



Instituto Federal de Brasília
Campus Gama
Licenciatura em Química

ELISA MISSAE YAMASHITA UMEZU

Identificação de marcadores analíticos para CLAE-DAD de *Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum cassia* em extratos metanólicos

Brasília

2025

ELISA MISSAE YAMASHITA UMEZU

Identificação de marcadores analíticos para CLAE-DAD de *Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum cassia* em extratos metanólicos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Licenciatura em Química do Instituto Federal de Brasília, Campus Gama como parte da exigência para obtenção do título de licenciado.

Orientadora: Dra. Nizamara Simenremis Pereira

Brasília

2025

Umezu, Elisa Missae Yamashita .

Identificação de marcadores analíticos para CLAE-DAD de *Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum cassia* em extratos metanólicos / Elisa Missae Yamashita Umezu ; orientação Nizamara Simenremis Pereira. — Brasília: 2025.

62 f. : il. color. ; 30 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) — Campus Gama, Instituto Federal de Brasília, Brasília, 2025.

Orientador(a): Nizamara Simenremis Pereira.

1. HPLC. 2. Canela. 3. Eugenol. 4. Cumarina. 5. Validação. I. Pereira, Nizamara Simenremis , orient. II. Instituto Federal de Brasília. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SISTEMA DE BIBLIOTECAS DO INSTITUTO FEDERAL DE BRASÍLIA

Dedico este trabalho ao meu companheiro, Elcio,
e aos meus filhos, Ivan e Hanna, que
transformaram meu incentivo em retorno,
caminhando ao meu lado com amor, paciência e
força. Este trabalho carrega um pouco de cada um
de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus e à energia do universo, pela força silenciosa que me guiou, pela proteção nos momentos de incerteza e por colocar no meu caminho as pessoas e oportunidades que tornaram esta jornada possível.

Agradeço à minha família, minha base em todos os momentos. Ao meu esposo, pelo amor, paciência e por sempre estar ao meu lado inclusive salvando meus dias com sua ajuda nos computadores. Seu apoio fez toda a diferença. Aos meus filhos, que me inspiram com suas próprias conquistas e sempre acreditaram em mim. O incentivo de vocês me deu força para seguir.

Agradeço, com profundo carinho e respeito, à minha orientadora Nizamara, cuja força, justiça e dedicação marcaram toda a minha trajetória. Sua maneira firme, atenciosa e generosa de orientar transformou meu olhar e ampliou meu conhecimento de um jeito que eu jamais imaginaria no início do curso. Levo comigo muito do que aprendi ao seu lado, e tenho plena certeza de que, sem a sua orientação, eu não teria alcançado tudo o que sei e sou hoje como estudante.

Estendo meus agradecimentos a todos do IFB, que se tornou uma verdadeira segunda casa. Entre salas, corredores, encontros, atividades, encontrei acolhimento, apoio e um ambiente que me fez crescer academicamente e pessoalmente.

Meu reconhecimento vai a todos da área de Química, que contribuíram para minha formação com dedicação e compromisso. Em especial, agradeço a Adriana, Rodrigo, Marley e Aline cujas paciência e conhecimento deixaram marcas importantes nessa caminhada.

Sou igualmente grata aos professores da área da Educação, entre eles Éder e Cláudio. Registro um agradecimento especial ao professor Cláudio, que me inseriu na pesquisa e me mostrou, com sua forma prática, organizada e inteligente de ensinar, que investigar e aprender pode ser algo leve, claro e profundamente transformador.

Por fim, deixo minha gratidão a todos os colegas que fizeram parte dessa jornada, desde aqueles que concluíram o curso antes de mim até os que seguem firmes no caminho. Cada conversa, cada apoio, cada momento compartilhado, nas dificuldades e nas conquistas, tornou essa trajetória mais leve, mais rica e mais humana. Mesmo sem citar nomes, levo cada um de vocês comigo, porque todos deixaram sua marca na minha caminhada.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar métodos analíticos capazes de diferenciar canela verdadeira (*Cinnamomum verum*) de canela falsa (*Cinnamomum cassia*) por meio da quantificação dos marcadores eugenol e cumarina. Os métodos foram validados segundo critérios estabelecidos por normas oficiais, demonstrando adequada linearidade, precisão, exatidão, seletividade e robustez. O método para determinação de eugenol mostrou-se eficaz na caracterização da *C. verum*, enquanto o método para quantificação de cumarina apresentou elevada sensibilidade para identificação de *C. cassia* além de detectar adulterações na canela verdadeira. A aplicação desses métodos em amostras comerciais revelou discrepâncias na autenticidade dos produtos. Uma amostra rotulada como canela-do-Ceilão apresentou altos níveis de cumarina, indicando adulteração, o que foi confirmado pela análise de uma amostra autêntica proveniente do Sri Lanka, na qual não houve detecção de cumarina. Os resultados comprovam a eficiência dos métodos validados para o controle de qualidade e detecção de fraudes, destacando sua utilidade no monitoramento de especiarias e na garantia da segurança do consumidor. O trabalho mostra a relevância da utilização conjunta de eugenol e cumarina como marcadores químicos para autenticação de canela, contribuindo para a área de análise de alimentos e controle de autenticidade.

Palavras-chave: HPLC; canela; eugenol; cumarina; validação .

ABSTRACT

This undergraduate thesis aimed to develop and validate analytical methods capable of distinguishing true cinnamon (*Cinnamomum verum*) from false cinnamon (*Cinnamomum cassia*) through the quantification of the chemical markers eugenol and coumarin. The methods were validated according to official guidelines and demonstrated appropriate linearity, precision, accuracy, selectivity, and robustness. The method for determining eugenol proved effective in characterizing *C. verum*, while the method for quantifying coumarin showed high sensitivity for identifying *C. cassia*, in addition to detecting adulterations in true cinnamon. Application of these methods to commercial samples revealed inconsistencies in product authenticity. One sample labeled as Ceylon cinnamon presented high levels of coumarin, indicating adulteration, which was confirmed by the analysis of an authentic sample from Sri Lanka showing no detectable coumarin. The results demonstrate the efficiency of the validated methods for quality control and fraud detection, highlighting their usefulness in monitoring spices and ensuring consumer safety. This work reinforces the relevance of using eugenol and coumarin as complementary chemical markers for cinnamon authentication, contributing to the fields of food analysis and authenticity assessment.

Keywords: HPLC; cinnamon; eugenol; coumarin; validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da casca: (a) canela verdadeira, (b) canela falsa	16
Figura 2 – Estrutura química do eugenol.....	17
Figura 3 - Estrutura química da cumarina	17
Figura 4 - Cromatograma da solução padrão de eugenol 1000 ppm, fluxo 1,20 mL/min, fase móvel 0,42:0,78 v/v, λ 280 nm.	30
Figura 5 - Cromatograma da solução de canela verdadeira.....	30
Figura 6 - Cromatograma da solução de canela falsa.....	30
Figura 7 - Curva de calibração do eugenol.....	31
Figura 8 - Gráfico de resíduos vs concentração de eugenol	33
Figura 9 - <i>Box plot</i> para <i>outliers</i> do eugenol	33
Figura 10 - Gráfico de percentil vs residual regular	33
Figura 11 - Degradação térmica do eugenol 400 ppm em 0 hora	36
Figura 12 - Degradação térmica do eugenol 400 ppm após 2 min a 56°C.	36
Figura 13 - Cromatograma de eugenol sem adição de HCl.....	37
Figura 14 - Degradação ácida do eugenol em 1 hora.	37
Figura 15 - Degradação ácida do eugenol em 24 horas.....	37
Figura 16 - Degradação fotolítica do eugenol em 1 hora	38
Figura 17 - Degradação fotolítica do eugenol em 24 horas.....	38
Figura 18 - Curva de calibração do eugenol.....	39
Figura 19 - Cromatografia do padrão de cumarina 100 ppm (0,40:0,60 v/v), 1,00 mL/min....	40
Figura 20 - Cromatografia da solução de canela falsa, (0,40:0,60 v/v), 1,00 mL/min.....	40
Figura 21 - Cromatograma da amostra de canela do Ceilão.....	41
Figura 22 - cromatografia da amostra de canela do Sri Lanka.....	41
Figura 23 - Curva de calibração cumarina 100 ppm	41
Figura 24 - Gráfico de resíduos vs concentração de cumarina.....	43
Figura 25 - <i>Box plot</i> para <i>outliers</i> da cumarina	43
Figura 26 - Degradação térmica da cumarina em 0 hora.....	46
Figura 27 - Degradação térmica da cumarina após 3 min a 72°C.	46
Figura 28 - Cromatograma da cumarina sem adição de HCl.	47
Figura 29 - Degradação ácida da solução de cumarina em 1 hora.	47
Figura 30 - Degradação ácida da solução de cumarina em 24 horas.....	47
Figura 31 - Degradação fotolítica da cumarina em 1 hora	48

Figura 32 - Degradação fotolítica da cumarina em 24 horas.....	48
Figura 33 - Eugenol padrão 1000 ppm	50
Figura 34 - Amostra V1 (Sri Lanka), método eugenol.....	50
Figura 35 - Amostra V2 (Índia), método eugenol	50
Figura 36 - Amostra V3 (Índia), método eugenol	50
Figura 37 - Eugenol padrão 1000 ppm	51
Figura 38 - Amostra F1(Brasil), método eugenol	51
Figura 39 - Amostra F2 (Brasil), método eugenol	51
Figura 40 - Amostra F3 (Ásia), método eugenol.....	51
Figura 41 - Padrão de cumarina 100 ppm.....	52
Figura 42 - Amostra F1 (Brasil), método cumarina	52
Figura 43 - Amostra F2 (Brasil), método cumarina	52
Figura 44 - Amostra F3 (Ásia), método cumarina	52
Figura 45 - Padrão de cumarina 100 ppm.....	52
Figura 46 - Amostra V1 (Sri Lanka), método cumarina.....	52
Figura 47 - Amostra V2 (Índia), método cumarina	53
Figura 48 - Amostra V3 (Índia), método cumarina	53
Quadro 1 - Diferenças entre os métodos para eugenol e cumarina.	26
Quadro 2 - Amostras de canelas e região de origem	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de regressão linear para curva de calibração (n=9).....	31
Tabela 2 - ANOVA para o eugenol	30
Tabela 3 - Valores de Ccal e Ctab para eugenol.....	32
Tabela 4 - Teste F: duas amostras para variâncias	32
Tabela 5 - Precisão - repetibilidade para eugenol.....	34
Tabela 6 - Exatidão para eugenol	35
Tabela 7 - Resultados de robustez. Solução padrão eugenol 450 ppm.....	35
Tabela 8 - Resultados do estresse de degradação térmica (56°C) de estudo para eugenol 400 ppm.....	37
Tabela 9 - Resultados do estresse de degradação ácida (HCl 1M) para eugenol 400ppm....	38
Tabela 10 - Resultados do estresse de degradação fotolítica UV (254 nm) para eugenol 400 ppm.....	38
Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para a cumarina.....	42
Tabela 12 - Valores de Ccal e Ctab para cumarina	42
Tabela 13 - Teste F: duas amostras para variâncias	42
Tabela 14 - Teste de Grubbs para cumarina	43
Tabela 15 - Dados da precisão e repetibilidade para cumarina	44
Tabela 16 - Exatidão para cumarina	45
Tabela 17 - Resultados de robustez para solução padrão de cumarina 60 ppm	45
Tabela 18 - Resultados do estresse de degradação térmica (72°C) de estudo para cumarina 60 ppm.....	47
Tabela 19 - Resultados do estresse de degradação ácida (HCl 1M) para cumarina 60 ppm....	48
Tabela 20 - Resultados do estresse de degradação fotolítica UV (254 nm) para cumarina 60 ppm.....	48
Tabela 21 - Concentrações de cada amostra calculados através dos métodos desenvolvidos.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C.	<i>Cinnamomum</i>
ACN	Acetonitrila
CCD	Cromatografia de camada delgada
CG-MS	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coefficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos
DP(pr)	Desvio padrão predito
H	Razão de Horwitz
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
mAU	Mili unidade de absorbância
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
PTFE	Politetrafluoretileno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1	Canela aspectos gerais.....	16
3.1.1	Principais compostos indicadores químicos das variedades de canela	17
3.2	Fundamentos básicos da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	18
3.3	Validação do método analítico	19
3.3.1	Curva de calibração, linearidade e faixa de trabalho.....	20
3.3.2	Precisão.....	20
3.3.3	Exatidão	22
3.3.4	Robustez	22
3.3.5	Seletividade	22
3.3.6	Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)	23
4	METODOLOGIA.....	24
4.1	Materiais e Reagentes.....	24
4.2	Equipamentos	25
4.3	Preparo das amostras	25
4.4	Preparo das soluções padrão de eugenol e cumarina.....	25
4.5	Desenvolvimento dos Métodos Analíticos.....	26
4.6	Validação do método analítico	26
4.6.1	Curva de calibração, linearidade e faixa de trabalho.....	27
4.6.2	Precisão.....	27
4.6.3	Exatidão	27
4.6.4	Robustez	28
4.6.5	Seletividade	28
4.6.6	Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
5.1	Determinação e quantificação de eugenol.....	29
5.1.1	Desenvolvimento do método e otimização das condições cromatográficas.....	29
5.2	Validação do método para eugenol	31

5.2.1	Curva de calibração, linearidade e faixa de trabalho.....	31
5.2.1	Precisão.....	34
5.2.2	Exatidão.....	34
5.2.3	Robustez.....	35
5.2.4	Seletividade.....	36
5.2.5	Limite de Quantificação (LQ) e limite de Detecção (LD).....	39
5.2.6	Quantificação de eugenol na canela verdadeira e falsa.....	39
5.3	Determinação e quantificação de cumarina.....	39
5.3.1	Desenvolvimento do método e otimização das condições cromatográficas.....	39
5.4	Validação do método para cumarina.....	41
5.4.1	Curva de calibração, linearidade e faixa de trabalho.....	41
5.4.2	Precisão.....	44
5.4.3	Exatidão.....	44
5.4.4	Robustez.....	45
5.4.5	Seletividade.....	46
5.4.6	Limite de Quantificação (LQ) e limite de Detecção (LD).....	49
5.4.7	Quantificação de cumarina na canela verdadeira e falsa.....	49
6	QUANTIFICAÇÃO DAS CANELAS VERDADEIRAS E FALSAS.....	49
6.1	Método eugenol.....	50
6.2	Método cumarina.....	51
7	CONTEXTUALIZAÇÃO COM A EDUCAÇÃO.....	54
7.1	Roteiro experimental.....	55
7.1.1	Preparo das soluções padrão de cumarina.....	55
7.1.2	Preparo da amostra de canela.....	55
7.1.3	Condições cromatográficas.....	55
7.2	Resultados e discussões esperados.....	56
8	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS.....	58
	ANEXOS.....	61

1 INTRODUÇÃO

A canela foi introduzida no Brasil pelos jesuítas (1) e, desde então, é cultivada em diversas regiões do país, abrangendo desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul. Obtida a partir da casca interna de árvores do gênero *Cinnamomum* (*C.*), a canela é uma das especiarias mais antigas e amplamente utilizadas no mundo. Seu uso é comum como condimento aromático, aditivo saborizante e conservante natural, sendo também reconhecida por suas propriedades benéficas à saúde, como ação antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética e antimicrobiana (2,3).

Dentre as diversas espécies existentes, destacam-se a Canela do Ceilão (*C. verum* ou *C. zeylanicum*), frequentemente denominada “canela verdadeira”, e a Canela Cássia (*C. cassia* ou *C. aromaticum*), conhecida como “canela falsa” (2). A canela verdadeira apresenta sabor mais doce e suave, além de possuir maior teor de compostos aromáticos e fenólicos, como o eugenol (3,4). A Canela do Ceilão é considerada de qualidade superior e de maior valor comercial, devido à sua composição química e aos baixos níveis de compostos tóxicos. Em contrapartida, a Canela Cássia possui custo mais acessível, o que torna a Canela do Ceilão, especialmente na forma moída, suscetível à adulteração fraudulenta com a espécie de menor valor (2).

