

Artigo

Validação de Métodos por CG-EM para Análise de Carvacrol e *trans*- β -Cariofileno em Amostras Comerciais Contendo Óleos Essenciais

Oliveira, F. C.;* Camelo, A. L. M.; Silva, F. F. M.; Souza, F. T. C.; Longhinotti, E.; Barbosa, F. G.; Nascimento, R. F.

Rev. Virtual Quim., 2017, 9 (3), 924-933. Data de publicação na Web: 19 de junho de 2017

<http://rvq.sbq.org.br>

Method Validation by GC-MS for Analysis of Carvacrol and *trans*- β -Caryophyllene in Commercial Samples Containing Essential Oils

Abstract: Carvacrol and *trans*- β -caryophyllene are widely found several medicinal plants, being assigned to these compounds various pharmacological properties. Therefore, this work presents a validation method for these compounds in the species of *Lippia sidoides* and *Rosmarinus officinalis* and a copaiba oil sample available in popular trade in Fortaleza. Thus, essential oil samples were diluted and analyzed in a gas chromatograph with mass spectrometric detector (GC-MS). Validation parameters showed satisfactory values, such as linearity, lower limit of detection and quantitation, reproducibility at different days (inter-day) considerable analysis and recovery values. Of the compounds studied, the *Lippia sidoides* species presented a percentage of 32.01 of carvacrol and 1.78 of *trans*- β -caryophyllene, respectively. To *R. officinales* found a percentage of 0.28 and 0.34 respectively for carvacrol and *trans*- β -caryophyllene. For oil copaiba not logged carvacrol, however, the *trans*- β -caryophyllene, was present in amount of, 74.5%. With the results, the method can be considered as a useful analytical tool for quality control of *trans*- β -caryophyllene and carvacrol and the derivatives in the essential oils.


Keywords: Carvacrol; *trans*- β -caryophyllene; validation; *Rosmarinus officinalis*; *Lippia sidoides*; copaiba.

Resumo

Carvacrol e *trans*- β -cariofileno são amplamente encontrados em diversas espécies de plantas medicinais, sendo a estes compostos atribuídos várias propriedades farmacológicas. Com isso, este trabalho apresenta a validação de um método analítico para a análise destes compostos nas espécies *Lippia sidoides* e *Rosmarinus officinalis*, bem como em uma amostra de óleo de copaíba disponibilizada no comércio popular de Fortaleza. As amostras dos óleos essenciais foram analisadas em um cromatógrafo gasoso com detector de massas (CG-EM). Os parâmetros de validação, tais como linearidade, limite de detecção e quantificação apresentaram valores satisfatórios, com boa reprodutibilidade e recuperação para as análises realizadas em dias diferentes. Dos compostos estudados, a espécie *Lippia sidoides* apresentou um percentual de 32,01 de carvacrol e 1,78 de *trans*- β -cariofileno. Para a espécie *R. officinales* constatou-se um percentual de 0,28 e 0,34, respectivamente para carvacrol e *trans*- β -cariofileno. Para o óleo da copaíba não se identificou o carvacrol, o *trans*- β -cariofileno apresentou percentual de 74,5. Com os resultados obtidos, o método pode ser considerado como uma ferramenta analítica útil para o controle de qualidade de carvacrol, *trans*- β -cariofileno e seus derivados em amostras de óleos essenciais.

Palavras-chave: Carvacrol; *trans*- β -cariofileno; validação de metodologia; *Rosmarinus officinalis*; *Lippia sidoides*; copaíba.

* Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, campus do Pici, CEP 60440-900, Fortaleza-CE, Brasil.

 carlosquimico@gmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20170059](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170059)

Validação de Métodos por CG-EM para Análise de Carvacrol e *trans*- β -Cariofileno em Amostras Comerciais Contendo Óleos Essenciais

Francisco Carlos de Oliveira,^{a,*} André Luiz M. Camelo,^b Francisco Felipe M. da Silva,^a Francisco Thiago C. de Souza,^b Elisane Longhinotti,^b Francisco Geraldo Barbosa,^a Ronaldo F. Nascimento^b

^a Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, campus do Pici, CEP 60440-900, Fortaleza-CE, Brasil.

