

# Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais de *Lippia sidoides* Cham por CLAE

## Analytic methodology validation for thymol dosages in vegetable extracts of *Lippia sidoides* Cham by HPLC

Rogéria de Sousa Nunes<sup>1</sup>; Bety Anne de Albuquerque Senna<sup>1</sup>; José Aleksandro da Silva<sup>2</sup> & Davi Pereira de Santana<sup>1\*</sup>

**RESUMO** – *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) é um arbusto do Nordeste do Brasil que contém em sua composição um óleo essencial rico em timol, na qual apresenta atividade antimicrobiana. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar a metodologia analítica, por CLAE, para a determinação do timol a partir do extrato hidroalcoólico da *Lippia sidoides* Cham. O presente método desenvolvido e validado, em sistema de fase reversa, mostrou-se sensível, preciso, econômico, reprodutível, robusto e linear na concentração de 0,0005-0,007 de timol.

**PALAVRAS-CHAVE** – Validação, timol, CLAE.

**SUMMARY** – *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae), a bush from Northeastern of Brazil, encloses an essential oil rich in thymol, which presents antimicrobial activity. The present work consists in the development, validation and analytical methodology for thymol vegetable extracts and its preparations. The results obtained show that thymol has a low quantification limit, that the analytical methodology is accurate, reproducible, robust and linear over the concentration range 0,0005-0,007 % of thymol.

**KEYWORDS** – Thymol; validation; HPLC.

### INTRODUÇÃO

**L**ippia *sidoides* Cham (Verbenaceae) é um arbusto do Nordeste do Brasil que contém em sua composição um óleo essencial rico em timol, na qual apresenta atividade antimicrobiana (Fernandes-Filho *et al.*, 1998; Nunes, 1999; Leal *et al.*, 2003) e quando incorporados em formulações galênicas, do tipo Creme Dental ou Colutório, reduzem o crescimento de placa bacteriana em humanos (Girão *et al.*, 2003).

A validação de uma metodologia analítica é um processo que fornece uma evidência documentada de que o método é confiável ao que se aplica, consistindo em uma série de procedimentos que visam assegurar credibilidade às medidas obtidas. É considerada uma etapa muito importante e necessária para que o método desenvolvido possa ser utilizado, e os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação e robustez devem ser analisados (Cass & Degani, 2001).

Os objetivos deste trabalho consistem no desenvolvimento e validação de metodologia analítica para o doseamento do timol de um óleo essencial extraído da *Lippia sidoides* Cham.

### MATERIAL E MÉTODO

#### Materiais

Acetonitrila grau HPLC (Merck); ácido acético glacial PA (Merck); água purificada obtida através de Milli-Q para uso em CLAE; fosfato bibásico de potássio PA (Merck); metanol PA (Merck); metanol grau HPLC (Merck) e timol padrão (Merck).

### METODOLOGIA

#### Padronização da matéria-prima vegetal

A matéria-prima, folhas e inflorescência da *Lippia sidoides* Cham utilizada no preparo do extrato hidroalcoólico, foi cultivada e coletada no período de floração, em uma área experimental do Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco (IPA) localizado no distrito de Itapirema, município de Goiana-PE. Uma excisada, desta espécie, encontra-se depositada no herbário da Universidade Federal de Pernambuco (Departamento de Botânica) e IPA sob o n° 52798 e que a mesma foi identificada e coletada pela taxonomista oficial do IPA Valdelice Correia Lima.

Recebido em 24/10/2005

<sup>1</sup>Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético, Departamento Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50739-520, Recife, Brasil, e-mail: d-santana@bol.com.br.

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, 58105-570, Brasil.