A identificação dessas fraudes tem estimulado o desenvolvimento de métodos analíticos precisos para a determinação de marcadores químicos característicos (5,6). Entre os fatores de segurança que motivam a autenticação da canela, destaca-se a concentração de cumarina (5), uma substância natural conhecida por seu potencial hepatotóxico (6). Dessa forma, a identificação e quantificação de compostos marcadores são essenciais para a detecção de adulterações e autenticação de espécies. Compostos fenólicos são frequentemente escolhidos para essa finalidade, em razão das diferenças de concentração observadas entre as espécies (2).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é amplamente empregada como técnica analítica padrão devido à sua alta sensibilidade e seletividade, sendo especialmente adequada para a separação e determinação de compostos presentes em extratos de canela (7,8,9,10). Para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos, é indispensável a validação do método analítico, processo que envolve diversas etapas voltadas à comprovação da precisão e da reprodutibilidade dos resultados.

Neste estudo, foram validados dois métodos analíticos distintos: um voltado à determinação de eugenol e outro à determinação de cumarina. As análises quantitativas foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD), da marca Shimadzu.

Na etapa de preparo das amostras, a extração metanólica foi empregada por se tratar de um procedimento simples, reprodutível e eficaz na extração dos compostos-alvo. O metanol, isoladamente ou em mistura com água, é um solvente polar amplamente utilizado para a extração compostos fenólicos (11).

A validação de métodos analíticos tem como objetivo assegurar a aplicabilidade e a confiabilidade da metodologia desenvolvida, considerando tanto a qualidade das medições instrumentais quanto a robustez estatística dos resultados. Os parâmetros de validação são, em geral, definidos por protocolos específicos.

Neste trabalho, adotou-se como referência a RDC nº 166/2017 (12) , que, embora não seja direcionada à análise de alimentos, foi utilizada para conferir rigor científico às etapas experimentais. Assim, os parâmetros de validação avaliados foram: linearidade, precisão, exatidão, robustez, seletividade, além dos limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) (12).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Validar marcadores químicos para CLAE-DAD de *Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum cassia* em extratos metanólicos.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e otimizar métodos capazes de quantificar eugenol e cumarina em amostras de canela verdadeira e falsa, por meio da técnica de CLAE-DAD;
- Realizar a validação analítica dos métodos propostos, comprovando sua aplicabilidade para diferenciação entre as canelas verdadeiras e falsas;
- Identificar o verdadeiro marcador químico que diferencia a canela verdadeira da falsa;
- Propor um roteiro de aula prática experimental, fundamentado nos procedimentos analíticos estudados, visando integrar os conhecimentos de Química Analítica e Química Orgânica ao ensino, por meio de atividades práticas contextualizadas com situações reais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Canela aspectos gerais

O gênero *Cinnamomum*, pertencente à família *Lauraceae*, compreende diversas espécies arbóreas e arbustivas amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia (13,3). Entre as espécies mais conhecidas e comercializadas destacam-se *Cinnamomum verum* (ou *C. zeylanicum*), popularmente denominada “canela verdadeira” ou “canela do Ceilão”, e *Cinnamomum cassia* (ou *C. aromaticum*, *C. cassia*, *C. burmanni* e *C. loureiroi*), conhecida como “canela cássia” ou “canela chinesa”(13). Embora ambas apresentem características sensoriais semelhantes, diferem quanto à composição química e ao teor de compostos aromáticos.

A canela, derivada do gênero *Cinnamomum*, é uma especiaria globalmente popular, utilizada desde a antiguidade tanto na culinária quanto na medicina. Ela é um dos principais agentes flavorizantes da indústria alimentícia e de bebidas (2). Seu consumo tem crescido devido às suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antidiabéticas e neuroprotetoras, especialmente no combate ao Alzheimer (5,6).

A canela verdadeira, apresenta cascas finas com várias camadas, enquanto a casca da canela falsa é formada por uma única camada mais grossa (Figura 1). Essas diferenças podem ser identificadas por microscopia eletrônica (14).

Figura 1 - Estrutura da casca: (a) canela verdadeira, (b) canela falsa



Fonte: <https://www.expressocanela.com.br/viagens/2016/4/cinnamon-experience>

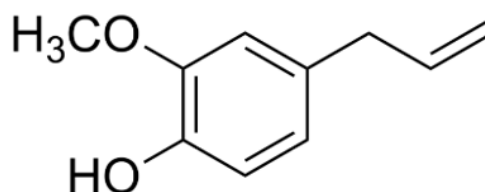
As canelas verdadeiras apresentam cascas de cor marrom clara (14) (Figura 1a), sabor doce e suave, e alto teor de compostos aromáticos, como cinamaldeído e eugenol. As canelas falsas (Figura 1b) possuem cascas mais escuras, sabor forte, picante e adstringente, e com alto teor de cumarina (3,15).

3.1.1 Principais compostos indicadores químicos das variedades de canela

Os compostos químicos mais relevantes para diferenciar a canela verdadeira das variedades de canela falsa incluem o eugenol, o cinamaldeído e a cumarina (3,14).

O eugenol (Figura 2) é o principal constituinte extraído da árvore da canela verdadeira, apresentando propriedades antioxidantes significativas devido à capacidade dos compostos fenólicos de neutralizar radicais livres (16).

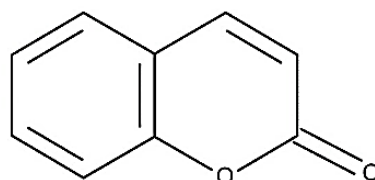
Figura 2 - Estrutura química do eugenolo



Além disso, este composto possui ação nematicida, inseticida, bactericida, antifúngica, anti-inflamatória e anestésica (16). Por ser um marcador químico característico da canela verdadeira, o eugenol pode estar ausente em amostras de canela falsa (3). O cinamaldeído é o principal composto químico responsável pelo sabor doce da especiaria. Este composto possui propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, antivirais e antimicrobianas (16). Embora o cinamaldeído esteja presente em ambas as variedades, sua concentração é geralmente maior na canela verdadeira (17).

A cumarina (Figura 3), presente em maior proporção na canela falsa em comparação com a verdadeira, é um composto aromático natural amplamente utilizado em alimentos e doces. Contudo, devido à sua toxicidade hepática observada em estudos com animais, a ingestão de cumarina tornou-se uma preocupação (16).

Figura 3 - Estrutura química da cumarina



Autoridades reguladoras estabeleceram limites máximos de consumo (de canela falsa), recomendando até 2,0 mg/kg de peso corporal para alimentos e bebidas (7,8). Em casos de exposição acima desse limite, podem ocorrer danos ao fígado e rins, incluindo inflamação hepática e icterícia em doses elevadas (7). Estudos mostram que os níveis de cumarina variam

de indetectáveis até 190 mg/kg na canela verdadeira (*C. zeylanicum*) e entre 700 a 12.200 mg/kg na canela falsa (*C. cassia*) (16)(18).

A canela verdadeira, caracterizada por sua alta qualidade e valor econômico, é frequentemente adulterada com canela falsa devido ao menor custo. Essa adulteração, especialmente na forma de pó, dificulta a identificação visual das diferenças morfológicas entre as duas variedades. Além disso, relatos indicam a adulteração da canela verdadeira com outros ingredientes, como cravo e pimenta-preta (14).

Dada a complexidade dessas fraudes, a detecção precisa dos adulterantes e a quantificação dos compostos marcadores exigem o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis. Técnicas como cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) (19), cromatografia de camada delgada (CCD), espectroscopia no infravermelho com quimiometria (20), espectroscopia UV-VIS (21) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (7,8,22,10), têm sido empregadas para análises .

3.2 Fundamentos básicos da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), também conhecida pelo termo em inglês *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC), é uma técnica instrumental de separação amplamente utilizada na química analítica. Seu principal objetivo é identificar, quantificar e separar substâncias químicas presentes em misturas complexas. Devido à sua precisão, sensibilidade e versatilidade, a CLAE tornou-se uma das ferramentas mais importantes em laboratórios de pesquisa, controle de qualidade e análises ambientais, farmacêuticas e biológicas .

A CLAE é uma técnica de cromatografia líquida que utiliza altas pressões para forçar uma fase móvel líquida (geralmente uma mistura de solventes) a passar por uma coluna cromatográfica contendo uma fase estacionária (um material sólido com propriedades químicas específicas). Essa combinação permite a separação dos componentes da amostra com base em suas interações físico-químicas com as duas fases (19). Cada substância presente na amostra tem uma afinidade diferente pela fase móvel e pela fase estacionária. Isso faz com que elas se movam pela coluna em velocidades distintas, resultando na separação dos componentes. Essa separação é então detectada e registrada, geralmente por meio de detectores como o detector de ultravioleta-visível (UV-Vis).

A CLAE é utilizada em aplicações científicas e industriais. Entre as principais finalidades da técnica, destacam-se: Identificação de substâncias desconhecidas para

caracterizar compostos em misturas complexas. Quantificação de componentes, permite determinar a concentração exata de um ou mais analitos em uma amostra. Controle de qualidade, empregada em indústrias farmacêuticas, alimentícias e químicas para verificar a pureza de produtos e detectar impurezas. Análise ambiental, utilizada na detecção de contaminantes em águas, solos e alimentos (19).

A CLAE apresenta inúmeras vantagens em relação a outras técnicas analíticas:

- Alta precisão e sensibilidade permite detectar pequenas quantidades de substâncias com elevada reprodutibilidade.
- Versatilidade adequada para compostos orgânicos, inorgânicos, polares, iônicos e macromoleculares.
- Aplicabilidade a substâncias não voláteis: ideal para compostos que não podem ser vaporizados, como proteínas e polissacarídeos.

A CLAE é um método eficaz para controle de qualidade e autenticação de compostos, pois oferece alta precisão e sensibilidade para determinar biomarcadores cruciais para a segurança e identificação da espécie (2,11).

3.3 Validação do método analítico

Para que um método analítico seja considerado confiável, é indispensável que seja submetido a um processo de validação, de modo a comprovar que o procedimento empregado é adequado à sua aplicação e capaz de fornecer resultados analíticos precisos e reprodutíveis. Esse processo envolve uma série de etapas destinadas a confirmar a capacidade do método em produzir resultados consistentes, refletindo tanto a qualidade das medições instrumentais quanto a confiabilidade estatística das análises realizadas.

A validação de métodos representa, uma etapa no desenvolvimento de procedimentos analíticos, assegurando a aplicabilidade, a precisão e o rigor científico da metodologia proposta. Para que um método seja considerado validado, é necessário que atenda a parâmetros previamente definidos em protocolos específicos de validação, os quais servem como referência para a avaliação de seu desempenho.

Neste trabalho, adotou-se como referência o protocolo estabelecido pela Resolução RDC nº 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que, embora originalmente voltado à validação de métodos aplicados a medicamentos, foi utilizado neste estudo com o intuito de conferir maior robustez e credibilidade às etapas analíticas desenvolvidas. Dessa forma, os parâmetros de validação avaliados compreenderam:

linearidade, precisão, exatidão, robustez, seletividade, limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) (12,20).

3.3.1 *Curva de calibração, linearidade e faixa de trabalho*

A linearidade de um método é demonstrada por sua capacidade de fornecer respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra (21). Dessa forma, define-se a faixa em que o sinal analítico representado pela variável dependente y_i mantém proporção linear com a concentração variável independente x_i . A equação que descreve essa relação é conhecida como curva analítica ou curva de calibração. A linearidade deve ser verificada em toda a faixa de trabalho estabelecida para o método (21,22). Para sua determinação, recomenda-se empregar pelo menos cinco concentrações distintas para as soluções preparadas, em, no mínimo, em triplicata (22).

3.3.2 *Precisão*

A precisão reflete o grau de dispersão dos valores obtidos em torno de um valor médio, sendo normalmente expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) em análises de amostras que contêm a mesma quantidade das espécies de interesse (12,23). Além disso, a precisão avalia o quão próximos estão os resultados obtidos em ensaios realizados com amostras preparadas conforme as condições descritas no método analítico em validação. Esse parâmetro deve ser apresentado por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade (22,8).

O cálculo da precisão é descrito conforme a Equação 1.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} * 100 \quad \text{Eq. 1}$$

DPR = desvio padrão relativo; DP = desvio padrão; CMD = concentração média determinada (22).

O limite aceitável para o DPR foi determinado utilizando a equação de Horwitz (22). Para a avaliação da repetibilidade do método, considerou-se uma das replicatas de cada repetição independente. De acordo com essa equação, tanto a repetibilidade quanto a precisão são expressas pelo desvio padrão relativo (DPR). A avaliação é realizada por meio da razão de Horwitz (H), inicialmente calculada sob condições de reprodutibilidade (H(R)). A razão de

Horwitz também pode ser aplicada à análise da repetibilidade, empregando o desvio padrão relativo observado (Eq. 1) e o desvio padrão predito (DP(pr)), ambos determinados sob condições de repetibilidade, representados por $sr(r)$ e $pr(r)$, respectivamente (22). Os valores do desvio padrão predito ($pr(r)$) são equivalentes a dois terços do valor de $pr(R)$ sob as condições de reprodutibilidade, o qual pode ser calculado pela equação de Horwitz (Eq. 2).

$$Pr(R) = 2x^{-0,1505}$$

Eq. 2

$$x = \text{fração em massa (mg/mg}^{-1}\text{)}$$

A Equação 2 representa as alterações em pr causadas pelas variações na massa do analito na amostra. O cálculo de $pr(r)$ (22,24) foi obtido considerando o máximo da razão de dois terços de $pr(R)$ conforme pode ser analisado pela Eq. 3

$$Pr(R) = \frac{2}{3}Pr(R)$$

Eq. 3

A análise de precisão intermediária (reprodutibilidade parcial) é analisada através da curva de calibração, onde a massa de eugenol ou cumarina de cada dia foi determinada (24,22). A precisão intermediária foi expressa em termos de desvio padrão relativo da precisão intermediária $sr(i)$ (Equação 4).

$$Sr(i) = \frac{s(i)}{\bar{x}}$$

Eq. 4

$$\text{Onde } Sr(i) = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x})^2}$$

Eq. 5

Na qual o desvio padrão intermediário relacionado ao tempo, onde: τ é o número de dias de análise, n é o número de repetições por dia, x é a fração mássica medida por repetição e \bar{x} é a média da fração mássica por repetição (22).

O teste foi realizado usando a equação de Horwitz (Eq. 2), a qual é utilizada para estimar o $H(R)$ (Eq. 6). O valor de $H(R)$ foi calculado dividindo o valor de $sr(i)$ pelo $pr(R)$. Valores de $H(R)$ menor ou igual a 2 indicam uma precisão intermediária adequada (22).

$$H(R) = \frac{Sr(i)}{pr(R)} * 100 \quad \text{Eq. 6}$$

3.3.3 Exatidão

A exatidão está relacionada à proximidade entre o valor medido (x_i) e um valor de referência considerado verdadeiro (x_v), estando associada ao erro absoluto de uma medida (12,23). Dessa forma, a exatidão é determinada pelo grau de concordância entre os resultados individuais obtidos pelo método em avaliação e um valor reconhecido como verdadeiro (22).

Para sua verificação, recomenda-se realizar, no mínimo, nove (22) determinações que representem toda a faixa linear do método analítico, isto é, três concentrações (baixa, média e alta), cada uma analisada em triplicata.

3.3.4 Robustez

A robustez é um parâmetro avaliado durante o desenvolvimento do método analítico e reflete sua capacidade de suportar pequenas e deliberadas variações (fluxo, fase móvel e comprimento de onda) nas condições experimentais sem comprometer significativamente sua exatidão e precisão. Assim, representa o nível de variação que o método pode tolerar mantendo sua confiabilidade, sendo sua estimativa dependente do tipo de metodologia analítica empregada (22,12,23).

A avaliação da robustez é realizada por meio da alteração controlada de determinados parâmetros analíticos e da comparação da precisão obtida em cada condição testada.

3.3.5 Seletividade

A seletividade de um método analítico é demonstrada por sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, garantindo que a resposta obtida corresponda unicamente a esse composto (22,12).

Esse parâmetro permite determinar o grau de interferência de outras espécies potencialmente presentes na amostra, como, excipientes, impurezas, produtos de degradação ou quaisquer compostos com propriedades físico-químicas similares (21). Além disso, a seletividade confirma que o sinal obtido no método geralmente expresso como um pico cromatográfico é proveniente exclusivamente do analito alvo (21).