^b Universidade Federal Do Ceará, Departamento de Química Analítica e Físico-Química, campus do Pici, CEP 60440-900, Fortaleza-CE, Brasil.

* carlosqumico@gmail.com

Recebido em 31 de agosto de 2016. Aceito para publicação em 18 de junho de 2017

1. Introdução
2. Materiais e Métodos
3. Resultados e Discussão
4. Conclusão

1. Introdução

As plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e são tradicionalmente utilizadas como remédio em uma população ou comunidade. No entanto, para que tenham o efeito desejado é preciso conhecer a planta e saber onde colhê-la e como prepará-la. Quando a planta medicinal é industrializada para se obter um medicamento, tem-se como resultado o fitoterápico. O processo de industrialização evita contaminações por microrganismos, agrotóxicos e substâncias estranhas, além de padronizar a quantidade e a forma certa que deve ser usada, permitindo uma maior segurança de uso.¹

Os fitoterápicos são largamente

comercializados e prontamente disponíveis sem receita médica nas farmácias, drogarias e outros estabelecimentos de varejo. Estão disponíveis também para compra *online* através de varejistas da internet. Embora alguns produtos tenham sido avaliados em ensaios clínicos controlados, muitas vezes as evidências sobre a eficácia e segurança são insuficientes para fornecer orientação clínica adequada.^{2,3}

Entre as inúmeras espécies de plantas usadas na medicina tradicional, a *Lippia sidoides*, a *Rosmarinus officinalis* e a *Copaiba* sp. são amplamente aplicadas na medicina popular com reconhecidas atividades farmacêuticas, sendo comercializadas inclusive como fitoterápicos. O óleo essencial da primeira possui atividade antimicrobiana, anti-espasmódica,⁴ anti-inflamatória,⁶ citotóxica⁵, entre outras. Para a composição

química volátil da segunda espécie, são atribuídas atividades antioxidantes,⁶ antibacteriana⁷ e citotóxica.¹⁰ A última possui atividade antibacteriana,⁴ antiinflamatória⁸ e anticâncer.⁸

Essas propriedades farmacológicas são bem relatadas pela literatura.^{9,10} O carvacrol e *trans-β*-cariofileno estão presentes nestas espécies (*trans-β*-cariofileno presente em todas as amostras e o carvacrol ausente apenas na espécie *Copaiba* sp).

Nesse contexto a validação de métodos para quantificação dos constituintes químicos considerados como princípios ativos destas espécies usadas na medicina tradicional, bem como na formulação de fitoterápicos, tornam-se indispensáveis para garantir a qualidade dos mesmos.¹¹ A validação visa desenvolver metodologias que possibilitem a determinação das concentrações das substâncias responsáveis pelas ações farmacológicas de forma mais segura e reprodutível. Através da otimização de procedimentos experimentais é permitida a análise qualitativa e quantitativa dos compostos bioativos, resultando em métodos que podem contribuir para um controle de qualidade mais eficiente por parte dos órgãos de fiscalização para a comercialização destes fitoterápicos.¹

Assim, o presente trabalho teve como objetivo validar um método analítico para análise qualitativa e quantitativa do carvacrol e *trans-β*-cariofileno em amostras vegetais *in natura* assim como em produtos industrializados que possuem essas substâncias como princípios ativos.

2. Materiais e Métodos

Material botânico e amostras comerciais

As folhas frescas de *L. sidoides* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos, na Universidade Federal do Ceará (UFC) no dia 14 de janeiro de 2013. Um exemplar desta

espécie encontra-se depositado no herbário Prisco Bezerra (UFC) sob exsicata de voucher 25149. As folhas desidratadas da amostra comercial designada por Alecrim e o óleo comercial da copaíba foram obtidos no comércio local de Fortaleza-CE.

Reagentes e padrões

Sulfato de sódio anidro P.A (99,0 %), da marca Vetec[®]; Diclorometano (99,5%), da marca Synth[®]; Carvacrol ($\geq 98,0$ %) da marca Fluka[®]; Eugenol ($\geq 98,0$ %) e *trans-β*-cariofileno (98,5 %) foram da marca Sigma-Aldrich[®].

Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial das folhas frescas de *L. sidoides* (100 g) e das folhas desidratadas do Alecrim comercial (100 g) foram realizadas em triplicata em um sistema tipo Clevenger por um período de 2 h. Após a extração dos óleos essenciais (1,82 % m/m de *L. sidoides* e 0,57 % m/m de Alecrim comercial), os mesmos foram secos com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), filtrado e armazenado em *freezer* ao abrigo da luz.

Análise instrumental

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas da marca Shimadzu[®] (modelo GCMS - QP 2010) utilizando uma coluna capilar DB-5, fase estacionária 5% difenildimetilsiloxano de 20 metros de comprimento, diâmetro interno de 0,18 mm e com espessura de filme de 0,40 μm (J&W Scientific[®]). Utilizou-se o programa GCMS Solution-versão 2.30 (Shimadzu[®]) para obtenção e tratamento dos dados cromatográficos.

Para as análises a programação de aquecimento do forno cromatográfico

estabelecida foi de 80 °C (3 minutos) → 3 °C/minuto até 145 °C → 40 °C/minuto até 265 °C (2 minutos). Os parâmetros instrumentais utilizados foram: temperatura do injetor de 250 °C; modo de injeção *split* de 1:10; vazão volumétrica da fase móvel (Hélio) de 0,59 mL/minuto; temperatura da interface de 300 °C; análises realizadas no modo SCAN em uma faixa de 18 a 400 m/z (em intervalos de 0,5s e com energia de ionização de 70 eV); temperatura do detector de 250 °C.

Parâmetros de Validação

Para obtenção de uma boa seletividade, foi realizado um estudo de otimização das condições cromatográficas, como por exemplo, o estudo do fluxo ideal da fase móvel utilizando os parâmetros de melhor eficiência da curva de Van Deemter (estudo não detalhado neste trabalho). Utilizou-se o método de varredura de íons, método SCAN, de modo a obter uma boa separação dos constituintes nas amostras, seguindo pelo método de monitoramento de íons (SIM), buscando tornar a análise ainda mais sensível e seletiva aos compostos de interesse.

A linearidade foi verificada utilizando-se o método do padrão interno. Para tanto soluções estoque do carvacrol, *trans*- β -cariofileno e eugenol (Padrão Interno) foram preparadas na concentração de 8020 $\mu\text{g/mL}$,

8885 $\mu\text{g/mL}$ e 4015 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em seguida, foram preparadas soluções mistas em diclorometano de carvacrol nas concentrações 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ e *trans*- β -cariofileno nas concentrações 50,0; 96,0; 152,0; 200,0; 296,0; 400,0; 497,0 e 698,0 $\mu\text{g/mL}$. Para cada solução de trabalho foi adicionado um volume fixo da solução estoque do padrão interno de modo que sua concentração na solução correspondesse a 200,0 $\mu\text{g/mL}$.

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados pelo método visual, relação sinal ruído (S/R = 3). Desta forma, utilizou-se a solução de menor concentração na curva de calibração do *trans*- β -cariofileno e Carvacrol. A partir destas soluções, outras de concentrações inferiores foram sendo preparadas por diluições sucessivas e injetadas 1 μL no sistema CG-EM, até obtenção de uma razão sinal/ruído de aproximadamente 3 para o limite de detecção e de aproximadamente 10 para o limite de quantificação.¹²

A precisão do método foi avaliada pelo coeficiente de variação, % do sinal obtido, Equação 1, precisão intra-corrída e inter-corrída, em que foram avaliados três níveis de concentrações, baixa, média e alta da curva de calibração, todas em triplicata. A análise inter-corrída foi realizada doze dias após a análise intra-corrída e com operador diferente.