Para a obtenção do extrato hidroalcoólico, na forma de tintura, as partes aéreas do vegetal *Lippia sidoides* Cham (folhas e inflorescências) foram desidratadas em sala ventilada, temperatura ambiente e, posteriormente, trituradas em moinho manual. Após trituração, a granulometria foi realizada por tamisação, na qual foram utilizados tamises com aberturas de malhas de 2,5; 2,0; 1,6; 1,25; 0,8; 0,5; 0,25 mm e coletor, esta operação de tamisação foi realizada durante 35 minutos à 90 vibrações por minutos (Prista *et al.*, 1995). Em seguida, foi realizada maceração em percolador de inox com capacidade de 20 Litros, durante 8 dias utilizando álcool etílico à 70%, na proporção de 20:100 droga/solvente. Após este procedimento, a percolação foi realizada com ajuste de gotejamento de 30 gotas por minuto.

#### • Determinação do teor de óleo essencial

O teor de óleos essenciais da *Lippia sidoides* Cham foi determinado por arraste à vapor d'água, em aparelho de Clevenger modificado (Mesquita *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005). Para análises dos resultados foi considerado o volume de óleo essencial em 100g de droga vegetal e em percentual do vegetal dessecado conforme descrição da Farmacopéia Brasileira, IV edição.

#### • Recuperação do timol a partir da matriz vegetal

Foi realizado estudo de recuperação do timol a partir da matriz vegetal, por intermédio da adição de uma quantidade conhecida do padrão do timol ao extrato de *Lippia sidoides* Cham (Brasil, 2003), sendo expresso a partir do resultado encontrado (concentração média experimental) dividido pelo valor adicionado (concentração teórica) multiplicado por 100, sendo a recuperação média obtida das análises em quintuplicatas, conforme Carmona *et al.* (2003).

#### • Análise qualitativa e quantitativa do teor timol do extrato da *Lippia sidoides* Cham

Para a determinação da "impressão digital" da *Lippia sidoides* Cham, foi utilizado cromatografia em camada delgada, sendo utilizado uma solução padrão de timol à 1% (Merck). Os cromatogramas foram obtidos empregando-se como fase estacionária placas cromatográficas de gel sílica e como fase móvel, misturas em proporções volumétricas dos seguintes sistemas: Sistema I – Benzeno: acetato de etila (97:3) e vanilina sulfúrica para monoterpénóides como revelador. Sistema II – acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água (52:11:11:26) e difenilboriloxetilamina para fenóis como revelador segundo metodologia adotada por (Nunes, 1999).

O teor de timol foi determinado a partir do método desenvolvido e validado, neste estudo, no qual foi utilizado Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) com sistema de injeção manual, equipado com Loop de 20µL, modelo HP série 1100 e integrador HP série 3395. Os extratos foram tratados com clorofórmio, obtendo-se 04 partições, onde uma alíquota foi diluída em metanol PA (Merck) e injetada no cromatógrafo.

#### • Sistema cromatográfico

Para o desenvolvimento do método cromatográfico, foi utilizado como suporte uma Coluna Nucleosil® 100 C<sub>18</sub> 5µm (250x4mm) em fase reversa pelo método isocrático; água purificada e acetoneitrila (CH<sub>3</sub>CN), água purificada e metanol (MeOH) como fases móveis em pH variados. Os parâmetros definidos para o aparelho

foram: detecção no comprimento de onda  $\lambda = 276\text{nm}$ , fluxo de 1mL/min com a temperatura da coluna variando entre 25 à 45°C.

#### • Preparação da solução padrão

Uma solução padrão Farmacopeico de timol, foi preparada a 1% em metanol, sendo diluída e obtida várias concentrações: 0,0005 à 0,007%. As diluições foram injetadas em volume de 20µL em replicata, no cromatógrafo. Através da relação entre concentração de timol e a área do pico obtida como sinal, foram construídas as curvas de calibração.

#### • Análise e procedimento de validação

##### Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. A determinação da robustez, do referido método, foi observada mediante variações do pH da fase móvel, variação na concentração e na composição da fase orgânica e variações na temperatura da coluna, entre 25 e 45°C (Brasil, 2003; Nunes, 1999; Swartz & Krull, 1997).