A avaliação da seletividade pode ser conduzida por diferentes abordagens. Uma estratégia amplamente empregada consiste na comparação entre uma matriz isenta do analito (branco) e a mesma matriz adicionada com o padrão do composto de interesse (19). Nessa condição, nenhum interferente deve apresentar eluição no tempo de retenção do analito, que deve, idealmente, encontrar-se bem resolvido dos demais componentes da amostra.

Outra forma de demonstrar seletividade envolve o uso de detectores capazes de fornecer informações espectrais adicionais, como arranjos de diodos ou espectrômetros de massas. Nesses casos, compara-se o espectro obtido para o pico correspondente ao analito com o espectro de um padrão de referência, utilizando-se essa correspondência como evidência da pureza do sinal analítico. Adicionalmente, o método de adição padrão pode ser empregado na avaliação da seletividade, especialmente quando a matriz isenta do analito não está disponível. Nessa abordagem, constrói-se uma curva analítica a partir da adição do analito diretamente à amostra, comparando-a com uma curva construída na ausência da matriz. O paralelismo entre ambas indica ausência de interferência matricial na quantificação e, conseqüentemente, confirma a seletividade do método (12).

3.3.6 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) constituem parâmetros essenciais na validação de métodos analíticos, especialmente em procedimentos destinados à determinação de analitos presentes em baixas concentrações. O LD é definido como a menor quantidade ou concentração do analito capaz de gerar um sinal instrumental distinguível do ruído de fundo, ainda que não seja possível assegurar a exatidão ou a precisão do resultado naquele nível (19). Esse parâmetro expressa a sensibilidade mínima do método e indica a capacidade do sistema analítico em detectar a presença do analito em concentrações muito reduzidas.

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração do analito que pode ser quantificada com confiabilidade estatística, atendendo critérios previamente estabelecidos de exatidão, precisão e repetibilidade. O LQ é determinado a partir de uma razão sinal/ruído mais rigorosa do que aquela utilizada para o LD, garantindo que as medições realizadas acima desse limite apresentem variabilidade aceitável e desempenho metrológico adequado (19).

A relação entre o LD e o LQ é fundamental na validação de métodos analíticos, definindo os níveis mínimos de um analito que podem ser confiavelmente reconhecidos e medidos (8,24), respectivamente. LD e LQ evidenciam que o primeiro estabelece o ponto mínimo

em que o analito pode ser detectado, enquanto o segundo define o ponto mínimo em que o analito pode ser quantificado e foi determinado baseado na técnica razão sinal ruído usando as Equações 7 e 8.

$$LQ = \frac{10\sigma}{S} \quad \text{Eq. 7}$$

$$LD = \frac{3.3\sigma}{S} \quad \text{Eq. 8}$$

Onde σ é o desvio padrão do intercepto da curva calibração e S é a inclinação da curva analítica(19,22,24). LD e LQ são parâmetros fundamentais na validação de métodos analíticos, de acordo com a RDC (12).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram descritos os materiais, reagentes, equipamentos e procedimentos experimentais empregados no desenvolvimento e validação de dois métodos analíticos distintos para a determinação dos compostos eugenol e cumarina em amostras de canela (*Cinnamomum sp*), por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).

Cada método foi desenvolvido de maneira independente, considerando as características físico-químicas específicas de cada analito. Para isso, foram empregadas condições cromatográficas distintas, envolvendo colunas e fases móveis diferentes, a fim de otimizar a separação, detecção e quantificação dos compostos de interesse. Todas as etapas experimentais foram conduzidas de forma a assegurar a precisão, seletividade e reprodutibilidade dos resultados obtidos, garantindo o rigor científico necessário à validação dos métodos propostos.

4.1 Materiais e Reagentes

Foram utilizados padrões analíticos de eugenol e cumarina, ambos com pureza superior a 99%, adquiridos da Sigma-Aldrich (*e-commerce*). Os solventes metanol e acetonitrila eram de grau HPLC. A água ultrapura utilizada no preparo das soluções foi obtida por meio de sistema de purificação do equipamento Master WFI da marca GEHAKA.

Todos os reagentes orgânicos empregados apresentavam grau analítico e foram utilizados com filtração adicional com bomba a vácuo. Para o preparo das soluções e amostras,

foram utilizados balões volumétricos, micropipetas, béqueres, funis de vidro, filtros de seringa com membrana de 0,22 µm (PTFE), *vial* e frascos âmbar devidamente limpos e secos.

4.2 Equipamentos

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema CLAE LC20AR da marca Shimadzu® (Kyoto, Japão), com injetor manual e detector de arranjo de diodos (DAD). A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados por meio do software LabSolution® (Shimadzu). As colunas cromatográficas utilizadas foram, da marca Symetri-Waters (4,6 x 250 mm x 5 µm e 4,6 x 200 mm x 10 µm).

Foram também utilizados equipamentos auxiliares, como balança analítica, banho ultrassônico (Cristófoli), centrífuga e sistema de filtração a vácuo.

4.3 Preparo das amostras

As amostras de canela falsa em pó foram adquiridas no mercado local de Brasília no Distrito Federal, enquanto as amostras de canela verdadeiras foram adquiridas pelo *e-commerce*. As amostras de canelas foram preparadas conforme literatura (7,8). Inicialmente, 0,5 g de canela foi pesada e adicionado 20 mL de metanol 80% e levada para banho ultrassom por 30 minutos, seguida de centrifugação por 10 minutos em 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL. Novas extrações foram realizadas utilizando 5 mL de metanol 80% e os respectivos sobrenadantes foram combinados. O volume final da amostra foi previsto para 25 mL sendo ajustado com metanol. Antes da injeção no cromatógrafo, uma alíquota de 2,5 mL foi diluída para 25 mL e filtrado utilizando uma membrana de 0.22µm (PTFE). O volume foi coletado em um *vial* para análise cromatográfica

4.4 Preparo das soluções padrão de eugenol e cumarina

Para a identificação e quantificação de eugenol nas amostras de canela, foi preparada uma solução estoque do padrão de eugenol (99%) a 10.000 ppm (10 mg/mL) em metanol grau HPLC. A partir dessa solução, elaboraram-se sete soluções de calibração, com concentrações 100, 150, 200, 300, 500, 800 e 1000 ppm (8).

De forma análoga, para a determinação de cumarina, preparou-se uma solução estoque do padrão (99%) a 1000 ppm (1 mg/mL) em metanol grau HPLC, a partir da qual foram obtidas sete soluções de 10, 20 30, 50, 70 90 e 100 ppm (7).

Todas as soluções, tanto de eugenol quanto de cumarina, foram filtradas em membrana de PTFE de 0,22 μm , desgaseificadas e armazenadas até o momento da injeção no CLAE.

4.5 Desenvolvimento dos Métodos Analíticos

Foram desenvolvidos dois métodos analíticos distintos, voltados à quantificação dos compostos eugenol e cumarina por meio da técnica de CLAE-DAD. As condições experimentais foram ajustadas individualmente, de modo a garantir a resolução adequada dos picos cromatográficos e a sensibilidade necessária à detecção dos analitos. As diferenças entre os métodos estão detalhadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Diferenças entre os métodos para eugenol e cumarina.

	Método Eugenol	Método Cumarina
Fase móvel	Água/Acetonitrila (A/B)	Água/Metanol (A/B)
Proporção fase móvel	35:65 %, (0,42/0,72 v/v)	40/60 %, (0,40/0,60 v/v)
Fluxo	1,20 mL/min	1,0 mL/min
Faixa de trabalho	100 a 1000 ppm	10 a 100 ppm
Comprimento de onda	280 nm	280 nm
Coluna fase reversa C18	4,6 x 250 mm x 5 μm	4,6 x 200 mm x 10 μm
Tempo de corrida	10 min	12 min

Fonte: Dados da pesquisa.

As curvas de calibração foram obtidas a partir da relação entre a área dos picos cromatográficos e as concentrações das soluções padrão, ambas apresentando adequada linearidade ($R^2 \geq 0,99$). Os limites de detecção e quantificação foram determinados, assegurando a confiabilidade dos métodos na diferenciação entre canela verdadeira e falsa. Os procedimentos foram validados conforme os critérios estabelecidos pela Resolução RDC nº 166/2017 da Anvisa.

4.6 Validação do método analítico

4.6.1 *Curva de calibração, linearidade e faixa de trabalho*

A linearidade do método foi estudada preparando e analisando sete concentrações diferentes de soluções padrão de calibração, na faixa de 100, 150, 200, 300, 500, 800 e 1000 ppm para o eugenol e 10, 20, 30, 50, 70, 90 e 100 ppm para a cumarina. As curvas de calibração foram desenvolvidas plotando as áreas de pico do cromatograma em relação às concentrações correspondentes. Os parâmetros relevantes do gráfico, como coeficiente de correlação, soma residual dos quadrados, inclinação da linha de regressão e intercepto foram calculados. Todas as amostras padrão e de teste foram preparadas em concentrações que se situam dentro da faixa correspondente ao teor esperado dos analitos.

4.6.2 *Precisão*

A precisão intradia (mesmo dia) foi avaliada por meio de nove determinações, abrangendo três diferentes concentrações 250, 450 e 700 ppm (baixa, média e alta) para o eugenol e 25, 55 e 80 ppm para a cumarina, com três réplicas em cada nível, em conformidade com a RDC nº 166 (12). A precisão do método foi expressa em termos de repetibilidade, conforme descrito na literatura (22). Os dados de repetibilidade foram analisados utilizando a razão de Horwitz (H), inicialmente calculada sob condições de reprodutibilidade (HR), empregando a seleção do desvio padrão relativo e o desvio padrão predito (DP(pr)). O estudo de precisão deliberado foi realizado, as amostras foram comprovadas por um operador diferente, condição necessária para esse tipo de avaliação de acordo com a RDC nº 166 (12).

4.6.3 *Exatidão*

Uma análise exata determina o valor conhecido do analito que foi adicionado, também chamado de análise de amostras fortificadas.

A exatidão do método para o eugenol foi avaliada com adições realizadas a partir de 5 mL da solução padrão de 400 ppm adicionadas a 5 mL de soluções de 250, 500 e 800 ppm, resultando em 10 mL de soluções de 325, 450 e 600 ppm.

O método para a cumarina foi avaliada com adições a partir de 5 mL da solução padrão de 10 ppm adicionadas a 5 mL de soluções de 40, 100 e 150 ppm, resultando em 10 mL de soluções de 25, 55 e 80 ppm. O percentual de recuperação e o erro relativo percentual (%RE) foram calculados e utilizados como indicadores de precisão do método.

4.6.4 Robustez

A robustez de um método de cromatografia líquida deve ser avaliada para verificar o impacto de pequenas variações deliberadas nas configurações otimizadas do método. No presente estudo, a robustez do método proposto foi demonstrada utilizando solução de amostra padrão (450 ppm para eugenol) e (60 ppm para cumarina), preparada a partir de solução padrão de estoque. As condições avaliadas incluíram alterações na taxa de fluxo ($\pm 0,1$ mL/min), na proporção da composição da fase móvel ($\pm 0,02$ mL de água e acetonitrila/metanol) e nas alterações do comprimento de onda (± 1 nm).

4.6.5 Seletividade

Para estudos de degradação sob tensão preparou-se solução padrão e solução de referência a partir da solução estoque de 10.000 ppm para o eugenol e 1000 ppm para a cumarina preparadas conforme descrito no item 3.4, foi realizada a diluição apropriada para obter uma solução de concentração final de 400 ppm e 60 ppm de eugenol e cumarina respectivamente para estudos de estresse.

4.6.5.1 Degradação térmica

Uma alíquota de 10 mL de solução padrão foi filtrada e transferida para um frasco vial. Para a solução de 0h, a solução foi sonificada e injetada no sistema CLAE para análise. O frasco foi levado para uma chapa aquecedora em banho maria por aproximadamente 2 a 3 minutos entre 56°C a 72°C. Após chegar em temperatura ambiente a solução foi injetada no sistema para ser analisada novamente.

4.6.5.2 Degradação ácida

Adicionou-se 1 mL de HCl 1 mol/L em 2 frascos vial que continham 10 mL de solução padrão para hidrólise ácida. Para a amostra de 1h, após o tempo decorrido, a amostra foi injetada no sistema. Para a amostra de 24h, a mistura da solução estoque padrão dos estudos de estresse com HCl 1 mol/L foi deixada na bancada por 24h nas condições de temperatura e umidade do laboratório.

4.6.5.3 Degradação fotolítica

A solução estoque padrão foi adicionada (10 mL) em 2 frascos vial. Para a solução de 0h, a solução foi filtrada, sonificada e injetada no sistema CLAE, em seguida essa solução foi deixada por 1h em câmara fechada com lâmpada UV de 254 nm e após o tempo foi injetada no sistema. Para a solução de 24h, o frasco vial foi armazenado nas mesmas condições do frasco de 1h, após o tempo a amostra foi injetada e analisada no sistema CLAE.

4.6.6 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)

O limite de quantificação e o limite de detecção foi determinado baseado na técnica razão sinal ruído usando as Equações 7 e 8.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta etapa, são apresentados e discutidos os resultados obtidos a partir dos métodos desenvolvidos para a determinação e quantificação dos compostos identificados nas amostras de canela eugenol e cumarina. Considerando as particularidades de cada substância e os diferentes parâmetros analíticos empregados, os resultados foram organizados em duas subseções distintas. A primeira apresenta o desempenho do método proposto para o eugenol, seguida pela análise dos resultados obtidos para a cumarina.

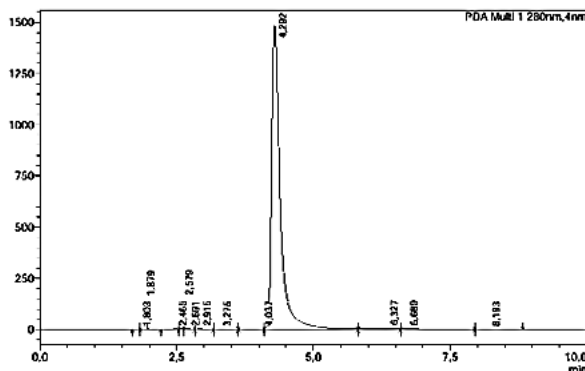
5.1 Determinação e quantificação de eugenol

O método desenvolvido para a determinação de eugenol foi validado quanto à linearidade, precisão, exatidão, robustez, seletividade e limite de detecção e quantificação. Os resultados demonstraram a adequação do método para a quantificação do composto nas amostras de canela.

5.1.1 Desenvolvimento do método e otimização das condições cromatográficas

Para melhorar a exatidão e a precisão dos dados obtidos por CLAE, foram realizados vários testes de adequação do sistema utilizando soluções padrão de eugenol 1000 ppm e soluções de amostra de canela verdadeira (Figura 4).

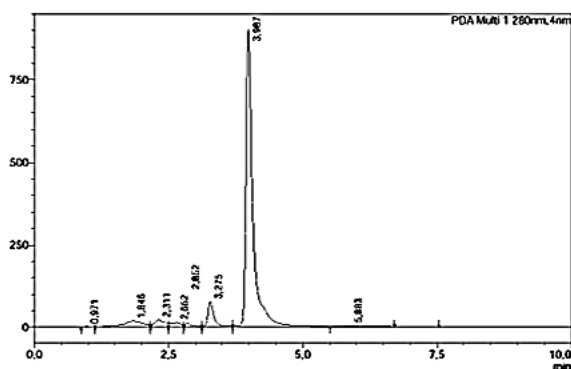
Figura 4 - Cromatograma da solução padrão de eugenol 1000 ppm, fluxo 1,20 mL/min, fase móvel 0,42:0,78 v/v, λ 280 nm.



Fonte: Dados da pesquisa.

