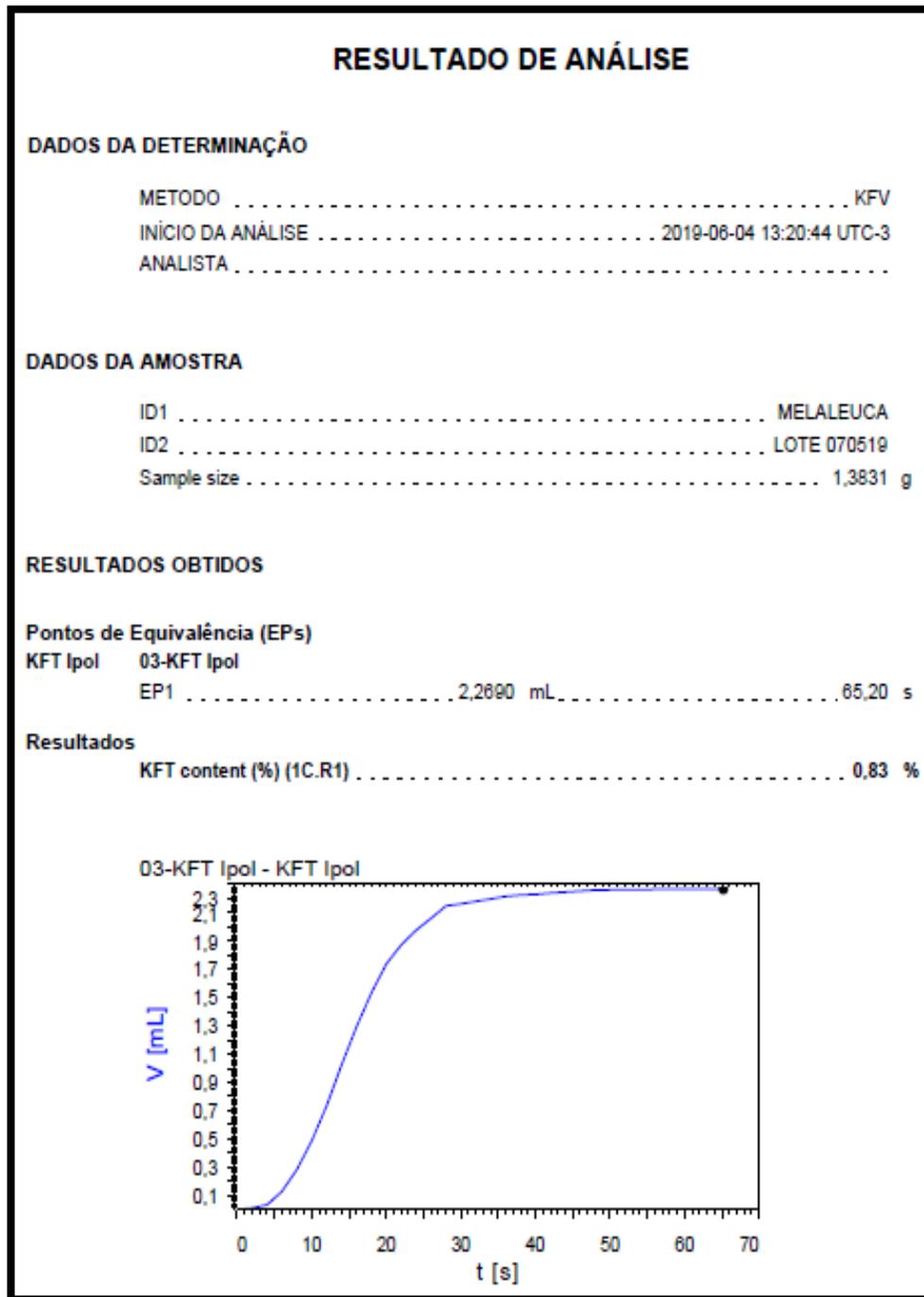
	$\geq 1 \mu\text{m}$	$\geq 2 \mu\text{m}$	$\geq 5 \mu\text{m}$	$\geq 10 \mu\text{m}$	$\geq 15 \mu\text{m}$	$\geq 25 \mu\text{m}$	$\geq 40 \mu\text{m}$	$\geq 50 \mu\text{m}$
Test b.1 - R. #1	126783	16222	1991	282	127	31	10	2
Test b.1 - M. #1	141542	19164	2256	278	129	31	4	1
Test b.1 - M. #2	142499	19440	2142	269	115	23	6	1
Test b.1 - M. #3	140944	19165	2140	264	122	21	6	4
Average	141662	19256	2179	270	122	25	5	2
Total average	141662	19256	2179	270	122	25	5	2