Para a determinação da sensibilidade do sistema, foram avaliados, o número de pratos teóricos (N), o fator de capacidade (K) e a resolução (Rs) do sistema cromatográfico, usando diferentes fases móveis. Esses parâmetros foram calculados de acordo com as equações (1), (2) e (3) respectivamente (USP, 1995).

$$N = 16(t_r/w)^2 \text{ ou } N = 5,54(t_r/w_{h/2}) \quad (1)$$

Onde, N é o número de pratos teóricos,  $t_r$  é o tempo de retenção da amostra de timol e w é a largura dos picos.

$$K = (t_r/t_{rs}) - 1 \quad (2)$$

Onde, K é o fator de capacidade,  $t_r$  é o tempo de retenção da amostra de timol e  $t_{rs}$  é o tempo de retenção do solvente.

$$Rs = \alpha(t_r - t_{rs}/w_1 + w) \quad (3)$$

Onde, Rs é a resolução entre dois picos cromatográficos,  $t_r$  é o tempo de retenção da amostra de timol,  $t_{rs}$  é o tempo de retenção do solvente, w e  $w_1$  representam as larguras dos picos avaliados, pico do timol e pico do solvente respectivamente.

##### Linearidade

A linearidade da metodologia foi testada com uma solução diluída, em metanol, de concentração entre 0,0005 a 0,007% de timol. Linearidade é a capacidade de um método analítico gerar resultados proporcionais à concentração do composto em questão, dentro de uma faixa analítica especificada, sendo possível relacionar a resposta do detector à concentração estudada (Cass & Degani, 2001; Brasil, 2003).

##### Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados, embora não necessariamente o correto, obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão é considerada em três níveis: repetibilidade (precisão intracorrída) – concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação; precisão intermediária (precisão intercorrída) – expressa o efeito das variações dentro do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com

analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes; reprodutibilidade (precisão interlaboratorial) – mede a precisão do método quando executado em diferentes laboratórios (Cass & Degani, 2001; Brasil, 2003).

#### Exatidão

A exatidão descreve a proximidade da média dos resultados obtidos em um teste, numa determinada concentração em relação ao valor real, ou seja, é a relação entre o valor encontrado pelo método e o valor aceito como verdadeiro ou de referência, sendo, normalmente, determinada por intermédio de, no mínimo, análises em quintuplicatas de três diferentes concentrações, sendo uma em baixa, uma em média e outra em alta concentração, respectivamente (Cass & Degani, 2001; Brasil, 2003).

#### Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é a menor concentração de um analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação (LQ), inferior e superior é a menor e maior, respectivamente, quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Estes parâmetros, LD e LQ foram calculados de acordo com as equações (4) e (5) respectivamente, (USP, 1995; Brasil, 2003).

$$LD = DP_a \times 3/IC \quad (4)$$

$$LQ = DP_a \times 10/IC \quad (5)$$

Onde,  $DP_a$  é o desvio-padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. IC é a inclinação da curva de calibração.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil cromatográfico em cromatografia de camada delgada (CCD), permitiu evidenciar, tanto no sistema I como no sistema II, a identidade química da *Lippia sidoides* Cham, pois foi claramente evidenciado em função da coloração específica frente ao padrão timol, ou seja, mostrou-se um perfil cromatográfico com manchas que correspondiam a heterosídeos de flavona e heterosídeos de flavanonas.

O teor de óleo essencial, das folhas e inflorescência da *Lippia sidoides* Cham, encontrados, em aparelho clevenger modificado, foi da ordem de 5,3% m/v para o material dessecado e que os teores de timol encontrados no mesmo, em torno de  $2,14 \pm 0,4$  mg/mL, estão em concordância com Leal *et al* (2003).

#### Optimização das condições da metodologia – Robustez do método

Para obtenção de uma completa resolução dos cromatogramas para determinação do timol, foi necessário estabilizar as condições do aparelho. Para isto, foi selecionado como parâmetro de otimização a robustez, na qual foi avaliado a composição da fase orgânica, o valor de pH e a temperatura da coluna (Tabela I).