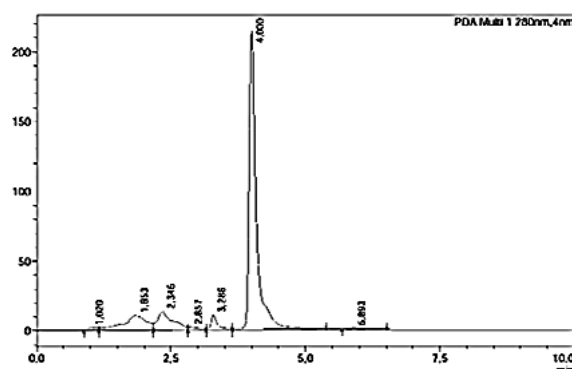
O cromatograma na Figura 4 apresenta o padrão de eugenol 1000 ppm com tempo de retenção de 4,292 min, o pico está com boa definição, alguns sinais são apresentados devido ao padrão utilizado ser 99%. O cromatograma (Figura 5) da solução de canela verdadeira apresentou tempo de retenção em 3,987 min e obteve-se uma resolução dos picos adequada para análise do eugenol (25), conforme pode ser comparado com a Figura 4.

Figura 5 - Cromatograma da solução de canela verdadeira



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 6 - Cromatograma da solução de canela falsa



A Figura 6 mostra o cromatograma da canela falsa. Comparando com a Figura 4, apresentou pico no tempo de retenção em 4,00 min sendo compatível com o padrão e foi considerado o pico de eugenol na canela falsa. O sinal cromatográfico da canela falsa é consideravelmente menor do que o sinal do pico da canela verdadeira.

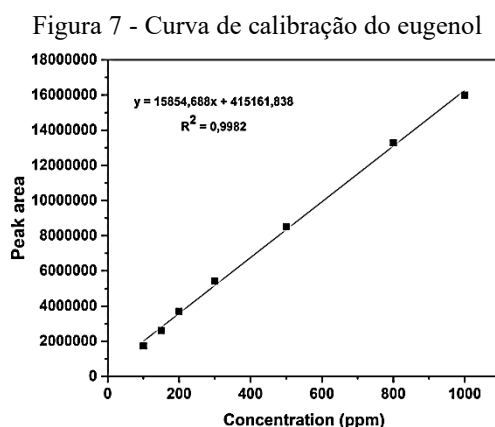
Os picos dos cromatogramas das canelas verdadeiras e falsas estão de acordo com o padrão de eugenol, considerando o tempo de retenção, podendo inferir que os picos são de eugenol nas duas soluções. A variação está na intensidade do pico, diretamente relacionada à concentração de eugenol. Amostras de canela verdadeira exibem picos mais altos, indicando maior teor de eugenol, ao passo que amostras de canela falsa apresentam picos menos intensos, correspondendo a menores concentrações do composto.

5.2 Validação do método para eugenol

5.2.1 Curva de calibração, linearidade e faixa de trabalho

Com o fluxo (1,20 mL/min) e a fase móvel definidos (água 0,42mL e ACN 0,78mL), a faixa de trabalho das concentrações foi definida, em 100, 150, 200, 300, 500, 800 e 1000 ppm, a partir da solução estoque de 10.000 ppm (10 mg/mL).

As soluções de calibração foram analisadas em triplicata, e os cromatogramas resultantes foram utilizados para construir a curva de calibração, correlacionando as áreas dos picos com as respectivas concentrações (Figura 7).



Fonte: Dados da pesquisa.

A curva de calibração para eugenol apresentou linearidade dentro da faixa de concentrações analisadas, com um coeficiente de correlação $R^2 \geq 0,99$.

Os dados coletados das concentrações (padrões) com a resposta do instrumento que geraram a regressão linear e a curva de calibração estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados de regressão linear para curva de calibração (n=9)

Parâmetros	Dados
Linearidade (ppm)	100-1000
Coefficiente de correlação (R^2)	0,9982
Inclinação	15854,688
Intercepto	415161,838

Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores da Tabela 2 confirmam para o eugenol que os dados se adequam ao modelo, pois o valor de $p < 0,05$, ou seja, o F_{ajuste} é menor que o $F_{tabelado}$. Confirmou-se assim a alternativa de que o coeficiente angular do modelo é diferente de zero, que tornou o modelo significativo.

Tabela 2 - ANOVA para o eugenol

	GI	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	5,12.10 ¹⁴	5,12.10 ¹⁴	1,73.10 ⁰³	3,94.10 ⁻²⁰
Resíduo	19	5,62.10 ¹²	2,96.10 ¹¹		
Total	20	5,18.10 ¹⁴			

Fonte: Dados da pesquisa.

A verificação da homoscedasticidade para o analito eugenol foi conduzida por meio da análise de resíduos e comparação das variâncias, utilizando os testes de Cochran (Orign) e F, considerando um nível de significância de 5%. Os valores calculados (C_{cal}) e tabelado (C_{tab}) referentes ao teste de Cochran estão apresentados na Tabela 3. Como o valor de C_{cal} foi inferior ao de C_{tab} , conclui-se que os resíduos apresentam variâncias homogêneas, ou seja, o método é homocedástico.

Tabela 3 - Valores de C_{cal} e C_{tab} para eugenol

Amostra	Ccal	Ctab	Resultado
Eugenol	0,4320	0,5612	Homocedástico

Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados obtidos no teste F para duas variâncias podem ser visualizados na Tabela 4. O valor de F calculado é menor que o valor de F tabelado ($F_{tab} = 19$), portanto, o método é homocedástico.

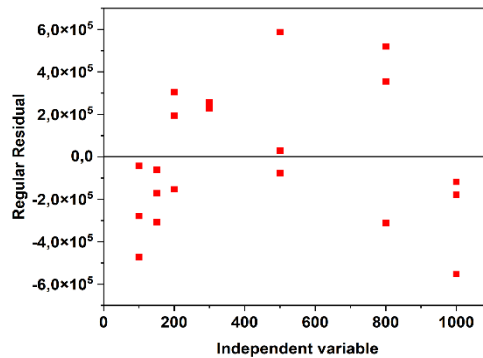
Tabela 4 -Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	5416719	13286662,67
Variância	218574588	1,94.10 ¹¹
Observações	3	3
GI	2	2
F	0,001124466	
P(F<=f) uni-caudal	0,001123203	
F crítico uni-caudal	0,052631579	

Fonte: dados da pesquisa.

A Figura 8 apresenta o gráfico de resíduos, o qual demonstra uma distribuição aleatória dos pontos em relação às concentrações analisadas, com uma leve tendência de maior dispersão em concentrações mais elevadas. Essa distribuição, aliada aos resultados obtidos nos testes de Cochran e F, confirma a homoscedasticidade do método. Dessa forma, é adequado o uso do modelo de regressão baseado no método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).

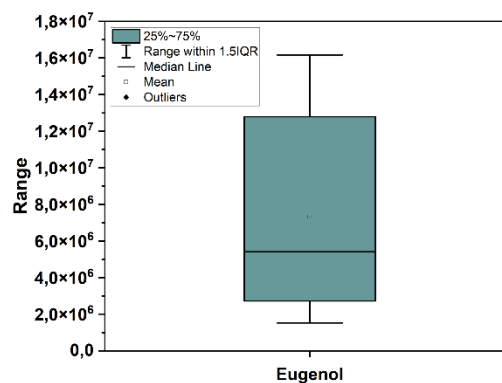
Figura 8 - Gráfico de resíduos vs concentração de eugenol



Fonte: Fonte: Dados da pesquisa.

O teste de Grubbs foi aplicado para confirmar a ausência de outliers (Figura 9). Os dados para eugenol possuem uma distribuição assimétrica positiva, pois a mediana apresenta proximidade do 1º quartil. Pelo *box plot* é possível analisar que o método não tem presença de *outliers*.

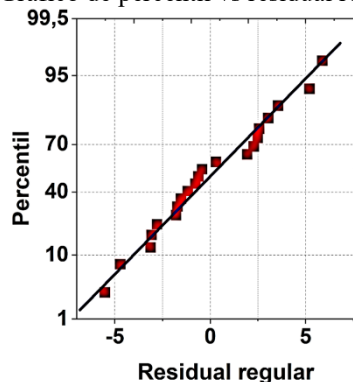
Figura 9 - Box plot para outliers do eugenol



Fonte: Dados da pesquisa.

A linearidade da curva de calibração também pode ser confirmada pelo gráfico do percentil vs resíduo regular (Figura 10). Observou-se pelo gráfico que os pontos dos resíduos estão dispersos próximos a linha do percentil, confirmando a linearidade da curva.

Figura 10 - Gráfico de percentil vs residual regular



Fonte: Dados da pesquisa.

5.2.1 Precisão

A precisão do método foi verificada por meio da avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária, com operadores diferentes. Para isso, amostras contendo eugenol foram analisadas em triplicata ao longo de dois dias consecutivos. No estudo de repetibilidade, o coeficiente de variação (CV) foi calculado com base na equação de Horwitz (H(R)), considerando inicialmente as condições de reprodutibilidade. No entanto, como os ensaios foram realizados no mesmo laboratório, adotou-se como critério de aceitação 2/3 do valor previsto por H(R). O método é considerado repetitivo quando a razão de Horwitz (H(r)), obtida pela divisão do desvio padrão relativo experimental pelo valor previsto pela equação, for igual ou inferior a 2%. Os resultados do ensaio de repetibilidade estão apresentados na Tabela 5. Todos os níveis analisados apresentaram valores de H(r) inferiores a 2%, evidenciando a adequada repetibilidade do método proposto.

Tabela 5 - Precisão - repetibilidade para eugenol.

Replicata	Soluções de eugenol - área dos picos					
	250 ppm		450 ppm		700 ppm	
	1º Dia	2º Dia	1º Dia	2º Dia	1º Dia	2º Dia
1	4428837	4251117	7948929	8094403	12549079	11386714
2	4629088	4651838	7980464	7382868	11581039	12571002
3	4652236	4333061	8467834	8073184	11992786	11058288
Média	4570054	4412005,33	8132409	7850152	12040968	11672001
DP	122843.67	211703.77	290914.18	404818.57	485815.28	795686.84
DPR	2,69%	4,80%	3,58%	5,157%	4,04%	6,817%
pr(R)	11,66	6,7	9,8	6,13	8,56	5,74
pr(r)	7,77	4,46	6,53	4,08	5,7	3,82
H(r) (%)	0,6	1,075	0,87	1,236	1,054	1,780

Fonte: Dados da pesquisa.

5.2.2 Exatidão

A exatidão foi verificada a partir de nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, com três concentrações (baixa, média e alta) e três réplicas em cada nível. Os dados coletados do trabalho de exatidão apresentaram resultados satisfatórios, pois se encontram dentro da faixa aceitável de recuperação de 98 a 102%, conforme RDC 166/2017 [23]. Os valores da recuperação (exatidão) podem ser analisados pela Tabela 6.

Tabela 6 - Exatidão para eugenol

Soluções fortificadas (ppm)	Solução fortificadora (ppm)	Média das áreas	Conc. teórica	Conc. experimental	Recuperação %
250	400	5715330	325	324,41	99,82
500	400	7850330,66	450	453,58	100,79
800	400	10948924	600	609,15	101,52

Fonte: Dados da pesquisa.

A exatidão como sendo um parâmetro crítico na validação de métodos, o trabalho representou a proximidade dos resultados obtidos ao valor verdadeiro.

5.2.3 Robustez

A avaliação da robustez foi conduzida conforme descrito na seção 4.6.4. Para isso, foram realizadas pequenas variações nos parâmetros cromatográficos, como a composição da fase móvel, a taxa de fluxo e comprimento de onda (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados de robustez. Solução padrão eugenol 450 ppm.

Parâmetros	Nível	Média da área do pico	Concentração experimental ppm	Recuperação %
Fase móvel	0,44:0,76 v/v	7928409	466,39	100,73
	0,42:0,78 v/v	7850330	453,58	100,79
	0,40:0,80 v/v	7791232	453,14	100,69
Fluxo	1,3 mL/min	7351444	448,29	99,62
	1,2 mL/min	7850330	453,58	100,79
	1,1 mL/min	8232015	455,67	101,26
Comprimento de onda	279 nm	7682796	453,73	100,83
	280 nm	7755418	455,54	101,23
	281 nm	7764179	457,47	101,66

Fonte: Dados da pesquisa.

As alterações aplicadas não resultaram em diferenças significativas nas áreas dos picos ou nos tempos de retenção do analito, mostrando que o método é robusto.

A Tabela 7 apresenta os dados coletados dessas pequenas variações. Para o estudo, foi utilizada uma solução padrão contendo 450 µg/mL de eugenol.

Conforme os dados apresentados, os valores de %RSD obtidos foram inferiores a 2%, demonstrando a robustez satisfatória do método analítico.

O estudo de robustez demonstrou que o método é confiável mesmo sob pequenas variações operacionais

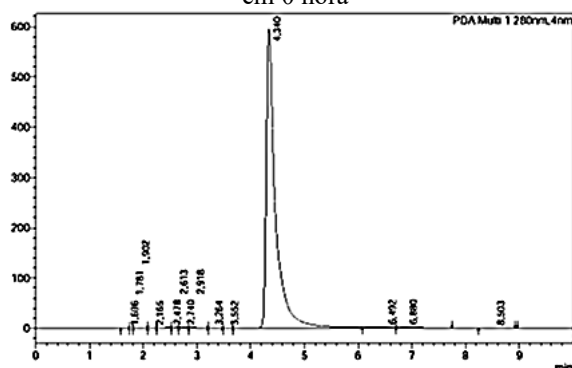
5.2.4 Seletividade

A solução de eugenol submetida a condições estressantes (degradação térmica, ácida e fotolítica) e não estressantes foram preparadas conforme descrito na seção 4.6.5. Para as amostras submetidas às degradações, foi realizada uma análise de caráter quantitativo.

Os cromatogramas referentes à degradação térmica, ácida e fotolítica do eugenol estão apresentados a seguir. As Tabelas apresentam os dados observados para cada condição de degradação aplicada às amostras.

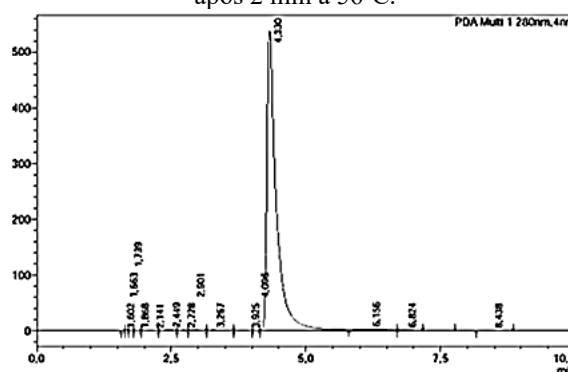
O estudo da degradação térmica do eugenol mostrou que não houve produto de degradação. As Figuras 11 e 12 apresentam picos separados e definidos e no mesmo tempo de retenção na solução de 0h e após 2 minutos em temperatura média de 56° C.

Figura 11 - Degradação térmica do eugenol 400 ppm em 0 hora



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 12 - Degradação térmica do eugenol 400 ppm após 2 min a 56°C.



A Figura 11 corresponde ao padrão eugenol 400 ppm 0 hora, a Figura 12 corresponde ao padrão após 2 minutos em temperatura acima de 50°C, observou-se que não houve mudanças no pico de eugenol, mas houve uma ligeira diminuição no sinal analítico.

Observa-se alguns sinais que podem ser produtos resultantes da elevação da temperatura.

A Tabela 8 confirma com os dados que não houve degradação térmica significativa da solução após submetida a temperatura elevada.

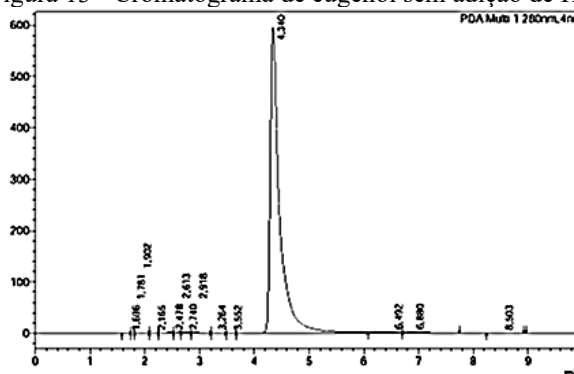
Tabela 8 - Resultados do estresse de degradação térmica (56°C) de estudo para eugenol 400 ppm.