Apêndice 7. Contagem de partículas entre 1 e 50 μm presentes no óleo de *Melaleuca armillaris*, avaliado após filtração utilizando filtro 0,22 μm

	$\geq 1 \mu\text{m}$	$\geq 2 \mu\text{m}$	$\geq 5 \mu\text{m}$	$\geq 10 \mu\text{m}$	$\geq 15 \mu\text{m}$	$\geq 25 \mu\text{m}$	$\geq 40 \mu\text{m}$	$\geq 50 \mu\text{m}$
Test b.1 - R. #1	18353	5667	895	90	41	19	4	3
Test b.1 - M. #1	3753	1704	472	89	41	16	7	3
Test b.1 - M. #2	3362	1578	439	63	33	9	2	1
Test b.1 - M. #3	3378	1498	438	76	32	14	3	2
Average	3498	1593	450	76	35	13	4	2
Total average	3498	1593	450	76	35	13	4	2

Apêndice 8. Registro da obtenção do valor de umidade do óleo de *Melaleuca armillaris*

Amostra 1



RESULTADO DE ANÁLISE

DADOS DA DETERMINAÇÃO

METODO KVV
INÍCIO DA ANÁLISE 2019-08-04 13:26:39 UTC-3
ANALISTA

DADOS DA AMOSTRA

ID1 MELALEUCA
ID2 LOTE 070519
Sample size 1,3743 g

RESULTADOS OBTIDOS

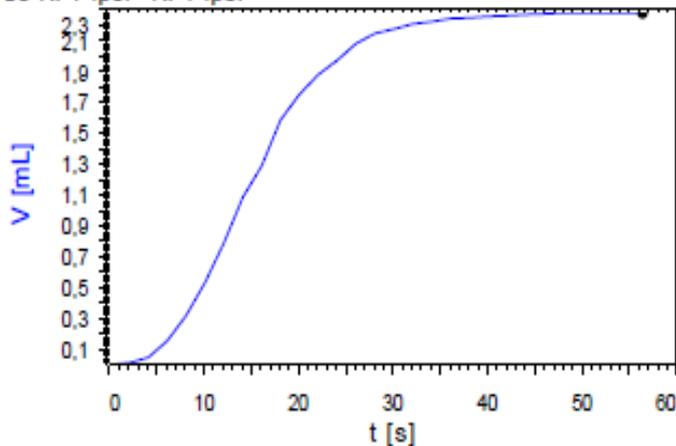
Pontos de Equivalência (EPs)