A adição de ácido acético glacial provocou variações de pH da fase móvel, porém estas alterações do pH não exerceram influência de caráter negativo nas

análises, pois não ocorreram alterações no tempo de retenção das amostras Tabela I. O que determinou uma diminuição no tempo de retenção do timol foram modificações na temperatura da coluna como mostra os dados da Tabela II.

Os testes de sensibilidade são partes dos requisitos para a determinação de uma metodologia cromatográfica e baseiam-se no conceito de que o equipamento, componentes eletrônicos, operações analíticas e amostras constituem um sistema integral que pode ser avaliado como um todo (Nunes, 1999). O número de pratos teóricos (N) é a medida da eficiência da coluna e esta medida foi calculada pela equação (1), através da medida dos picos Gaussianos dos sistemas contendo a mistura MeOH/H<sub>2</sub>O (85:15) (v/v) e CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (55:45) (v/v). Para o sistema MeOH/H<sub>2</sub>O (85:15) (v/v) N foi igual a 79,083 e para o sistema CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (55:45) (v/v) N foi 15880,131. Sendo assim, observou-se que o número de pratos é diretamente proporcional a sua resolução (Rs) e que o sistema CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (55:45) (v/v) apresentou melhor resolução (Rs). Estes resultados estão em concordância com Swartz & Krull (1997) que recomenda um N maior que 2000.

O fator de capacidade (K), é definido como a relação entre a quantidade de substância na fase estacionária pela quantidade de substância na fase móvel, cujo pico da amostra, no caso o timol, deve apresentar melhor resolução que os outros picos com um valor de K maior que dois (Lough & Wainer, 1995). Para o sistema CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (55:45) (v/v) foi encontrado, a partir da equação 2, um valor de K = 3,38.

A Rs é a quantificação do grau de separação e leva em consideração à distância entre o máximo de picos e a largura das bandas. Assim, Rs entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo deverá ser maior que dois (Lough & Wainer, 1995). No sistema CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (55:45) (v/v), calculado a partir da

**TABELA I**  
Determinação do tempo de retenção (T<sub>r</sub>) e do pH dos sistemas com variações e modificações na composição da fase móvel para o parâmetro Robustez

Sistema	T <sub>r</sub> (min) ± s (CV%)	pH ± s (CV%)
MeOH-ÁGUA (60:40)	6,2 ± 0,12 (1,91)	7,2 ± 0,18 (2,5)
MeOH-ÁGUA (80:20)	3,5 ± 0,19 (2,55)	6,8 ± 0,22 (3,23)
MeOH-ÁGUA (85:15)	3,4 ± 0,16 (4,70)	6,5 ± 0,15 (2,30)
MeOH-ÁGUA-ACTG (85:14:1)	3,5 ± 0,15 (4,19)	4,5 ± 0,19 (4,22)
CH <sub>3</sub> CN-ÁGUA (40:60)	16,6 ± 0,11 (0,661)	6,2 ± 0,23 (3,7096)
CH <sub>3</sub> CN-ÁGUA (50:50)	10,2 ± 0,13 (1,2622)	6,4 ± 0,21 (3,2812)
CH <sub>3</sub> CN-ÁGUA (55:45)	7,5 ± 0,16 (1,125)	6,5 ± 0,15 (2,3076)
CH <sub>3</sub> CN-ÁGUA-ACTG (55:44:1)	7,4 ± 0,18 (2,4025)	3,9 ± 0,143 (3,66)

CH<sub>3</sub>CN = acetoneitrina; MeOH = metanol; ACTG = ácido acético glacial; T<sub>r</sub> = tempo de retenção; s = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

**TABELA II**  
Relação entre o tempo de retenção das amostras versus a temperatura usando a fase móvel MeOH-ÁGUA (60:40) na concentração do timol

T °C ± s	T <sub>r</sub> (min.) ± s (CV%)	Timol (%)
25,2	7,622 ± 0,12 (1,57)	0,003992
37,0	7,06 ± 0,25 (3,5390)	0,003895
40,0	7,01 ± 0,18 (2,5670)	0,004002
45,0	6,8 ± 0,19 (2,7871)	0,003982