Solução padrão	Média da área do pico	Concentração experimental	Recuperação %
0 h	7240908,66	400,26	100,06
2 min.	7034177,66	392,64	98,16

Fonte: Dados da pesquisa.

A degradação ácida mostrou alteração no cromatograma de 1h e 24hs, mas não em relação ao pico de eugenol, que se manteve sem alteração. A Figura 13 é o cromatograma do eugenol 400 ppm sem adição de HCl 1 mol.

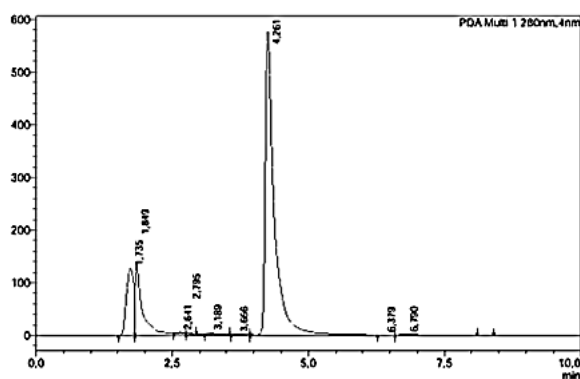
Figura 13 - Cromatograma de eugenol sem adição de HCl.



Fonte: Dados da pesquisa

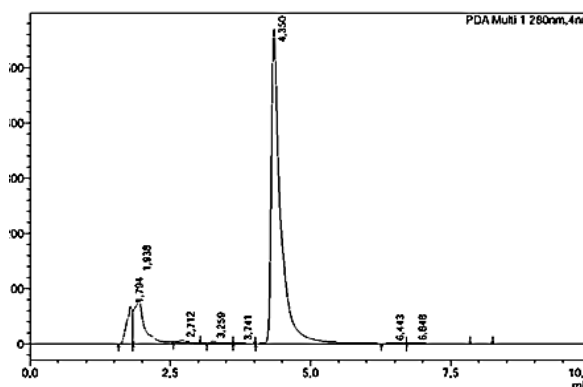
As Figuras 14 e 15, com adição de HCl, apresentaram picos adicionais que indicaram a degradação ácida da solução. Isso significa que mesmo com subprodutos do analito devido a degradação, o método foi capaz de reconhecer o pico do eugenol, mostrando que o método é seletivo.

Figura 14 - Degradação ácida do eugenol em 1 hora.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 15 - Degradação ácida do eugenol em 24 horas.



Após adição do ácido houve degradação da solução e no cromatograma fica evidenciado os picos adicionais, porém o sinal do eugenol se mantém no tempo de retenção. A Tabela 9 apresenta os dados do trabalho com degradação ácida. Observou-se uma alteração no nível de concentração do eugenol.

Tabela 9 - Resultados do estresse de degradação ácida (HCl 1 mol/L) para eugenol 400ppm

Solução padrão	Média da área do pico	Concentração experimental	Recuperação %
0 h	7240908,66	400,26	100,06
1 h	6376113,33	350,31	87,58
24h	5983973,33	329,66	82,41

Fonte: Dados da pesquisa.

A degradação fotolítica resultou em uma redução na área do pico de eugenol após a exposição à luz UV, o tempo de retenção não apresentou mudanças significativas. As Figuras 16 e 17 são os cromatogramas gerados após o trabalho de degradação fotolítica. Estes cromatogramas não apresentaram picos adicionais indicando a ausência de produto de degradação.

Figura 16 - Degradação fotolítica do eugenol em 1 hora

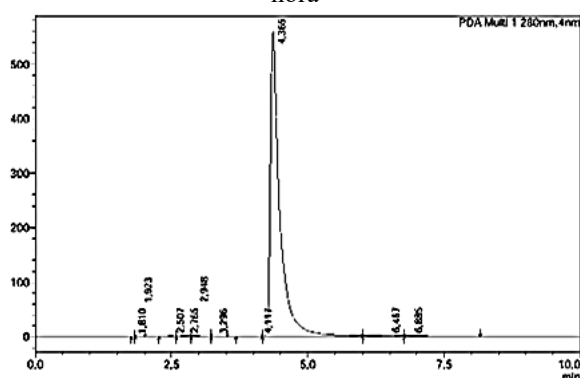
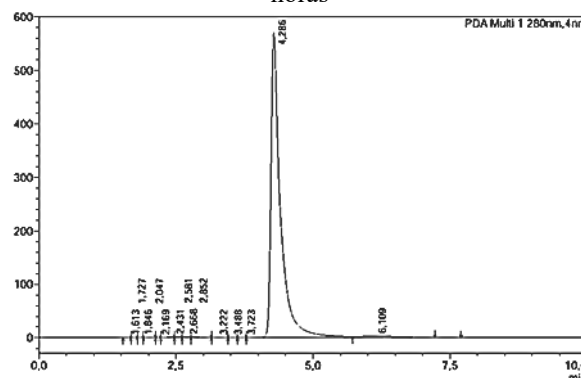


Figura 17 - Degradação fotolítica do eugenol em 24 horas



Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabela 10 apresenta os dados para a degradação fotolítica em lâmpada UV de 254nm.

Tabela 10 - Resultados do estresse de degradação fotolítica UV (254 nm) para eugenol 400 ppm.

Solução padrão	Média da área do pico	Concentração experimental	Recuperação %
0 h	7240908,66	400,26	100,06
1 h	6560679,33	386,64	96,66
24h	6386981,33	350,93	87,73

Fonte: Dados da pesquisa.

Pode-se perceber que após a exposição da amostra à radiação UV houve redução do pico de eugenol, indicando possível degradação do marcador (Tabela 10). No entanto, não se observou picos adicionais no cromatograma (Figuras 16 e 17), isso significa que as condições cromatográficas para identificação do eugenol não são adequadas para identificação dos subprodutos advindos da degradação por UV, mostrando que o método é seletivo. É possível perceber pelos dados que a alteração da área do pico do eugenol foi mais significativa após 24 horas de exposição.

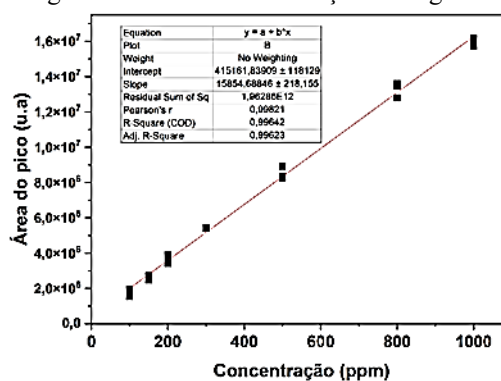
5.2.5 Limite de Quantificação (LQ) e limite de Detecção (LD)

Os resultados obtidos nas análises indicaram que o limite de detecção (LD) do eugenol foi de 22,35 ppm, enquanto o limite de quantificação (LQ) foi determinado em 74,50 ppm.

5.2.6 Quantificação de eugenol na canela verdadeira e falsa

A quantificação do composto nas amostras de canela verdadeira e falsa revelou uma concentração de 5013 ppm de eugenol na canela-do-Ceilão (*C. verum*), identificada como canela verdadeira, e de 979,5 ppm na canela falsa (*C. cassia*). Esses dados demonstraram uma concentração significativamente maior de eugenol na canela verdadeira. A concentração foi obtida através da curva de calibração e da equação da reta, observada na Figura 18.

Figura 18 - Curva de calibração do eugenol.



Fonte: Dados da pesquisa.

5.3 Determinação e quantificação de cumarina

De forma análoga, o método desenvolvido para a cumarina foi submetido aos mesmos critérios de avaliação, buscando garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. Os resultados confirmam a aplicabilidade do procedimento proposto para a determinação de cumarina nas amostras analisadas.

5.3.1 Desenvolvimento do método e otimização das condições cromatográficas

Com o objetivo de aprimorar a exatidão e a precisão dos dados obtidos por CLAE, foram realizados diversos testes de adequação do sistema, empregando soluções padrão de cumarina 100 ppm e soluções de amostra de canela falsa. As condições cromatográficas estabelecidas

como mais adequadas foram: fase móvel na proporção de 40:60 (v/v), composta por 0,40 mL de água e 0,60 mL de metanol, fluxo de 1,00 mL/min, em modo isocrático, à temperatura ambiente, com tempo total de corrida de 12 minutos, gerando cromatografias dos analitos (Figuras 19 e 20).

Figura 19 – Cromatografia do padrão de cumarina
100 ppm (0,40:0,60 v/v), 1,00 mL/min

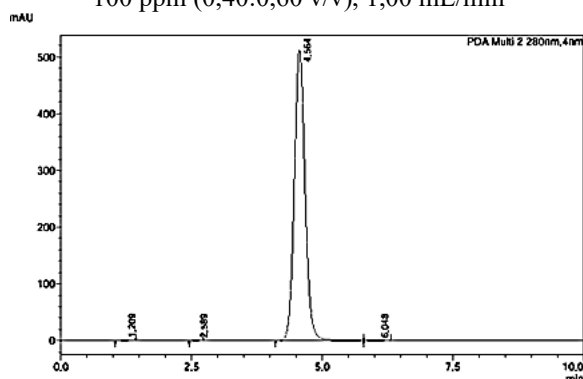
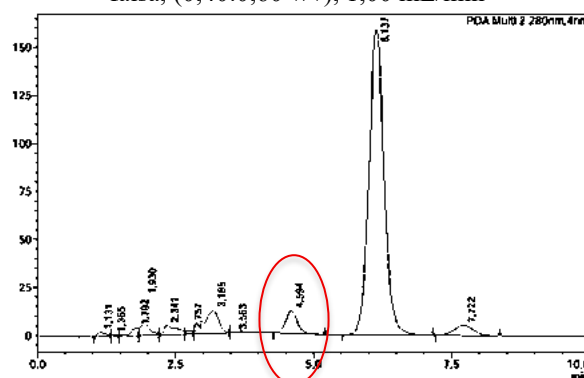


Figura 20 – Cromatografia da solução de canela
falsa, (0,40:0,60 v/v), 1,00 mL/min



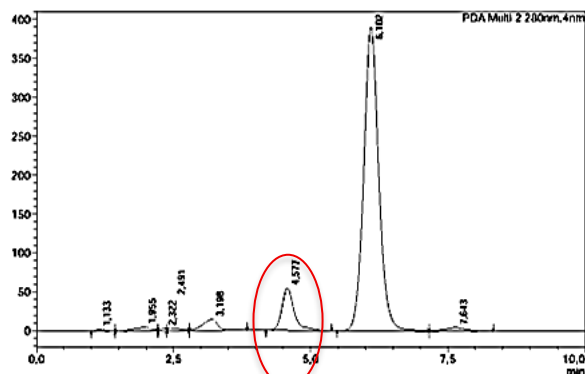
Fonte: Dados da pesquisa.

A Figura 19 exibe o cromatograma da solução padrão de cumarina 100 ppm, com pico no tempo 4,564 minutos, apresentando adequada separação. O cromatograma da solução de canela (Figura 20) apresentou um tempo de retenção de 4,594 minutos, permitindo adequada resolução dos picos para a análise da cumarina, obtido sob as mesmas condições do padrão, confirmando que o pico com tempo de retenção de 4,594 minutos corresponde ao composto de interesse. Observou-se no cromatograma um pico, no tempo em 6,116 minutos, com sinal alto e definido não podendo confundir-lo com a cumarina.

Posteriormente foi analisada amostra de canela, adquirida pelo *e-commerce* com identificação de canela verdadeira do Ceilão, para determinar e quantificar a cumarina existente na amostra. A canela do Ceilão, apresentou o sinal (acima de 50 mAU) de cumarina no tempo 4,577 minutos, superior ao sinal de cumarina na canela falsa (Figura 20), com sinal abaixo de 25 mAU.

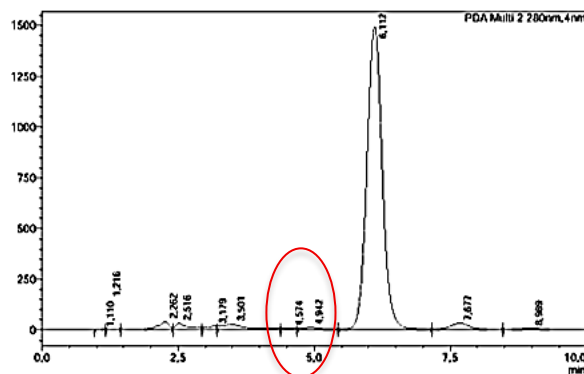
Para comparar com a acanela verdadeira (Figura 21) foi adquirida nova canela verdadeira, pelo *e-commerce*, identificada como canela do Sri Lanka, após a injeção no CLAE o cromatograma foi gerado (Figura 22) e observou-se sinal baixo (próximo à linha de base) no tempo 4,574 minutos

Figura 21 – Cromatograma da amostra de canela do Ceilão, (0,40:0,60 v/v), 1,00 mL/min



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 22 – cromatografia da amostra de canela do Sri Lanka, (0,40:0,60 v/v), 1,00 mL/min



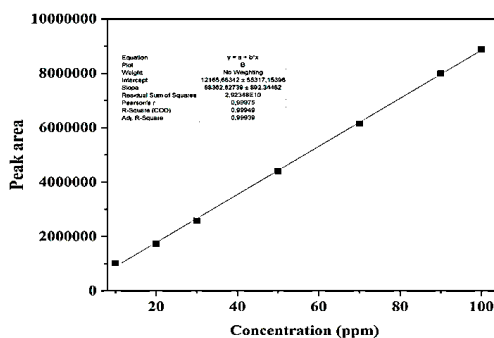
Inferiu-se que a canela do Ceilão estava adulterada e a canela do Sri Lanka é a canela verdadeira. Na canela do Ceilão havia mais quantidade de cumarina do que uma canela falsa.

5.4 Validação do método para cumarina

5.4.1 Curva de calibração, linearidade e faixa de trabalho

Com o fluxo de 1,00 mL/min e a fase móvel previamente estabelecida (0,40 mL de água e 0,60 mL de metanol), definiu-se a faixa de trabalho das concentrações em 10 20 30, 50, 70 90 e 100 ppm, a partir da solução estoque de 1000 ppm (1 mg/mL). A curva de calibração foi gerada (Figura 23).

Figura 23 – Curva de calibração cumarina 100 ppm



Fonte: Dados da pesquisa

As soluções de calibração foram analisadas em triplicata, e os cromatogramas obtidos serviram de base para a construção da curva de calibração, relacionando as áreas dos picos às respectivas concentrações. A curva apresentou linearidade dentro da faixa estudada, com coeficiente de correlação $R^2 \geq 0,99$ (Figura 23). Os valores apresentados na Tabela 11

confirmam para a cumarina que os dados se ajustam adequadamente ao modelo, uma vez que $p < 0,05$ indicando que o valor de Fajuste é inferior ao Ftabelado. Dessa forma confirmou-se o coeficiente angular do modelo é diferente de zero, que tornou o modelo significativo.

Tabela 11 – Análise de variância (ANOVA) para a cumarina

	df/gl	SS/SQ	MS/MQ	F	Significância F
Regressão	1	5,16.10 ¹⁴	5,16.10 ¹⁴	6,04.10 ³	1,0010 ⁻⁶²
Residual	61	5,21.10 ¹²	8,53.10 ¹⁰		
Total	62	5,21.10 ¹⁴			
Nível de confiança	0,95				

Fonte: Dados da pesquisa.

A homoscedasticidade do analito eugenol foi avaliada por meio da análise dos resíduos e da comparação das variâncias, empregando-se os testes de Cochran (Orign) e F, considerados ao nível de significância de 5%. Os valores do coeficiente calculado (Ccal) e do coeficiente tabelado (Ctab) para o teste de Cochran encontram-se apresentados na Tabela 12. Como Ccal se mostrou inferior a Ctab, indica que as variâncias dos resíduos são homogêneas, caracterizando o método como homocedástico.

Tabela 12 – Valores de Ccal e Ctab para cumarina

Amostra	Ccal	Ctab	Resultado
Cumarina	0,3164	0,3384	Homocedástico

Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados obtidos no teste F para duas variâncias foram inseridos na Tabela 13.

