

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LEONARDO CAVALCANTE DE QUEIROZ

AUTENTICAÇÃO DE ÓLEO RESINA DE COPAÍBA
POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

MANAUS – AM

2020

LEONARDO CAVALCANTE DE QUEIROZ

Bolsista CAPES

**AUTENTICAÇÃO DE ÓLEO RESINA DE COPAÍBA
POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, na área de Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Batista Machado

MANAUS – AM

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Q3a Queiroz, Leonardo Cavalcante de
Autenticação de óleo resina de copaíba por Ressonância
Magnética Nuclear / Leonardo Cavalcante de Queiroz . 2020
138 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Marcos Batista Machado
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. copaífera. 2. adulteração. 3. rmn-dt. 4. eretic2. 5. pls. I.
Machado, Marcos Batista. II. Universidade Federal do Amazonas
III. Título

Autenticação de óleo de resina de copaíba por Ressonância Magnética Nuclear

LEONARDO CAVALCANTE DE QUEIROZ

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovada em 30 de outubro de 2020.



MARCOS BATISTA MACHADO (DQ/UFAM)

Presidente/Orientador



Prof. Dr. Luiz Antônio M. A. da Costa
Matric. Sabe n° 14814900/FRR

LUIZ ANTÔNIO MENDONCA ALVES DA COSTA (UFRR)

Membro Externo



MARCO ANTONIO DOS SANTOS FARIAS (DQ/UFAM)

Membro Interno

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 30 de outubro de 2020.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e proteção, e pela coragem para as batalhas diárias.

A meus pais, Raimundo Nonato e Maria do Carmo, pelo amor incondicional, apoio familiar e financeiro e a todos da família.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Marcos Machado, por acreditar no meu potencial, pela amizade, pelo incentivo, paciência e compreensão.

Aos amigos do grupo de pesquisa Nequima: Edinilze Coelho, Jaqueline Bezerra, Kidney Gomes, Alan Diego da Conceição e Andrezza Ramos, por toda ajuda e pelos momentos vividos.

A Jaqueline Bezerra pela ajuda gráfica.

A Universidade Federal do Amazonas, por permitir fazer uso de suas dependências.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida.

Ao Prof. Alberto Colnago da EMBRAPA Instrumentação São Carlos/SP e toda sua equipe, em especial, à Tatiana Monaretto, por terem me recebido e ajudado cientificamente sobre RMN-DT.

A Equipe da Fit (Fine Instrument Technology) pelo suporte operacional.

Ao Prof. Luiz Antônio da Costa, do Laboratório de cromatografia da Universidade Federal de Roraima pelas análises cromatográficas.

Aos professores do PPGQ pelos ensinamentos.

E a todos os demais que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.

John F. Kennedy

RESUMO

O óleo de copaíba é um óleo resina extraído do tronco de árvores de espécies do gênero *Copaifera*. Esse óleo possui diversas atividades farmacológicas, tais como: anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica. Devido a essas propriedades, este óleo é utilizado a gerações por índios e pela população tradicional visando curar ou amenizar enfermidades, como inflamações e feridas através do uso oral ou tópico. Contudo, esses benefícios farmacológicos, associado a baixa produção, torna o óleo de copaíba um bioproduto amazônico de alto valor agregado. Conseqüentemente, a adulteração com óleo de soja é comum e eleva a lucratividade. Porém, essa pratica lesa o consumidor, que adquire um produto adulterado. Comumente, a autenticação desse produto se dá por cromatografia gasosa, que além de elevado custo analítico não é eficiente para detectar a adulteração com óleo vegetal. Diante disto, a busca por métodos simples, rápidos, baratos e confiáveis na identificação de adulterantes nesse óleo se faz necessário. Assim, a RMN auxiliada por ferramentas quimiométricas (PCA e PLSR) foi utilizada com o objetivo de solucionar esse problema. Por CG-EM foram identificados quatro constituintes majoritários: β -cariofileno (22,9 a 68,7%), α -copaeno (1,5 a 24,2%), germacreno D (1,2 a 16,4%) e α -humuleno (3,5 a 15,7%) em todas as amostras. Óxido de cariofileno (0,2 a 16,0%), drimenol (5,1 a 20,3%) e juniper camphor (2,0 a 12,1%) foram identificados, principalmente, nas amostras com maior viscosidade. O uso de RMN de alta resolução permitiu identificar a adulteração com óleo de soja. Os teores de adulterante das amostras comerciais foram estimados por ERETIC2 e PLSR e variaram entre 3,2 a 96%. Essas duas abordagens quantitativas apresentam boa concordância entre si. A autenticação do óleo de copaíba por RMN-DT mostrou-se limitada devido a elevada variabilidade química e, conseqüentemente, elevada variação da viscosidade. Portanto, o uso da RMN de alta resolução foi efetivo mais efetivo e permitiu identificar e quantificar a adulteração com óleo de soja em amostras comerciais de copaíba independente da variabilidade química. Assim sendo, essa metodologia apresenta-se bastante satisfatória para a autenticação de amostras de óleo resina de copaíba.