T<sub>r</sub> = tempo de retenção; s = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; T = temperatura

equação 3, a Rs foi de 8,5 com um tempo de corrida menor que 8 minutos. Sendo assim, a fase móvel selecionada para validação do ensaio foi a mistura CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (55:45) (v/v), uma vez que esta fase, apresentou melhores condições em todos os parâmetros estudados cujo sistema cromatográfico de fase reversa, fornece boa resolução (Rs), dentro do limite de 10 minutos de corrida.

### Validação do ensaio

Após a otimização das condições analíticas, os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação foram avaliados. A linearidade do ensaio foi testada com uma solução diluída, em metanol, de concentração entre 0,0005 à 0,007% de timol, realizando três repetições autênticas conforme descrito na Tabela III.

A relação área do pico (Y) e a concentração do padrão (X) esta descrita na Tabela IV, e os resultados obtidos foram expressos em termos de áreas, desvio padrão e coeficiente de variação (CV), onde  $Y = a + bx$ . O tratamento estatístico dos resultados obtidos pelo modelo linear dos mínimos quadrados ordinários foi validado por meio da análise de variância (ANOVA), cujos elementos estão descritos na Tabela V. Uma boa

**TABELA III**  
Linearidade do método a partir de uma solução diluída em metanol com as suas respectivas áreas, médias de três repetições autênticas

Concentração de Timol (%)	Áreas mVs			Xm	S	CV(%)
	C1	C2	C3			
0,0005	623206	627063	625450	625239,7	1937,083	0,309815
0,001	1382784	1359036	1397888	1379903	19585,61	1,419347
0,002	2747118	2735952	2757685	2746918	10867,88	0,395639
0,003	4046830	4023066	4063470	4044455	20306,41	0,502080
0,004	5397331	5381443	5459533	5412769	41270,58	0,762467
0,005	6427187	6443795	6463738	6444907	18300,84	0,283958
0,006	8011130	7999632	8021888	8010883	11130,05	0,138937
0,007	9257875	9133600	9232730	9208068	65705,53	0,713565

**TABELA IV**  
Equação da reta de calibração do timol  $y = a + bx$ , que mostra a relação área do pico (Y) e a concentração do padrão (X)

Método CLAE (parâmetro)	Valores	Erro padrão
a	48782,08841	39840,73713
b	1,32446E9	9,81874E6
R	0,99986	-
Desvio-padrão	59203,96475	-
N	7	-

**TABELA V**  
Análise de Variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados

Fonte	Soma quadr. (SQ)	Graus de liberdade	Média quadr. (MQ)
Regressão	1,999058e+014	1	1,999058+014
Residual	2,060550e+011	22	9,366137e+009
Falta de ajuste	1,912608e+011	6	3,187681e+010
Erro puro	1,479417e+010	16	9,246358e+008
Total	2,001119e+014	23	8,700516e+012

$F_{calculado} = 34,47$

$F_{tabelado} = 21343,47$

Variância explicada = 99,90 %

Variância explicável máxima = 99,99 %

maneira de avaliar matematicamente a qualidade de um modelo é comparar as médias quadráticas que são obtidas pela divisão das somas quadráticas por seus respectivos graus de liberdade; quanto maior o valor desta razão ( $MQ_{reg}/MQ_r$ ), melhor é o modelo (Barros Neto *et al*, 2003).

A repetibilidade (precisão intra-corrida) foi avaliada a partir de injeções em sextuplicatas conforme Brasil (2003) e ICH (1996) onde a concentração testada de 0,004% foi escolhida por representar o ponto médio do intervalo especificado pelo procedimento (0,0005 à 0,007%), mostrado na Tabela VI, e expressado pela média ( $\bar{X}_m$ ), desvio padrão (s) e Coeficiente de Variação (CV%).