Tabela 13 – Teste F: duas amostras para variâncias

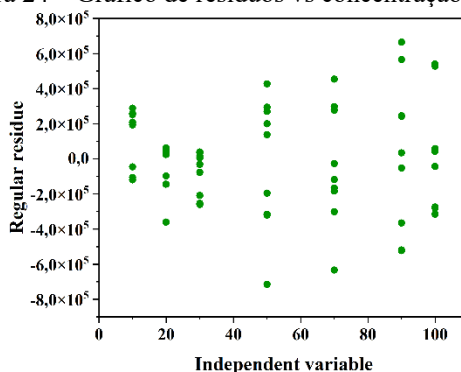
	Variável 1	Variável 2
Média	2,58.106	8,00.106
Variância	15718177714	1,94.10 ¹¹
Observações	9	9
Gl	8	8
F	0,081067082	
P(F<=f) uni-caudal	0,999080282	
F crítico uni-caudal	3,438101233	

Fonte: Dados da pesquisa.

O valor de F calculado é menor que o valor de F tabelado ($F_{tab} = 19$), portanto, o método é homocedástico.

O gráfico de resíduos, no qual se observa uma distribuição aleatória dos pontos ao longo das concentrações avaliadas, acompanhada apenas de uma leve ampliação da dispersão nas faixas de concentração mais altas é demonstrada na Figura 24.

Figura 24 – Gráfico de resíduos vs concentração de cumarina

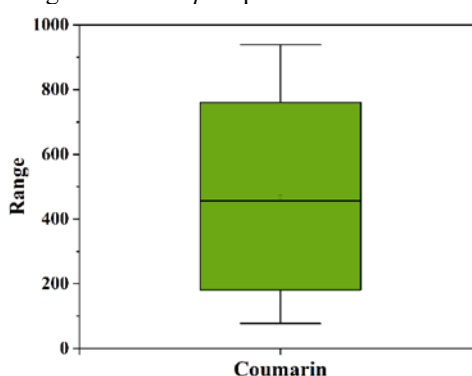


Fonte: Dados da pesquisa.

Essa configuração, em conjunto com os resultados obtidos nos testes de Cochran e F, confirma que o método apresenta homoscedasticidade. Assim, o emprego do modelo de regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) mostra-se adequado.

O teste de Grubbs foi aplicado para verificar a presença de possíveis outliers. Os dados referentes à cumarina apresentaram distribuição assimétrica positiva, evidenciada pela mediana (Figura 25).

Figura 25– Box plot para outliers da cumarina



Fonte: Dados da pesquisa.

A análise do box plot demonstra que não há valores discrepantes, indicando a ausência de outliers no conjunto de dados.

A Tabela 14 apresenta os valores do teste de Grubbs para a cumarina, com valores de $G_{crítico}$ e $G_{estatístico}$.

Tabela 14 – Teste de Grubbs para cumarina

Amostra	$G_{estatístico}$	$G_{crítico}$	Resultado
Cumarina	1,347	2,019	Sem outliers

Fonte: Dados da pesquisa.

Como o valor de $G_{estatístico}$ calculado de 1,347 é inferior a $G_{crítico}$ de 2,019 o método está dentro da variabilidade esperada ($G_{estatístico} < G_{crítico}$). Não foi identificado valores discrepantes (outliers).

5.4.2 Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da análise da repetibilidade e da precisão intermediária, conduzidas por diferentes operadores. Para isso, amostras contendo cumarina foram analisadas em triplicata durante dois dias consecutivos.

No estudo de repetibilidade, o coeficiente de variação (CV) foi calculado com base na equação de Horwitz (H(R)), considerando inicialmente as condições de reprodutibilidade. Entretanto, como os experimentos foram realizados no mesmo laboratório, adotou-se como critério de aceitação 2/3 do valor previsto por H(R).

O método é considerado repetitivo quando a razão de Horwitz (H(r)), obtida pela razão entre o desvio padrão relativo experimental e o valor previsto pela equação, é igual ou inferior a 2%. Os resultados referentes à repetibilidade são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Dados da precisão e repetibilidade para cumarina

Replicata	Soluções de cumarina - área dos picos					
	25 ppm		55 ppm		80 ppm	
	1º Dia	2º Dia	1º Dia	2º Dia	1º Dia	2º Dia
1	2525440	2508513	5512169	5396036	7590733	7736036
2	2421573	2469261	5481663	5433845	6889093	7857156
3	2322004	2492892	5476254	5417223	7240746	7817974
Média	2423006	2490222	5490129	5415701	7240191	7803722
DP	2347782	211703.77	5396427	404818.5	74624808	780372
DPR	4,19%	0,79%	0,35%	0,34%	4,84%	0,79%
pr(R)	15,916	6,7	12,56	6,13	11,22	0,791
pr(r)	10,610	10,61	8,375	8,375	7,485	7,485
H(r) (%)	0,395	0,074	0,042	0,041	0,648	0,105

Fonte: Dados da pesquisa.

Todos os níveis avaliados apresentaram valores de H(r) menores que 2%, demonstrando a adequada repetibilidade do método proposto.

5.4.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio de nove determinações que abrangeram todo o intervalo linear do método analítico, utilizando três níveis de concentração, 25, 55 e 80 ppm (baixa, média e alta), cada um analisado em triplicata. Os resultados obtidos foram satisfatórios, permanecendo dentro da faixa aceitável de recuperação, entre 99% e 100%, conforme

estabelecido pela RDC 166/2017 (12). Os valores de recuperação (exatidão) estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Exatidão para cumarina

Soluções fortificadas (ppm)	Solução fortificadora (ppm)	Média das áreas	Conc. teórica	Conc. experimental	Recuperação %
10	40	2321857	25	25,16	100,66
10	100	5050610	55	54,70	99,47
10	150	7328683	80	79,37	99,21

Fonte: Dados da pesquisa.

A exatidão, por se tratar de um parâmetro fundamental na validação de métodos analíticos, expressa o grau de concordância entre os resultados obtidos experimentalmente e o valor verdadeiro ou de referência. Avalia o quanto o método é capaz de fornecer resultados próximos ao valor real do analito, refletindo sua capacidade de medir corretamente a concentração presente na amostra. Assim, a determinação da exatidão é essencial para garantir a confiabilidade e a qualidade dos dados analíticos.

5.4.4 Robustez

Os dados da avaliação da robustez estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados de robustez para solução padrão de cumarina 60 ppm

Parâmetros	Nível	Média da área do pico	Concentração experimental ppm	Recuperação %
Fase móvel	0,38:0,62 v/v	5026628	62,72	104,53
	0,40:0,60 v/v	5147388	60,73	101,23
	0,42:0,58 v/v	5205343	59,26	98,77
Fluxo	1,1 mL/min	4474385	61,65	102,75
	1,0 mL/min	5147388	60,73	101,23
	0,90mL/min	5570515	61,02	101,71
Comprimento de onda	279 nm	5202503	60,74	101,24
	280 nm	5147388	60,73	101,23
	281 nm	5080184	60,74	101,23

Fonte: Dados da pesquisa.

Para esse estudo, pequenas variações foram introduzidas nos parâmetros cromatográficos, como a proporção da fase móvel, a taxa de fluxo e o comprimento de onda.

Tais alterações não resultaram em diferenças significativas nas áreas dos picos nem nos tempos de retenção do analito, indicando que o método apresenta robustez adequada.

A Tabela 17 reúne os dados obtidos a partir dessas variações experimentais. Para a análise, empregou-se uma solução padrão contendo 60 ppm de cumarina. De acordo com os resultados apresentados, os valores de recuperação mantiveram-se 98,7% -101,0% evidenciando a robustez satisfatória do método analítico.

O estudo de robustez demonstrou que o método é confiável mesmo sob pequenas variações operacionais.

5.4.5 Seletividade

As soluções submetidas a condições estressantes e não estressantes foram preparadas conforme descrito na Seção 4.6.5. Para as amostras expostas à degradação ácida, fotolítica e térmica, procedeu-se a uma análise de caráter quantitativo. Os cromatogramas correspondentes aos processos de degradação da cumarina são apresentados nas figuras seguintes. O estudo da degradação térmica da cumarina mostrou que não houve produto de degradação, as Figuras 26 e 27 apresentam picos separados e definidos na solução de 0h e após 3 minutos em temperatura média de 72° C.

Figura 26 - Degradação térmica da cumarina em 0 hora

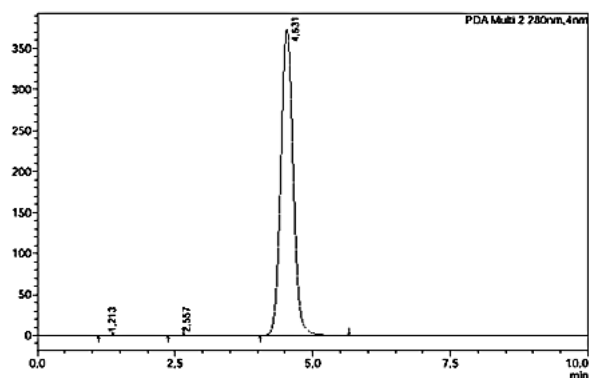
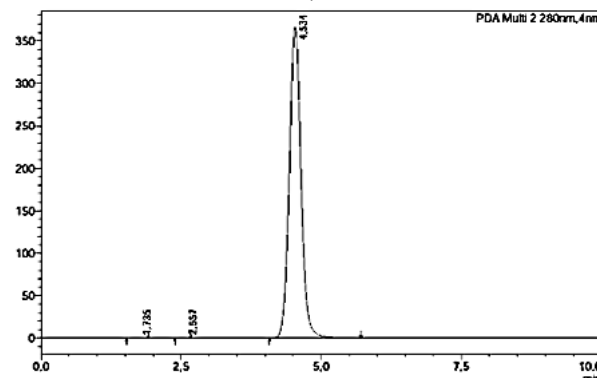


Figura 27 - Degradação térmica da cumarina após 3 min a 72°C.



Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabela 18 confirma com os dados que não houve degradação térmica significativa da solução. A média dos valores da área e da concentração não sofreram mudanças significativas.

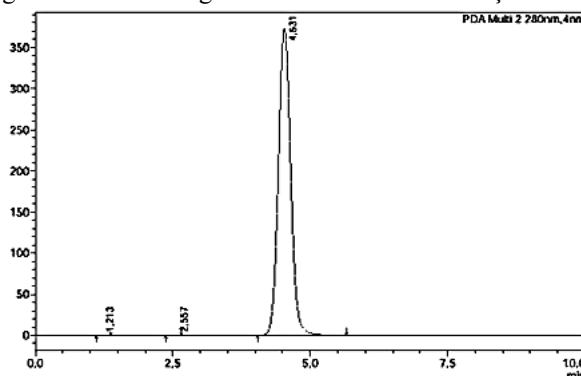
Tabela 18 - Resultados do estresse de degradação térmica (72°C) de estudo para cumarina 60 ppm

Solução padrão	Média da área do pico	Concentração experimental	Recuperação %
0 h	5342582,333	59,97	99,95
3 min.	5505712,333	61,72	102,86

Fonte: Dados da pesquisa.

A degradação ácida apresentou modificações no cromatograma após 1 h e 24 h, porém sem alterar o pico referente à cumarina, que permaneceu inalterado. A Figura 28 apresenta o cromatograma da cumarina 60 ppm sem a adição de HCl 1 mol/L.

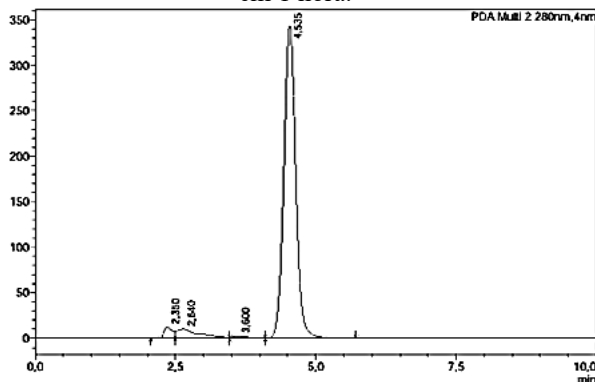
Figura 28 - Cromatograma da cumarina sem adição de HCl.



Fonte: Dados da pesquisa.

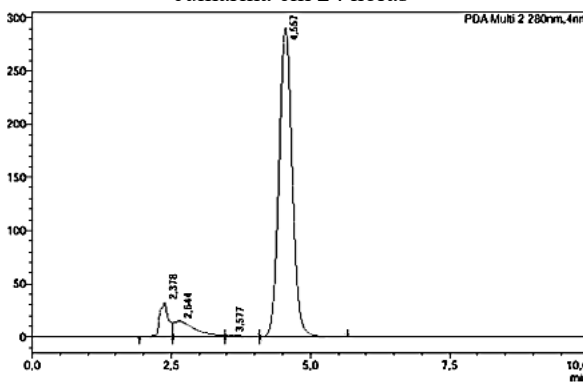
As Figuras 29 e 30, obtidas após a adição do ácido, exibiram picos adicionais que indicam a degradação ácida da solução. Esses resultados demonstram que, mesmo na presença de subprodutos formados durante o processo de degradação, o método manteve a capacidade de identificar o pico da cumarina, comprovando sua seletividade.

Figura 29 - Degradação ácida da solução de cumarina em 1 hora.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 30 - Degradação ácida da solução de cumarina em 24 horas



A Tabela 19 apresenta os dados do trabalho com degradação ácida. Observou-se uma alteração no nível de concentração da cumarina.

Tabela 19 - Resultados do estresse de degradação ácida (HCl 1M) para cumarina 60 ppm

Solução padrão	Média da área do pico	Concentração experimental	Recuperação %
0 h	5342582,333	59,97	99,95
1 h	4955685,333	55,82	93,04
24h	4495630,333	49,50	82,51

Fonte: Dados da pesquisa.

A degradação fotolítica ocasionou uma diminuição na área do pico de eugenol após a exposição à luz UV, embora o tempo de retenção não tenha apresentado alterações relevantes.

As Figuras 31 e 32 apresentam os cromatogramas obtidos após o experimento de degradação fotolítica. Esses cromatogramas não exibiram picos adicionais, indicando a ausência de produtos de degradação detectáveis, no comprimento de onda.

Figura 31 - Degradação fotolítica da cumarina em 1 hora

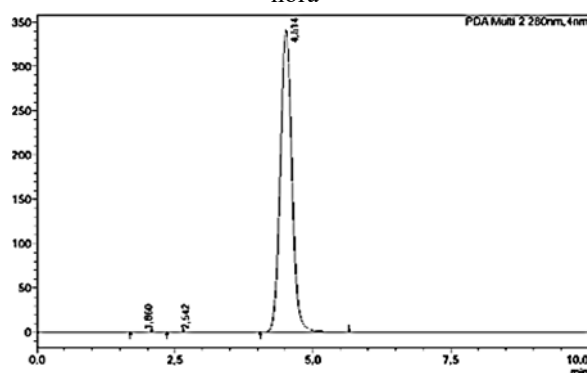
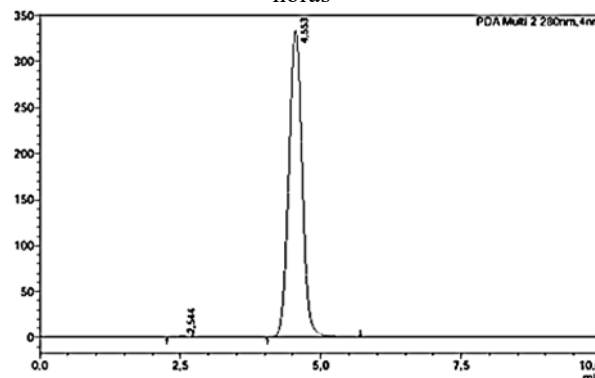


Figura 32- Degradação fotolítica da cumarina em 24 horas



Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de degradação fotolítica realizado sob radiação UV 254 nm.

Tabela 20 - Resultados do estresse de degradação fotolítica UV (254 nm) para cumarina 60 ppm

Solução padrão	Média da área do pico	Concentração experimental	Recuperação %
0 h	5342582,333	59,97	99,95
1 h	4955685,333	53,08	88,47
24h	4907067,333	54,02	90,03

Fonte: Dados da pesquisa.

Observa-se que, após a exposição da amostra à radiação, ocorreu uma redução na área do pico da cumarina, indicando possível degradação do marcador.