PALAVRAS-CHAVES: *Copaifera*, adulteração, RMN-DT, ERETIC2, PLSR, Transformada Inversa de Laplace

ABSTRACT

Copaiba oil is a resin oil extracted from the trunk of trees of species of the genus *Copaifera*. This oil has several pharmacological activities, such as anti-inflammatory, antibacterial, and antifungal. Because of these properties, this oil has been used natives and the traditional population to cure or alleviate illnesses, such as inflammation and wounds, through oral or topical use. However, these pharmacological benefits, associated with low production, make copaiba oil a high value-added Amazonian bioproduct. Consequently, adulteration with soybean oil is common and increases profitability. However, this practice harms the consumer who purchases an adulterated product. Commonly, the authentication of this product is done by gas chromatography, which in addition to high analytical cost, is not efficient in detecting adulteration with vegetable oil. Because of this, the search for simple, fast, cheap, and reliable methods to identify adulterants in this oil is necessary. Thus, NMR support by chemometric tools (PCA and PLSR) was used to solve this problem. Four major constituents were identified by GC-MS: β -caryophyllene (22.9 to 68.7%), α -copaene (1.5 to 24.2%), germacrene D (1.2 to 16.4%), and α -humulene (3.5 to 15.7%) in all samples. Caryophyllene oxide (0.2 to 16.0%), drimenol (5.1 to 20.3%), and juniper camphor (2.0 to 12.1%) were identified, mainly in samples with higher viscosity. The use of high-resolution NMR allowed adulteration with soybean oil to be identified. The commercial samples' adulterant contents were estimated by ERETIC2 and PLSR and varied between 3.2 to 96%. These two quantitative approaches are in good agreement with each other. The authentication of copaiba oil by TD-NMR was limited due to high chemical variability and high variation in viscosity. Therefore, the use of high-resolution NMR was more effective and allowed to identify and quantify adulteration with soybean oil in commercial samples of copaiba, regardless of chemical variability. Therefore, this methodology is quite satisfactory for the authentication of samples of copaiba resin oil.

KEYWORDS: *Copaifera*, adulteration, TD-NMR, ERETIC2, PLSR, Inverse Laplace Transformation

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Extração do óleo resina do tronco da copaibeira | 18 |
| Figura 2 - Principais terpenos encontrados no óleo resina de copaíba..... | 21 |
| Figura 3 - Orientação dos spins na ausência ou presença de campo magnético externo | 31 |
| Figura 4 - Representação esquemática da magnetização dos spins: a) aplicação do campo magnético B_0 ; b) e c) magnetização resultante M_0 , ocorrendo dois efeitos: b) deslocamento de spins de estado de menor energia para estado de maior energia e c) spins entrando em fase; d) todos os spins do sistema alinhados no plano $x'y'$ | 32 |
| Figura 5 - Retorno do vetor magnetização M_0 ao equilíbrio através do fenômeno de precessão, após aplicação de pulso de 90° | 33 |
| Figura 6 - Recuperação da Magnetização (M_z) ao equilíbrio inicial (M_z^0)..... | 36 |
| Figura 7 - a) sequência Inversão Recuperação (IR); b) repetições da sequência IR com aumento do tempo de espera τ ; c) sinal exponencial obtido pela sequência IR | 37 |
| Figura 8 - Sequência de pulso CPMG..... | 38 |
| Figura 9 - Representação vetorial da evolução temporal da magnetização da sequência de pulso CPMG..... | 39 |
| Figura 10 - a) Sequência de pulso CP-CWFP _{x-x} e b) composição do sinal obtido por CP-CWFP _{x-x} | 41 |
| Figura 11 - Sequência de pulso CWFP-T1..... | 42 |
| Figura 12 - Sequência de pulso <i>small flip-flop</i> (SAFF) | 43 |
| Figura 13 - Extração de óleo de copaíba com trado (amostra F1) | 49 |
| Figura 14 - Região Metropolitana de Manaus - Amazonas | 50 |
| Figura 15 – Tubos contendo amostras de óleo de copaíba utilizada nas análises por RMN-DT no equipamento SpecFit | 55 |
| Figura 16 - Alinhamento dos espectros de RMN 1H através do algoritmo icoshift..... | 57 |
| Figura 17 - Amostras Puras de óleo de Copaíba e óleo de soja | 59 |
| Figura 18 - Amostras comerciais de óleo de copaíba de Manaus (ACM), Pará (ACP) e São Carlos (ACSC) | 60 |
| Figura 19 - Cromatogramas TIC amostras de óleo de copaíba em ordem decrescente de viscosidade a $20^\circ C$ | 64 |
| Figura 20 - Correlação de Pearson dos dados de CG-EM..... | 67 |