Os ensaios de precisão intermediária (precisão inter-corrida) e de reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) foram realizados por dois analistas em laboratórios e aparelhos distintos e em dias diferentes (Santana *et al*, 2004; Brasil, 2003) e os valores expressados nas Tabelas VII e IX, com os seus respectivos parâmetros estatístico Tabelas VIII e X, respectivamente. A precisão intermediária expressa os efeitos das variações dentro do mesmo laboratório e a reprodutibilidade expressa seus efeitos entre laboratórios diferentes (Brasil, 2003; ICH, 1996). Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre ana-

**TABELA VI**  
Ensaio de repetibilidade (precisão intracorrida) com os valores médios das áreas dos picos na concentração de 0,004%

Repetições	Área dos picos da amostra	Concentração (0,004%)
1	539,7331	0,00406
2	537,2344	0,00404
3	526,0355	0,003957
4	533,4528	0,004013
5	510,52213	0,003838
6	518,9312	0,003903
Média	527,6347	0,00397
S	11,37528	0,000087
CV %	2,155901	2,20

CV = coeficiente de variação

**TABELA VII**  
Avaliação da precisão intermediária entre analistas diferentes no NUDFAC expresso em % timol

NUDFAC			
Analistas			
A		B	
Dias			
a	b	c	d
$\bar{X}_m = 0,003982$	$\bar{X}_m = 0,003988$	$\bar{X}_m = 0,00398$	$\bar{X}_m = 0,00395$
$S = 0,265$	$S = 0,13$	$s = 0,28$	$s = 0,8$
$CV \% = 0,26$	$CV \% = 0,13$	$Cv \% = 0,3$	$CV \% = 0,87$

$\bar{X}_m$  = média; Comparação de a e b; c e d; e e f; g e h / Comparação A e B

**TABELA VIII**  
Resultados obtidos a partir da ANOVA - Fator Único Excel, para ensaio de precisão intermediária no NUDFAC expresso em % de timol ( $\alpha = 0,05$ )

Fonte da Variação	SQ	Gl	MQ	F	Valor-P	F crítico
Entre grupos	1,13E-08	3	3,7666E-09	0,513636	0,684197	4,066
Dentro dos grupos	5,866E-08	8	7,3333E-09			
Total	6,996E-08	11				

Gl = graus de liberdade; SQ = soma quadrática; MQ = média quadrática

**TABELA IX**  
Avaliação da precisão intermediária (precisão intercorridas) entre analistas e dias diferentes no Pharmus expressa em % de timol

PHARMUS			
Analistas			
A		B	
Dias			
e	f	g	h
Xm = 0,00384	Xm = 0,003832	Xm = 0,003878	Xm = 0,0038
s = 0,5 s = 0,6	s = 0,7	s = 0,4	
CV % = 0,7	CV % = 0,63	CV % = 0,55	CV % = 0,95

Xm = média; s = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

**TABELA X**  
Resultados obtidos através da ANOVA - Fator Único Excel, para ensaio de precisão intermediária (intercorridas) no Pharmus ( $\alpha = 0,05$ )

Fonte da Variação	SQ	Gl	MQ	F	Valor-P	F crítico
Entre grupos	1,481E-07	3	4,9392E-08	1,272006	0,347739	4,0661
Dentro dos grupos	3,106E-07	8	3,8830E-08			
Total	4,588E-07	11				

Gl = graus de liberdade; SQ = soma quadrática; MQ = média quadrática

listas, dias e laboratórios. Estes resultados foram obtidos a partir do método estatístico ANOVA Fator único/Excel com o  $\alpha = 0,05$ . Os Laboratórios envolvidos nestes ensaios foram o NUDFAC (Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosméticos) e o Pharmus Química e Farmacêutica Ltda.

A exatidão do método foi determinada mediante estudo de recuperação, da matriz vegetal, por intermédio da adição de uma quantidade conhecida do padrão timol ao extrato de *Lippia sidoides* Cham (Brasil, 2003), sendo expresso a partir do resultado encontrado (concentração média experimental) dividido pelo valor adicionado (concentração teórica) multiplicado por 100. A recuperação média encontrada, análises em quintuplicatas, foi na ordem de 65 a 70% com um coeficiente de variação de 3,2%, valores estes, bem próximo do encontrado por Carmona *et al* (2003).