Contudo, não foram detectados picos adicionais nos cromatogramas (Figuras 31 e 32), o que sugere que as condições cromatográficas empregadas são adequadas para a identificação do eugenol, mas não permitem a detecção dos subprodutos formados pela degradação UV, confirmando a seletividade do método.

Nota-se ainda, conforme a Tabela 20, que a diminuição da área do pico foi mais pronunciada após a exposição à luz, não interferindo o tempo de exposição.

5.4.6 Limite de Quantificação (LQ) e limite de Detecção (LD)

O limite de quantificação e o limite de detecção foi determinado baseado na técnica razão sinal ruído usando as Equações 7 e 8.

Os resultados obtidos nas análises indicaram que o limite de detecção (LD) da cumarina foi de 2,06 ppm, enquanto o limite de quantificação (LQ) foi determinado em 6,26 ppm.

5.4.7 Quantificação de cumarina na canela verdadeira e falsa

A quantificação do composto nas amostras de canelas revelou uma concentração de 92,56 ppm de cumarina na amostra inicialmente identificada como canela do Ceilão (*C. verum*), tradicionalmente reconhecida como canela verdadeira, e de 16,3 ppm na canela Cássia (*C. cassia*), identificada de canela falsa, espécie caracterizada por apresentar teores significativamente mais elevados desse composto.

A fim de confirmar a autenticidade da primeira amostra, uma nova canela proveniente do Sri Lanka (país de origem da verdadeira *C. verum*) foi analisada. Nessa nova amostra, os níveis de cumarina não foram detectados, evidenciando o perfil típico de *C. verum*.

Esses resultados, quando comparados, indicaram que a amostra previamente analisada e atribuída à canela do Ceilão estava adulterada ou não correspondia à espécie declarada, reforçando a importância da avaliação analítica para o controle de qualidade e autenticidade de ingredientes alimentícios.

6 QUANTIFICAÇÃO DAS CANELAS VERDADEIRAS E FALSAS

Após os métodos serem desenvolvidos e validados, foram testadas 3 amostras de canelas verdadeiras e 3 amostras de canelas falsas em cada método.

Para isso as amostras foram identificadas por região de origem. (Quadro 2). Foram utilizados códigos para que as marcas não fossem divulgadas.

Quadro 2 – Amostras de canelas e região de origem

Amostra de canela	Origem (informação da embalagem)
V1	Sri Lanka
V2	Índia
V3	Índia
F1	Brasil
F2	Brasil
F3	Ásia

Fonte: Dados descritos em cada embalagem.

6.1 Método eugenol

Foram preparadas as soluções padrão de eugenol e 6 amostras de canela, conforme descrito no item 4.3 e 4.4. As condições cromatográficas estão no Quadro 1, item 4.5.

Foi inserido o cromatograma da solução padrão (Figura 33) a fim de comparação. As Figuras 34, 35 e 36 são os cromatogramas das canelas verdadeiras fornecidas pelo CLAE.

Figura 33 – Eugenol padrão 1000 ppm

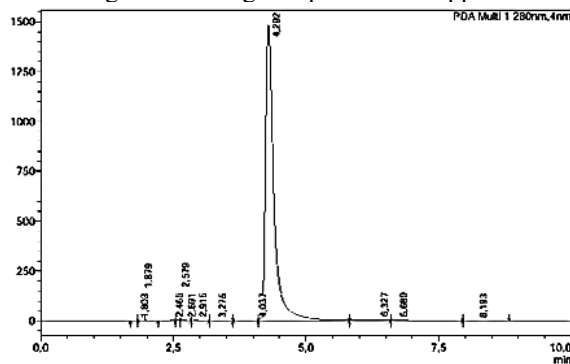


Figura 34 – Amostra V1 (Sri Lanka), método eugenol

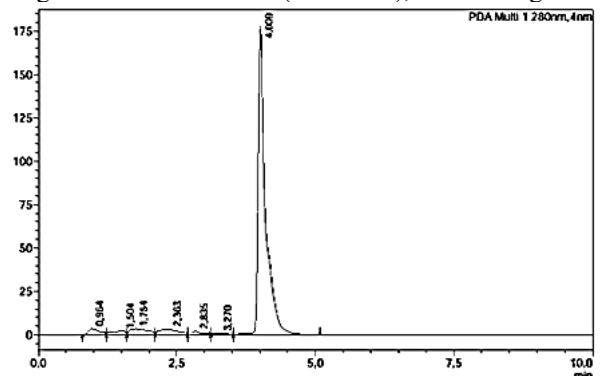


Figura 35 – Amostra V2 (Índia), método eugenol

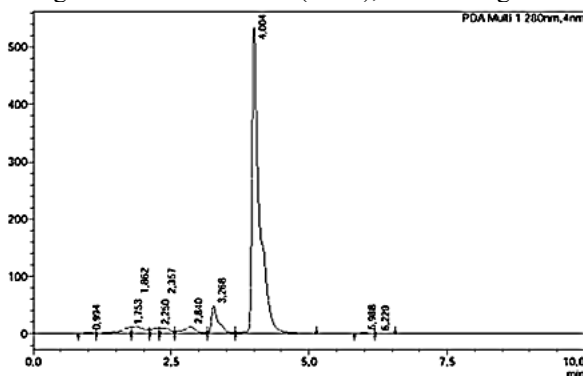
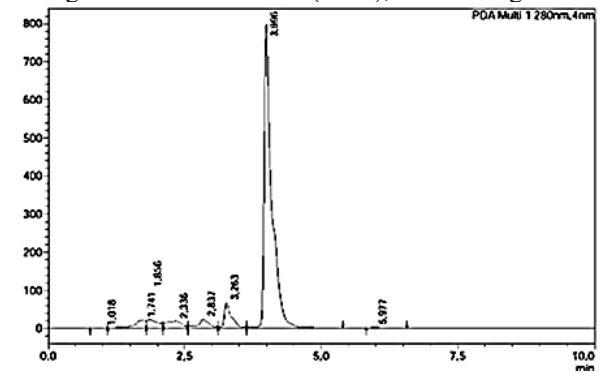


Figura 36 – Amostra V3 (Índia), método eugenol



Fonte: Dados da pesquisa.

Todas as amostras foram realizadas em triplicata. Para a solução padrão foi construída uma curva de calibração e as concentrações das canelas foram calculadas pela equação da reta fornecida.

Com as mesmas condições foram analisadas 3 amostras de canela falsa. A Figura 37 é o cromatograma do padrão eugenol 1000 ppm e as Figuras 38, 39 e 40 são os cromatogramas das canelas falsas, F1, F2 e F3.

Figura 37 - Eugenol padrão 1000 ppm

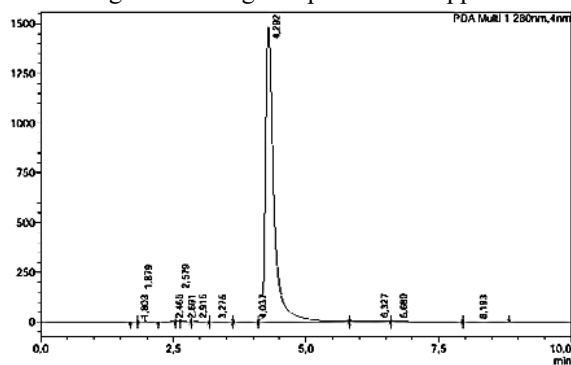


Figura 38 – Amostra F1(Brasil), método eugenol

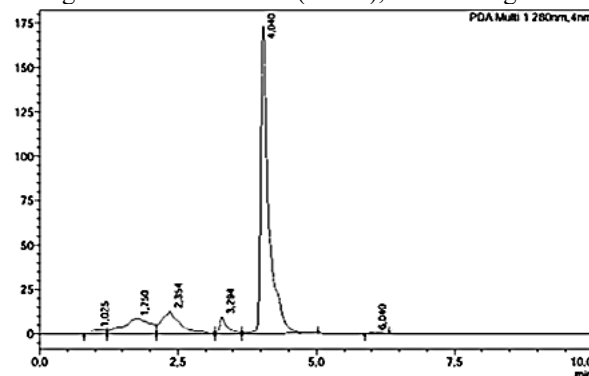


Figura 39 – Amostra F2 (Brasil), método eugenol

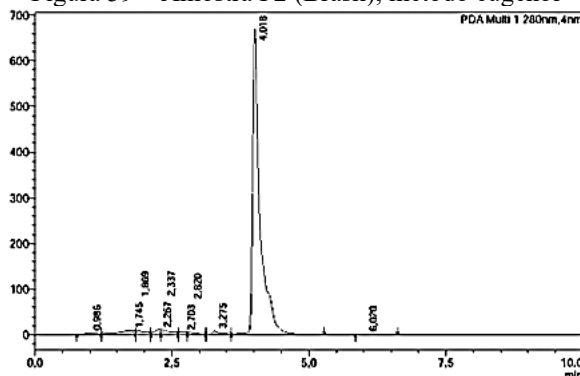
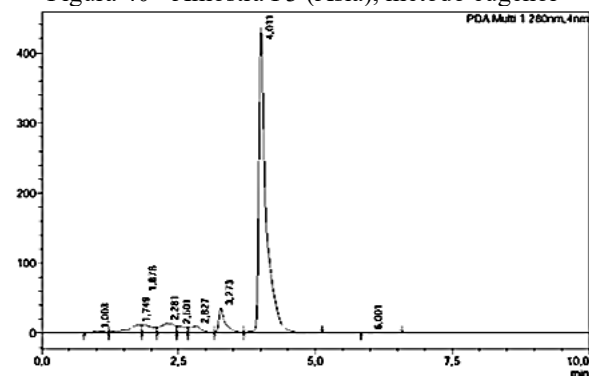


Figura 40 - Amostra F3 (Ásia), método eugenol



Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados da análise das canelas falsas foram feitos em triplicata e utilizada a mesma curva de calibração e equação da reta das canelas verdadeiras.

O tempo de retenção do padrão de eugenol foi o tempo de 4,310 minutos, adequado ao tempo de retenção das canelas.

6.2 Método cumarina

De forma análoga as mesmas amostras de canelas verdadeiras e falsas foram analisadas aplicando o método cumarina.

As soluções de padrão cumarina e das canelas foram preparadas conforme item 4.3 e 4.4 e injetadas no CLAE. Para comparar com as amostras de canelas verdadeiras e falsas foi quantificado a concentração de cumarina nas canelas.

A Figura 41 corresponde ao padrão de cumarina 100 ppm, as Figuras 41, 42 e 43 são as amostras de canelas falsas (F1, F2 e F3).

Figura 41 – Padrão de cumarina 100 ppm

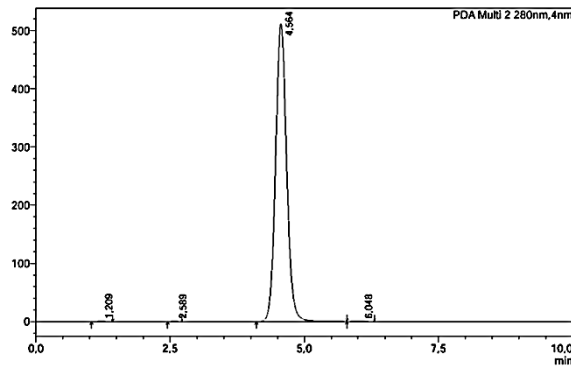


Figura 42 – Amostra F1 (Brasil), método cumarina

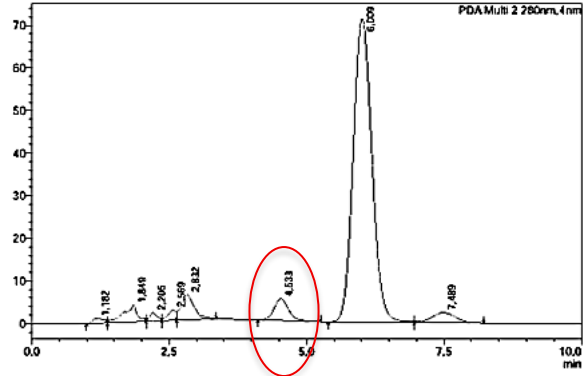


Figura 43 – Amostra F2 (Brasil), método cumarina

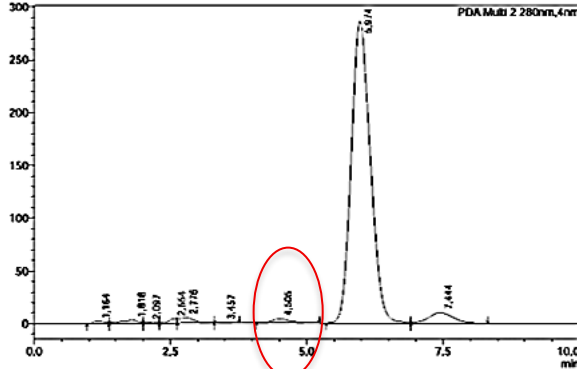
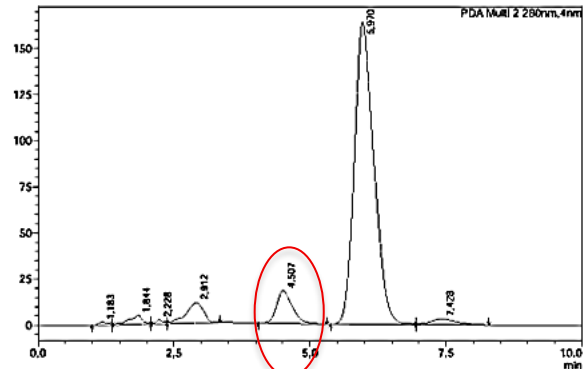


Figura 44 – Amostra F3 (Ásia), método cumarina



Fonte: dados da pesquisa.

As amostras de canela verdadeiras foram analisadas com o método cumarina e os resultados cromatográficos estão nas figuras. A Figura 45 corresponde ao padrão de cumarina 100 ppm, as Figuras 46, 47 e 48 são as canelas verdadeiras (V1, V2 e V3).

Figura 45 – Padrão de cumarina 100 ppm

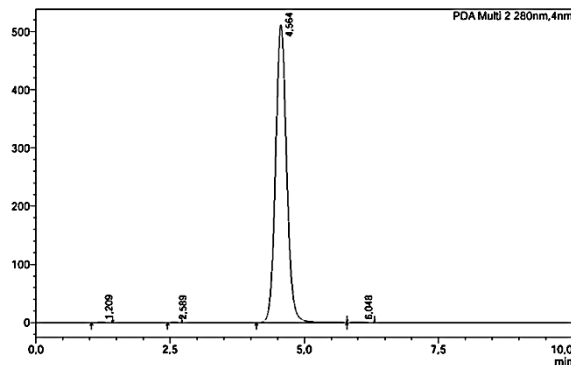


Figura 46 – Amostra V1 (Sri Lanka), método cumarina

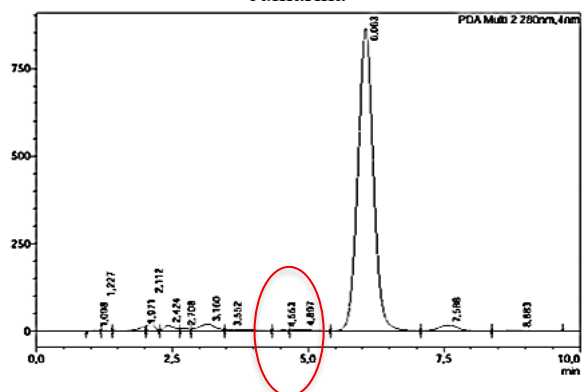


Figura 47 – Amostra V2 (Índia), método cumarina

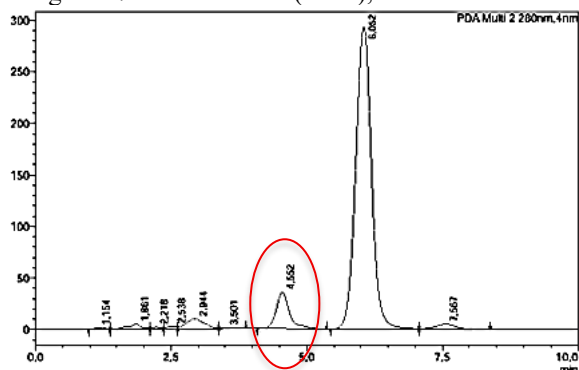
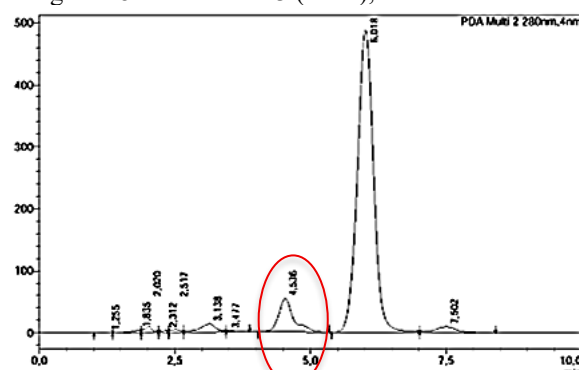


Figura 48 – Amostra V3 (Índia), método cumarina



Fonte: Dados da pesquisa.