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média Determinada}} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Os testes de recuperação (estimativa da exatidão) foram realizados na matriz de trabalho (óleo essencial). Como essa matriz não era isenta dos analitos foi necessário quantificar previamente os analitos para posteriormente serem adicionadas

concentrações definidas em diferentes níveis, baixo, médio e alto, todas em triplicata. Este parâmetro foi determinado pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, Equação 2.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

A análise quantitativa do carvacrol e do *trans*- β -cariofileno nas amostras de trabalho foram determinadas após preparar uma solução de 10 mL contendo 10 μ L da amostra e uma concentração de 200,0 μ g/mL de padrão interno. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e para o cálculo da concentração dos compostos foi levada em consideração os fatores de diluição, densidade e os parâmetros da curva analítica.

3. Resultados e Discussão

Seletividade

Muitos trabalhos envolvendo o estudo da composição de óleos essenciais têm mostrado que há grande diversidade de substâncias voláteis presentes nessas amostras, o que dificulta a separação e identificação dos compostos de interesse.¹³⁻¹⁵ Desta forma, a utilização da cromatografia

gasosa tem sido uma importante ferramenta devido a sua praticidade e grande eficiência na separação de amostras complexas principalmente quando associada a detectores, tais como o espectrômetro de massas.¹⁶⁻¹⁷ O perfil cromatográfico dos padrões é mostrado na Figura 1 e foi obtido após análise prévia da matriz de trabalho, ou seja, do óleo essencial.

Observa-se no cromatograma (Figura 1) que a separação total dos padrões ocorre por volta de 24 minutos. Essa condição se tornou necessária devido à complexidade da amostra, que contém outras substâncias as quais eluem da coluna no intervalo de 5 a 15 minutos de corrida cromatográfica, evitando-se assim a sobreposição de picos dos padrões com os compostos da amostra de óleo essencial. Com base nos dados dos espectros de massas foram selecionados os fragmentos de massa/carga (m/z) relativos a cada pico (Tabela 1), de modo a aumentar a seletividade da análise.

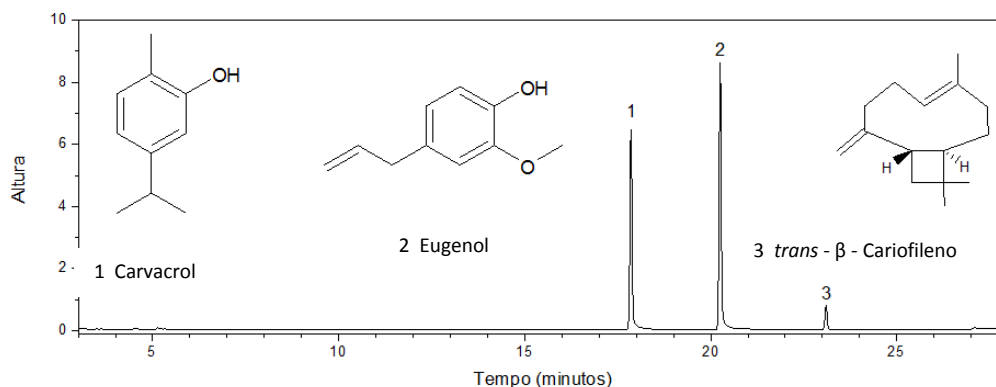


Figura 1. Cromatograma dos padrões (1) Carvacrol, (2) Eugenol (PI) e (3) *trans*- β -cariofileno, obtido pelo CG-EM

Tabela 1. Fragmentos de massas

Composto	Fragmentos (m/z)
Carvacrol	51; 55; 65; 77; 79; 91; 105; 107; 115; 135.
Eugenol	51; 55; 65; 77; 79; 91; 92; 103; 105; 122; 131; 133; 137; 149.