Os parâmetros limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram 1,47E-4 e 4,47E-4 respectivamente. Sendo que o LD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com certo intervalo de confiança, correspondendo a um teste limite que especifica se a substância em exame está

ou não presente na amostra. Enquanto que o LQ representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser quantificada com um certo intervalo de confiança pré-estabelecido (Brasil, 2003).

Neste estudo, pode-se concluir que o presente método cromatográfico desenvolvido e validado, em sistema de fase reversa, mostrou-se sensível, preciso, econômico, reprodutível, robusto e linear, podendo ser utilizado, portanto, para avaliação da concentração do timol em formulações galênicas que utilizam o extrato hidroalcoólico da *Lippia sidoides* Cham.

## REFERÊNCIAS

- Barros Neto, B.; Scarmínio, I.S.; Bruns, R.E. *Como Fazer Experimentos*. Editora da Unicamp: Campinas, 2003.
- Brasil. Resolução RE nº 899, de 29 de Maio de 2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF: ANVISA, 29 de Maio 2003.
- Carmona, B.A.; Alea, J.P.; Estrada, R.E. Validacion de la técnica analítica para la determinacion de aceite volátil em la tintura de jenjibre al 50%. *Revista Cubana de Plantas Medicinables*, v. 8, nº 1, 2003.
- Cass, Q.B.; Degani, A.L.G. *Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégias e Validação*. Editora da UFSCar: São Carlos, 2001.
- Farmacopéia Brasileira IV*. São Paulo, Andrei editora, 2003.
- Fernandes-Filho, E.S.; Morais, S.M.; Fonseca, S.G.C.; Mota, O. M.L. Preparação e avaliação clínica de um anti-séptico bucal à base do óleo essencial da planta medicinal *Lippia sidoides* Cham (Alecrim pimenta). *Revista da Associação Brasileira de Odontologia*, v. 6, Out/Nov, p. 323-325, 1998.
- Girão, V.C.C.; Nunes-Pinheiro, D.C.S.; Morais, S.M.; Sequeira, J.L.; Gioso, M.A.A. clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 59, p. 95-102, 2003.
- ICH topic Q-2b *Validation of analytical procedures: Methodology*. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, 1996.
- Leal, L.K.A.M.; Oliveira, V.M.; Araruna, S.M.; Miranda, M.C.C.; Oliveira, F.M.A. Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13, supl., p. 09-11, 2003.
- Lough, W.J.; Wainer, I.W. *Method Development and Quantitation*. Blackie Academic & Professional: Glasgow, 1995.
- Mesquita, J.M.O.; Cavaleiro, C.; Cunha, A.P.; Lombardi, J.A.; Oliveira, A.B. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de piperaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15 (1), Jan/Mar, p. 6-12, 2005.
- Nunes, R. S. Desenvolvimento galênico de produtos de uso odontológico (Creme Dental e Enxaguatório Bucal) a base de *Lippia sidoides* Cham Verbenaceae – Alecrim pimenta. 1999, 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Oliveira, R.N.; Dias, I.J.M.; Câmara, C.A.G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15 (1), Jan/Mar, p. 31-43, 2005.
- Prista, L.V.N., Alves, C.A., Morgado, R.M.R. *Tecnologia Farmacêutica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.
- Santana, D.P.; Castro, R.F.; Silva, L.B.L.; Fonseca, S.G.C. Validação de metodologia analítica para o doseamento de soluções de lapachol por CLAE. *Química Nova*, 2004, 27, nº 1, 157-159.
- Swartz M.E.; Krull I.S. *Analytical method development and validation*. Marcel Dekker, New York, 1997.
- USP XXIII (*United States Pharmacopeial Convention*. Rockville MD). 1995.