As amostras de canela foram analisadas em triplicata, a concentração de cumarina foi calculada pela equação da reta obtida pela curva de calibração dos padrões de cumarina.

Os dados coletados das injeções das amostras no CLAE utilizando o método eugenol e método cumarina foram inseridos na Tabela 21.

Tabela 21 – Concentrações de cada amostra calculados através dos métodos desenvolvidos.

Solução de canela	Concentração de eugenol (ppm)	Concentração de cumarina (ppm)
V1 (Sri Lanka)	742,2	—
V2 (Índia)	5013,0	65,57
V3 (Índia)	4423,8	109,86
F1 (Brasil)	979,5	11,30
F2 (Brasil)	361,25	10,36
F3 (Ásia)	199,62	39,43

Fonte: Dados da pesquisa.

Analisando a Tabela 21 pode-se observar que o melhor marcador para a canela é a cumarina, isso porque as duas amostras de canelas verdadeiras oriundas da Índia apresentaram concentração de cumarina muito maior que qualquer uma das três canelas falsas analisadas, indicando a sua adulteração e a canela do Sri Lanka não pode ser quantificada, pois o sinal estava abaixo do limite de detecção (2). Ao mesmo tempo as canelas falsas apresentam menor concentração de eugenol do que as canelas verdadeiras, exceto quando comparada com a canela do Sri Lanka. A concentração de eugenol da canela do Sri Lanka é ligeiramente menor que da canela falsa (Brasil). Possíveis justificativas para essa pequena diferença podem ser: (1) os fitoquímicos que compõem a canela vinda do Sri Lanka podem conter menos eugenol e mais cinamaldeído (outro marcador analítico da canela verdadeira não quantificado); (2) a canela F1 pode conter misturas de outras canelas falsas aumentando a concentração de eugenol. Por fim, as canelas verdadeiras da Índia possuem um valor de eugenol muito mais alto quando comparadas com a concentração de eugenol da canela do Sri Lanka, isso pode ter sido provocado pela adulteração com outras canelas falsas que também contém eugenol, que faz aumentar a sua concentração.

7 CONTEXTUALIZAÇÃO COM A EDUCAÇÃO

Os currículos atuais vêm sendo estruturados com o propósito de responder de maneira mais efetiva às necessidades formativas dos estudantes, oferecendo uma preparação profissional de acordo com as demandas contemporâneas do mercado e possibilitando a especialização em diferentes subáreas da Química, conforme orientam as Diretrizes Curriculares Nacionais para o Ensino Superior em Química (26). Tais diretrizes enfatizam que o licenciado deve concluir sua trajetória acadêmica com uma formação abrangente, consistente e articulada entre os diversos campos da Química, bem como dominar competências essenciais ao emprego de técnicas e procedimentos laboratoriais.

Nesse contexto, espera-se que o futuro profissional seja apto a atuar com rigor e segurança em ambientes laboratoriais, mobilizando seus conhecimentos experimentais como instrumentos pedagógicos no processo de ensino-aprendizagem (26). Contudo, a literatura evidencia que essa área do conhecimento enfrenta obstáculos significativos. Mortimer (27) destaca que a Química é frequentemente percebida por estudantes do ensino médio e superior como uma disciplina excessivamente abstrata, pouco conectada ao cotidiano e marcada por exigências de memorização, fatores que contribuem para a diminuição do interesse e do envolvimento dos discentes.

Diante desse cenário, torna-se fundamental adotar práticas educativas que favoreçam a contextualização, a interdisciplinaridade e a aproximação entre teoria e realidade concreta, de modo a estabelecer relações entre os conteúdos químicos e as vivências dos estudantes (27,28). As atividades experimentais configuram-se, assim, como instrumentos pedagógicos de grande potencial, pois estimulam a curiosidade científica, ampliam a compreensão de fenômenos, permitem a visualização de conceitos teóricos, desenvolvem habilidades práticas, promovem a formulação e o teste de hipóteses e fortalecem o pensamento investigativo (28).

A inserção contínua de atividades experimentais no ensino de Química, tanto na educação básica quanto no ensino superior, configura-se como uma estratégia fundamental para superar desafios recorrentes no processo formativo, especialmente a necessidade de promover aulas mais envolventes e relevantes, além de garantir uma preparação técnica e pedagógica robusta aos futuros profissionais da área. Nesse sentido, as práticas laboratoriais assumem um papel central ao favorecer a construção e a verificação de hipóteses, estimular a interpretação crítica de resultados, fortalecer a argumentação científica e promover o desenvolvimento de competências de caráter interdisciplinar (29,30).

O roteiro proposto pode ser analisado a seguir.

7.1 Roteiro experimental

7.1.1 Preparo das soluções padrão de cumarina

Antes de preparar soluções e amostras, fazer a ambientação de todos os balões com a solução de metanol 80% e certificar de usar somente água ultrapura.

- Para o preparo da solução estoque de cumarina com concentração teórica de 1000 ppm, pese 0,1 g de cumarina com alto grau de pureza.
- Dissolva a cumarina em metanol 80% e transfira para balão volumétrico de 100 mL.
- Diluir a solução estoque para obter 7 soluções padrão com o volume final de 10 mL em concentrações de 10, 20, 30, 50 70, 90 e 100 ppm.
- Filtrar todas as soluções padrão utilizando filtro de seringa com porosidade 0,22 μm PTFE colocando essas soluções em frascos apropriados. Levar ao ultrassom por 3 minutos antes de injetar no CLAE.

7.1.2 Preparo da amostra de canela

- Pesar 0,5 g de canela, transferir para tubo Falcon e adicionar 20 mL de metanol 80%.
- Levar para banho ultrassom por 30 minutos.
- Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm.
- Retirar o sobrenadante e adicionar a um balão volumétrico de 25 mL.
- Repetir a operação (2 vezes) adicionando 10 ml de metanol 80% ao tubo Falcon.
- Se necessário completar o volume do balão com metanol 80%.
- Diluir a solução pipetando 2,5 mL em balão de 25 mL.
- Filtrar a solução e levar ao ultrassom por 3 minutos antes de injetar no CLAE.

7.1.3 Condições cromatográficas

- Fase móvel: água ultrapura (pump A) e metanol (pump B) (40:60) v/v.
- Fluxo: 1 mL/min, injeção de amostra: 20 μmL
- Tempo de varredura 12 minutos
- λ detector: 280 nm, temperatura ambiente.

7.2 Resultados e discussões esperados

- Apresentar os cromatogramas dos padrões e da amostra.
- Fazer uma tabela com o tempo de retenção e área do pico da cumarina para todas as soluções padrão e para a amostra de canela.
- Plotar a curva de calibração da cumarina
- Calcular a concentração de cumarina na canela
- Apresentar um relatório sobre a prática laboratorial realizada com referências na literatura.

Pode-se sugerir utilizar duas ou mais amostras de canelas diferentes para comparar a quantidade de cumarina em cada uma das canelas.

8 CONCLUSÃO

Os métodos analíticos desenvolvidos e validados para a quantificação de eugenol e cumarina demonstraram desempenho adequado segundo os critérios estabelecidos pelas diretrizes de validação, evidenciando linearidade, precisão, exatidão, seletividade, robustez e limites apropriados para a determinação desses marcadores em amostras de canela.

A validação do método para eugenol permitiu avaliar sua presença como composto característico da *Cinnamomum verum*, enquanto o método para cumarina se mostrou eficaz como marcador distintivo para *Cinnamomum cassia*, espécie amplamente associada a maiores concentrações desse composto.

A aplicação dos dois métodos permitiu diferenciar de maneira confiável a canela verdadeira da canela falsa, estabelecendo um procedimento analítico robusto para fins de controle de qualidade e autenticidade. As análises revelaram que uma amostra classificada como canela verdadeira apresentava teor elevado de cumarina, incompatível com o perfil químico esperado para *C. verum*. A posterior análise de uma amostra autêntica proveniente do Sri Lanka, na qual não se detectou cumarina, confirmou a adulteração das duas amostras produzidas na Índia e reforçou a eficácia do método na autenticação de canelas comercializadas.

Dessa forma, a combinação dos métodos validados para eugenol e cumarina mostrou-se uma ferramenta precisa, seletiva e confiável para distinguir canela verdadeira (*C. verum*) de canela falsa (*C. cassia*), evidenciando sua aplicabilidade em estudos de autenticidade, fiscalização de produtos alimentícios e monitoramento da qualidade de matérias-primas

comercializadas no setor alimentício e fitoterápico. Podendo concluir que o índice de cumarina é um parâmetro adequado para avaliar se a canela é verdadeira ou falsa.

Além disso, o presente trabalho propõe uma atividade experimental direcionada à caracterização qualitativa e quantitativa de cumarina, um marcador analítico amplamente empregado na diferenciação entre canela verdadeira (*C. verum*) e a canela falsa (*C. cassia*), utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC). A proposta permite integrar conhecimentos de Química Orgânica e Química Analítica, estabelecendo conexões com o cotidiano dos alunos, visto que especiarias e produtos alimentícios adulterados ou de qualidade duvidosa constituem um tema relevante do ponto de vista econômico, sanitário e social.

REFERÊNCIAS

- [1] DEAN, W. A Botânica e a Política Imperial: Introdução e Adaptação de Plantas no Brasil Colonial e Imperial. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.iea.usp.br/artigos>.
- [2] ANANTHAKRISHNAN, R. et al. Quantification of coumarin and related phenolics in cinnamon samples from South India using UHPLC-ESI-QqQLIT-MS/MS method. *International Journal of Food Properties*, v. 21, n. 1, p. 50–57, 16 abr. 2018.
- [3] LOPES, J. D. S. et al. Application of spectroscopic techniques and chemometric methods to differentiate between true cinnamon and false cinnamon. *Food Chemistry*, v. 368, 30 jan. 2022.
- [4] CASTRO, R. C. et al. Authentication/discrimination, identification and quantification of cinnamon adulterants using NIR spectroscopy and different chemometric tools: A tutorial to deal with counterfeit samples. *Food Control*, v. 147, p. 109619, 1 maio 2023.
- [5] FORD, P. W. et al. Cinnamon – Differentiation of four species by linking classical botany to an automated chromatographic authentication system. *Journal of AOAC International/AOAC International*, , 1 mar. 2019.
- [6] ABEYSEKERA, W. P. K. M. et al. Anti-inflammatory, cytotoxicity and antilipidemic properties: novel bioactivities of true cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) leaf. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, v. 22, n. 1, p. 1–15, 1 dez. 2022.
- [7] FARAJ, M.; SHILCHI, P.; MAHMOUDI-MEYMAND, M. Investigating the amount of coumarin in cinnamon samples as an indicator of safety and authenticity by liquid chromatography. *Advances in the standards e applied sciences*, v. 1, p. 19–27, 2023.
- [8] SOLAIMAN, AA; AL-ZEHOURI, J. Determination of coumarin in methanol extract of cinnamon (*Cinnamomum cassia* Blume) using reversed-phase high performance liquid chromatography. ~ 726 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 6, n. 4, p. 726–729, 2017.
- [9] DING, Y. et al. Discrimination of cinnamon bark and cinnamon twig samples sourced from various countries using HPLC-based fingerprint analysis. *Food Chemistry*, v. 127, n. 2, p. 755–760, 15 jul. 2011.
- [10] LONČAR, M. et al. Coumarins in food and methods of their determination. *FoodsMDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, , 1 maio 2020.
- [11] PAGES-REBULL, J. et al. Application of HPLC-UV combined with chemometrics for the detection and quantification of ‘true cinnamon’ adulteration. *Talanta*, v. 271, 1 maio 2024.
- [12] ANVISA. Ministério da Saúde-MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. 24 jul. 2017.
- [13] NABAVI, S. F. et al. Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. *NutrientsMDPI AG*, , 11 set. 2015.

- [14] CASTRO, R. C. et al. Authentication/discrimination, identification and quantification of cinnamon adulterants using NIR spectroscopy and different chemometric tools: A tutorial to deal with counterfeit samples. *Food Control*, v. 147, 1 maio 2023.
- [15] RIBEIRO-SANTOS, R. et al. Revisiting an ancient spice with medicinal purposes: Cinnamon. *Trends in Food Science and Technology* Elsevier Ltd, , 1 abr. 2017.
- [16] FELTES, G. et al. Differentiating True and False Cinnamon: Exploring Multiple Approaches for Discrimination. *Micromachines* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 out. 2023.
- [17] FARAG, M. A. et al. NMR approach for the authentication of 10 cinnamon spice accessions analyzed via chemometric tools. *LWT*, v. 90, p. 491–498, 1 abr. 2018.
- [18] WOEHLIN, F. et al. Quantification of flavoring constituents in cinnamon: High variation of coumarin in cassia bark from the German retail market and in authentic samples from Indonesia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 19, p. 10568–10575, 13 out. 2010.
- [19] SKOOG, D. et al. *Fundamentos de Química Analítica*. 8. ed. São Paulo: [s.n.].
- [20] ACREDITAÇÃO, C. G. *Orientação sobre validação de métodos analíticos*. [s.l: s.n.].
- [21] RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C. *Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados* *Quim. Nova*. [s.l: s.n.].
- [22] BAZILIO, F. S. et al. Intralaboratory validation of an analytical method for determining the migration of bis(2-ethylhexyl) adipate from packaging to fat foods. *Accreditation and Quality Assurance*, v. 19, n. 3, p. 195–204, 2014.
- [23] NETO, B. DE B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. *Recomendações para calibração em química analítica - Parte 1. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada)*. v. 25, p. 856–865, set. 2002.
- [24] SELVARANI, S. R. et al. A validated RP-HPLC-PDA method for quantification of Eugenol in primed seeds of tomato, Brinjal, and Chilli using plant based Eugenol and commercial Eugenol. ~ 1392 ~ *The Pharma Innovation Journal*, v. 10, n. 10, 2021.
- [25] PRAMOD, K. et al. Development and validation of RP-HPLC-PDA method for the quantification of eugenol in developed nanoemulsion gel and nanoparticles. *Journal of Analytical Science and Technology*, v. 1, n. 1, p. 1–6, out. 2013.
- [26] BRASIL, M. DA E. PARECER CNE/CES 1.303/2001 - Homologado. *Diário Oficial da União* Brasília, Brasil, 2001.
- [27] MORTIMER, E. F.; MACHADO, A. H. *A proposta curricular de química do Estado de Minas Gerais: Fundamentos e pressupostos*. v. 23, n. 2, p. 273–284, 2000.

- [28] IZQUIERDO, M.; MARIONA, E. Fundamentación y diseño de las prácticas escolares de ciencias experimentales. *Investigación Didáctica*, v. 17, n. 1, p. 45–59, 1999.
- [29] FROZZA, E.; PASTORIZAI, B. D. S. “A Química é uma área experimental!”: discursos sobre a experimentação em um curso de formação de professores de Química. *Ciência e Natura*, v. 43, p. e5, 1 fev. 2021.
- [30] MASSENA, E. P.; FILHO, N. J. DE G.; SÁ, L. P. Produção de casos para o ensino de química: Uma experiência na formação inicial de professores. *Quim. Nova*. [s.l: s.n.].

ANEXOS

Certificados de apresentação da metodologia desenvolvida em congressos de química.

Participação da 48ª RASBQ em junho/2025



Participação da 20ª COLACRO em outubro/2025