A utilização do detector de massas proporciona uma boa seletividade para o

método, principalmente quando da aplicação do modo de monitoramento de íons

selecionados (SIM) o qual melhora a sensibilidade e seletividade da detecção, uma vez que no modo SIM o detector seleciona apenas os fragmentos de interesse no referido tempo de retenção, e conseqüentemente faz com que possíveis compostos interferentes com tempos de retenção iguais aos dos analitos não sejam detectados.¹⁸

Curva analítica e Faixa linear

O estudo da faixa linear de trabalho foi realizado para definir o intervalo de concentração para quantificação precisa dos analitos, carvacrol e *trans*- β -cariofileno. Por outro lado, a linearidade foi avaliada pelo método do padrão interno, que corrige erros do analista (ex. volume de injeção) e instrumentais (ex. temperatura do injetor). O Eugenol foi selecionado como padrão interno por apresentar pureza e similaridade aos

analitos de interesse e também por não estar presente na amostra estudada. Conforme os resultados apresentados na Tabela 2, o método do padrão interno se mostra satisfatório, pois segundo a ANVISA¹⁹ o coeficiente de correlação, parâmetro utilizado para avaliar a curva de calibração, deve apresentar um valor superior a 0,990.

As curvas analíticas, tanto para padrão externo como interno, foram obtidas por regressão linear utilizando planilhas eletrônicas e são informadas na Tabela 2. A análise comparativa da eficiência das curvas dos compostos estudados, através do coeficiente de correlação (R), indica que as equações da reta de carvacrol e *trans*- β -cariofileno obtidas pelo método do Padrão Interno apresentam uma maior correlação linear que as obtidas em relação ao método do Padrão Externo. Isso pode ser justificado pela não correção da variação da reposta do detector (área ou altura do pico) em análise por padronização externa.

Tabela 2. Parâmetros analíticos de linearidade da curva de calibração

Compostos	Equação da reta (n = 8 pontos)	
	Padrão interno	Padrão externo
Carvacrol	$Y = 0,0089x - 0,3876$ (R = 0,991)	$Y = 24145x - 202763$ (R = 0,721)
<i>Trans</i> - β -Cariofileno	$Y = 0,0076x + 0,0043$ (R = 0,996)	$Y = -434,95x + 466899$ (R = 0,031)

Limite de detecção e de Quantificação

Conforme as recomendações da ANVISA¹ o limite de detecção (LD) e de limite de quantificação (LQ) foram determinados pelo método visual em diluições sucessivas. Desta forma, a menor quantidade de carvacrol e *trans*- β -cariofileno, significativamente diferente da linha de base, definida como LD, foi de 0,157 μ g/mL e 0,069 μ g/mL, respectivamente. Por outro lado, a menor quantidade possível de se observar com exatidão e precisão, definida como LQ, foram de 0,314 μ g/mL e 0,275 μ g/mL,

respectivamente. Este método se mostrou satisfatório à determinação de LD e LQ, uma vez que a literatura reporta valores superiores deste parâmetro em relação ao valor obtido neste trabalho para os compostos de interesse.¹¹

Repetibilidade Intra-corrída, Inter-corrída e nível de recuperação.

Os resultados de precisão do método foram expressos por meio do coeficiente de variação (CV, %) e estão apresentados na Tabela 3. O método se mostrou preciso dentro da faixa recomendada pela ANVISA,¹ com valores abaixo de 5%, com exceção do nível mais baixo para o *trans*- β -cariofileno que apresentou um valor de 6,7 % e 6,8 %, para precisão intra-corrida e inter-corrida, respectivamente.

Para o carvacrol o intervalo de recuperação variou de 99,45 a 115,02 %. Para o *trans*- β -cariofileno o intervalo de recuperação variou de 70,57 a 96,35 %. No nível alto o *trans*- β -cariofileno não apresentou boa recuperação, ficando abaixo do recomendado pela ANVISA, conforme observado na Tabela 3, o que mostra que para concentrações altas de *trans*- β -cariofileno não ocorre uma boa recuperação.

Tabela 3. Valores de precisão e recuperação do método de análise

	Intervalo de estudo	Repetibilidade (Intra-corrida RSD %)	Repetibilidade (Inter-corrida RSD %)	Recuperação (%)
Carvacrol	Baixo	2,89	2,80	99,45
	Médio	1,85	1,71	104,21
	Alto	2,36	0,42	115,02
<i>Trans</i> - β -Cariofileno	Baixo	6,72	6,80	96,35
	Médio	3,25	3,55	91,96
	Alto	2,05	1,49	70,57

Análise Quantitativa

Em análise quantitativa é muito comum os resultados serem fornecidos pelo método da normalização ou por calibração externa e interna. A comparação dos resultados quantitativos, obtidos com os diferentes métodos quantitativos é mostrada na Tabela 4. Os resultados indicam distorções muito sérias no perfil quantitativo dos compostos em relação aos métodos da normalização e padrão interno.