KFT Ipol 03-KFT Ipol
EP1 2,2820 mL 56,40 s

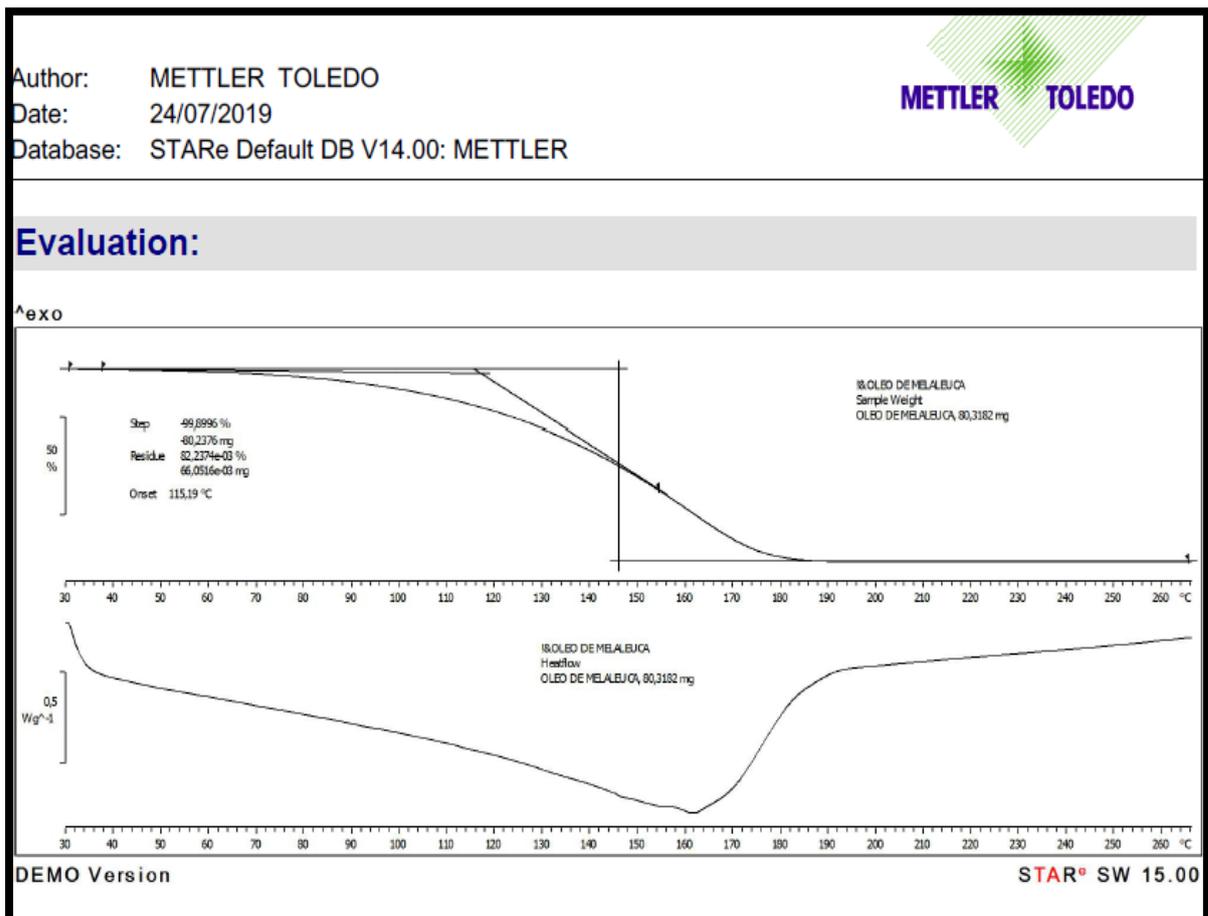
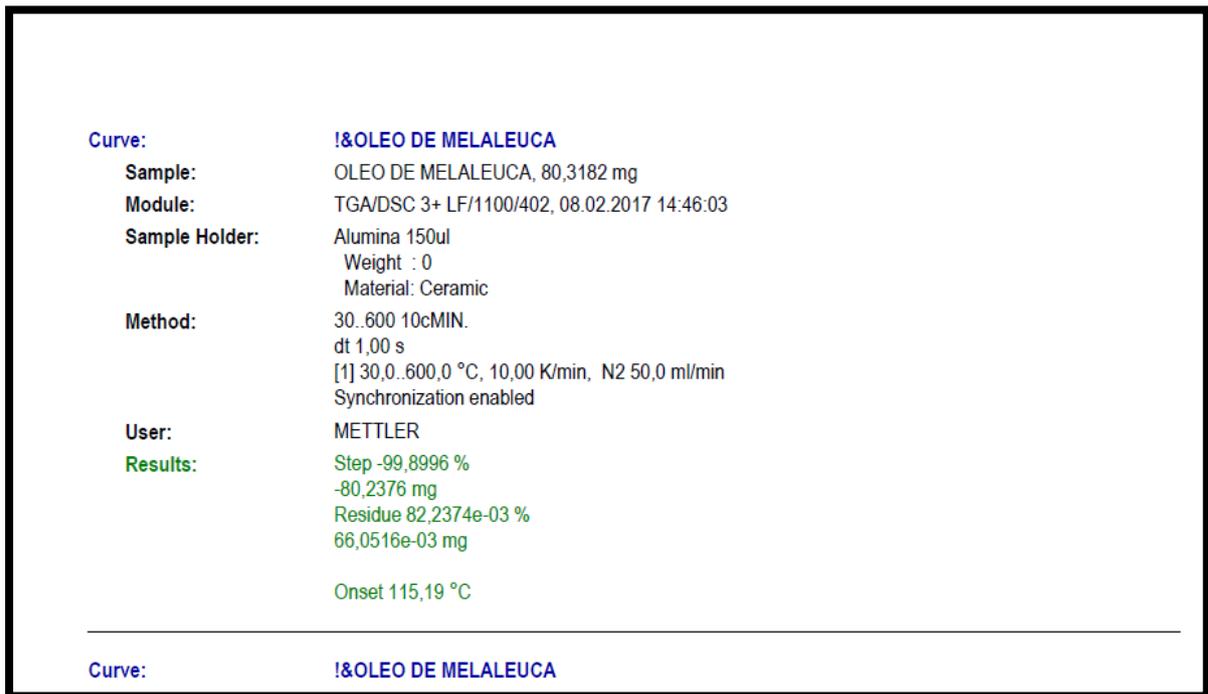
Resultados

KFT content (%) (1C.R1) 0,84 %

03-KFT Ipol - KFT Ipol



Apêndice 9. Avaliação da temperatura de decomposição dos componentes do óleo de *Melaleuca armillaris* por teste Termogravimetria



10. FONTES CONSULTADAS

DECS: http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/?IsisScript=../cgi-bin/decserver/decserver.xis&interface_language=p&previous_page=homepage&previous_task=NULL&task=start

MESH: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>