| | |
|---|-----|
| Figura 21 - Gráfico <i>biplot</i> da PCA das amostras analisadas por CG-EM. A) PC1xPC2, B) PC1xPC3..... | 68 |
| Figura 22 - Dendograma HCA das amostras analisadas por CG-EM | 69 |
| Figura 23 - Identificação dos sinais de RMN de ¹ H dos componentes presentes no óleo de copaíba (amostra D1)..... | 72 |
| Figura 24 - Estruturas moleculares do Glicerol e do Ácido Linolênico (18:3) | 75 |
| Figura 25 - Espectros de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do óleo de soja, copaíbas autênticas e adulteradas | 76 |
| Figura 26 – Gráfico de <i>scores</i> da PCA (PC1 x PC2) dos espectros de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de amostras de óleos de copaíba autênticas, comerciais, <i>blends</i> e adulterantes (óleo de soja e óleo mineral) | 77 |
| Figura 27 - Gráficos de <i>scores</i> da PCA (PC1 x PC2) dos espectros de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃), dados normalizados pela área | 78 |
| Figura 28 - Gráficos de <i>loadings</i> da PCA (PC1 x PC2) dos espectros de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃)..... | 79 |
| Figura 29 - Curva de calibração PLSR dos <i>blends</i> de B1, obtidos a partir dos espectros de RMN de ¹ H | 83 |
| Figura 30 - Comparativo do Teor de adulterante obtido por ERETIC2 e PLSR. A) Conjunto de Validação; B e C) Conjunto de predição: Amostras Comerciais | 87 |
| Figura 31 - Transformada Inversa de Laplace (ILT) para amostras autênticas de copaíba. Distribuição de T2 (CPMG)..... | 90 |
| Figura 32 - ILT <i>blends</i> binários de copaíba: B1, B2, D1 e D4 | 92 |
| Figura 33 - ILT <i>blends</i> binários de copaíba: D9, F1, BM e PA1 | 93 |
| Figura 34 - Curva de decaimento CPMG das amostras autênticas de copaíba, óleo de soja e óleo mineral | 94 |
| Figura 35 - Variáveis obtidas por ajuste Monoexponencial de SAFF (T ₁ e A ₁) e CPMG (T ₂ e A ₁)..... | 96 |
| Figura 36 - Variáveis obtidas por ajuste biexponencial de SAFF | 97 |
| Figura 37 - Variáveis obtidas por ajuste biexponencial de CPMG..... | 98 |
| Figura 38 - Variáveis obtidas por ajuste triexponencial de CPMG | 99 |
| Figura 39 - Gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i> da PCA dos dados biexponenciais de SAFF: A ₁ e A ₂ | 102 |
| Figura 40 - Gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i> da PCA dos dados biexponenciais de SAFF: T _{1,1} , T _{1,2} e A ₁ , A ₂ | 103 |