Comparando o resultado do método da normalização, por exemplo, observa-se que o teor percentual de carvacrol e *trans*- β -cariofileno são divergentes quando comparado com os valores obtidos pelo método do padrão interno. O erro maior está em relação ao método da normalização, onde ao se adotar que todos os compostos apresentam respostas similares em relação

ao detector, onde os valores das quantidades dos compostos são diferentes quando comparados com os obtidos pelo método do padrão interno. Estes dados (Tabela 4) sugerem que em análise quantitativa por CG-EM é relevante a escolha do método de quantificação.

Os dados da curva de calibração, apresentados na Tabela 2, foram utilizados para a quantificação dos compostos de interesse, levando em consideração à quantidade de óleo obtido, o fator de diluição e a densidade do material. A concentração (m/m) de Carvacrol e *trans*- β -cariofileno no óleo essencial proveniente da *Lippia sidoides* foi respectivamente de 32,01 % e 1,78 %, sendo esta porcentagem de carvacrol próxima da concentração encontrada por Camelo *et al.* 2014,¹⁹ que utilizou o método da normalização na quantificação destes compostos.

Para a *R. officinales* a quantidade encontrada foi de 0,28 % e 0,34 % de carvacrol e de *trans*- β -cariofileno, respectivamente. De acordo com Camelo *et al.* a quantidade de *trans*- β -cariofileno foi de 0,48%, não sendo determinada a concentração de carvacrol. Para a *Copaíba sp* o carvacrol não foi identificado, enquanto o *trans*- β -cariofileno apresentou um teor de 74,5 %. A literatura reporta a quantificação

de *trans*- β -cariofileno em amostras de óleos da copaíba, na qual foram determinadas concentrações que variaram de 15,74 a 6,37 mM.¹¹ Na amostra de *Copaíba sp.* a concentração é de 3,83 mM de *trans*- β -cariofileno. A comparação realizada, no entanto, pode não ser precisa devido a falta de informações da espécie utilizada para obtenção do óleo de copaíba disponibilizada no comércio.

Tabela 4. Concentrações obtidas de carvacrol e *trans*- β -cariofileno nas matrizes estudadas pelos métodos do padrão interno, externo e normalização

Amostra (Óleo Essencial)	Carvacrol		<i>trans</i> - β -cariofileno	
	Padrão interno ppm (μ g/mL)	Normalização	Padrão interno ppm (μ g/mL)	Normalização
<i>Lippia sidoides</i>	289,02 \pm 5,89 (32,01 % p/p) ¹	36,38 %	15,5 \pm 0,67 (1,78 % p/p) ¹	5,03 %
<i>R. officinales</i>	50,01 \pm 0,81 (0,28 % p/p) ¹	< 0,1 %	59,06 \pm 0,59 (0,34 % p/p) ¹	0,48 %
<i>Copaíba sp</i>	-----	-----	782,5 \pm 6,78 (74,5 % p/p) ¹	62,32 %

1 – Em relação à quantidade de óleo essencial obtido no processo de extração.

amostras derivadas de produtos naturais.

4. Conclusão

O método CG-EM para análise de carvacrol e *trans*- β -cariofileno é simples e confiável para a quantificação destes compostos em diferentes amostras de óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Rosmarinus officinalis* e *Copaiba sp.*, sendo os parâmetros de validação, determinados neste trabalho, como limite de detecção, limite de quantificação, precisão e recuperação apresentaram valores significativos, proporcionando um método de quantificação relativamente confiável e eficiente do carvacrol e do *trans*- β -cariofileno em

Agradecimentos

Os autores são gratos as seguintes agências brasileiras de fomento a pesquisa, pelo suporte financeiro prestado: CAPES, CNPq e FUNCAP. A Universidade Federal do Ceará pela infraestrutura disponibilizada.

Referências Bibliográficas

- ¹ ANVISA. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. [\[Link\]](#)
- ² Fontanarosa, P. B.; Rennie, D.; De Angelis, C. D.; The need for regulation of dietary supplements-lessons from ephedra. *Jama* **2003**, *289*, 1568. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ³ Wolsko, P. M.; Solondz, D. K.; Phillips, R.S.; Schachter, S. C.; Eisenberg, D. M. Lack of herbal supplement characterization in published randomized controlled trials. *The American Journal of Medicine* **2005**, *118*, 1087. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴ Santos, R. C. V.; Alves, C. F. S.; Schneider, T.; Lopes, L. Q. S.; Aurich, C.; Giongo, J. L.; Brandelli, A.; Vaucher, R. A. Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus* species. *Journal of Invertebrate Pathology* **2012**, *109*, 265. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁵ Medeiros, M. G. F.; Silva, A. C.; Cito, A. M. G. L.; Borges, A. R.; Lima, G. L.; Lopes, J. A. D. Figueiredo, R. C. B. Q. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitology International* **2011**, *60*, 237. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁶ Yosr, Z.; Hnia, C.; Rim, T.; Mohamed, B.; Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial Crops and Products* **2013**, *43*, 412. [\[CrossRef\]](#)
- ⁷ Jordán, M. J.; Lax, V.; Rota, M. C.; Lorán, S.; Sotomayor, J. A. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Control* **2013**, *30*, 463. [\[CrossRef\]](#)
- ⁸ Veiga Junior, V. F.; Rosas, E. C.; Carvalho, M. V.; Henriques, M. G. M. O.; Pinto, Angelo C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, *112*, 248. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁹ Kamimura, J. A.; Santos, E. H.; Hill, L. E.; Gomes, C. L. Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *LWT - Food Science and Technology* **2014**, *57*, 701. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁰ Kubo, I.; Chaudhuri, S. K.; Kubo, Y.; Sanchez, Y.; Ogura, T.; Saito, T.; Ishikawa, H.; Haraguchi, H. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica* **1996**, *62*, 427. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹¹ Sousa, J. P. B.; Brancalion, A. P. S.; Souza, A. B.; Turatti, I. C. C.; Ambrosio, S. R.; Furtado, N. A. J. C.; Lopes, N. P.; Bastos, J. K. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, *54*, 653. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹² Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* **2004**, *27*, 771. [\[CrossRef\]](#)
- ¹³ Castellar, A.; Gagliardi, R. F.; Mansur, E.; Bizzo, H. R.; Souza, A. M.; Leitao, S. G. Volatile constituents from in vitro and ex vitro plants of *Petiveria alliacea* L. *Journal of Essential Oil Research* **2014**, *26*, 19. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁴ Hammami, S.; El, M. R.; Faidi, K.; Falconieri, D.; Piras, A.; Procedda, S.; Mighri, Z.; El, A. M. H. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from aerial parts of *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* growing spontaneously in Tunisia. *Natural Product Research* **2015**, *29*, 2336. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁵ Ulukanli, Z.; Karaboerklue, S.; Ozturk, B.; Cenet, M.; Balcilar, M. Chemical Composition, Antibacterial and Insecticidal Activities of the Essential Oil from the *Pistacia terebinthus* L. Spp. Palaestina (Boiss.) (Anacardiaceae). *Journal of Food Processing and Preservation* **2014**, *38*, 815. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁶ McNair, H. M.; Mili, J. M.; *Basic Gas Chromatography*. Wiley: New York, 1997.
- ¹⁷ Fowles, I. A. *Gas Chromatography*, 2a. ed., John Wiley & Sons: New York, 1995.

- ¹⁸ Collins, C. H., Braga, G. L., Bonato, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. UNICAMP: Campinas, 2006.
- ¹⁹ Camelo, A. L. M.; Oliveira, F. C.; Silva, F. F. M; Souza, F. T. C.; Longhinotti, E. Análise comparativa da composição Química volátil de amostras do alecrim in natura com a disponível comercialmente. *Holos* **2014**, 5, 191. [[CrossRef](#)]