| | |
|---|-----|
| Figura 41 - Gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i> da PCA dos dados biexponenciais de CPMG: T _{2,1} e T _{2,2} | 104 |
| Figura 42 - Gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> da PCA dos dados biexponenciais de CPMG: A ₁ , A ₂ | 105 |
| Figura 43 - Gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> da PCA dos dados biexponenciais de CPMG: T _{2,1} , T _{2,2} e A ₁ , A ₂ | 106 |
| Figura 44 - Gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> da PCA dos dados biexponenciais de SAFF e CPMG: T _{1,1} , T _{1,2} e T _{2,1} , T _{2,2} | 107 |
| Figura 45 - Gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> da PCA dos dados biexponenciais de SAFF e CPMG: (A ₁ , A ₂ de T ₁) e (A ₁ , A ₂ de T ₂) | 108 |
| Figura 46 - Gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> da PCA dos dados biexponenciais de SAFF e CPMG: todas as variáveis | 109 |

APÊNDICE

| | |
|--|-----|
| Apêndice 1 - Espectros de RMN de ¹ H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl ₃) | 119 |
| Apêndice 2 - Espectros de RMN de ¹³ C das amostras autênticas e comerciais de copaíba (600 MHz, CDCl ₃) | 135 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Parâmetros físicos e Viscosidade dinâmica para os óleos resina de copaíba por indivíduo | 61 |
| Tabela 2 - Percentual relativo dos componentes do óleo resina de copaíba identificados por CG-EM | 66 |
| Tabela 3 - Sinais característicos das substâncias majoritárias em amostras de óleo de copaíba..... | 71 |
| Tabela 4 - Sinais de RMN ¹ H de alta resolução característicos do óleo de soja | 74 |
| Tabela 5 - Cálculo estimado da massa molecular média para o óleo de soja..... | 80 |
| Tabela 6 - Quantificação do Teor de Adulterante (óleo de soja) por ERETIC2 em amostras de óleo de copaíba | 82 |
| Tabela 7 – Predição do Teor de Adulterante por PLSR das amostras do conjunto de validação | 84 |
| Tabela 8 - Predição de amostras autênticas e comerciais por PLSR..... | 85 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|--|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| API | American Petroleum Institute |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| CG | Cromatografia Gasosa |
| CP-CWFP | Carr-Purcell-Continuos Wave Free Precession |
| CPMG | Carr-Purcell-Meiboom-Gill |
| CWFP | Continuos Wave Free Precession |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias |
| ERETIC2 | Electronic to Access In Vivo Concentration |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FID | Free Induction Decay |
| HCA | Hierarchical Clustering Analysis |
| ILT | Inverse Laplace Transformation |
| IR | Inversão Recuperação |
| LDA | Linear Discriminant Analysis |
| MCR | Material Certificado de Referência |
| NIR | Near Infrared Spectroscopy |
| PCA | Principal Component Analysis |
| PLSR | Partial Least Square Regression |
| PULCON | Pulse Length-Based Concentration Determination |
| PVC | Policloreto de vinila |
| RENISUS | Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse do SUS |
| REP | Erro de Predição Relativo |
| RFAD | Reserva Florestal Adolpho Ducke |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RMN-DT | Ressonância Magnética Nuclear no domínio do tempo |
| RMSE | Root Mean Square Error |
| RMSEC | Root Mean Standard Error of Calibration |
| RMSECV | Root Mean Standard Error of Cross-Validation |
| RMSEP | Root Mean Square Error Prediction |
| SAFF | Small Angle flip-flop |
| SNR | Signal Noise Relation |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| SVD | Singular Value Decomposition |
| TAG | Triacilglicerídeo |
| TIC | Total Ion Chromatogram |
| TMSD | Trimetilsilildiazometano |

LISTA DE SIMBOLOS

| | |
|-----------------|--------------------------------------|
| $ M_{EE} $ | Magnetização no estado estacionário |
| μ | Momento magnético |
| ^{13}C | Núcleo de carbono 13 |
| ^1H | Núcleo de hidrogênio (próton) |
| AQ | Acquisition Time |
| B_0 | Campo magnético estático |
| B_1 | Campo magnético oscilante |
| D1 | Tempo de espera entre pulso (Bruker) |
| <i>dd</i> | duplo duplete |
| DS | Dummy Scans |
| γ | Constante magnetogírica |
| L | Momento angular |
| LB | Line Broadening |
| <i>m</i> | multiplete |
| M_0 | Magnetização resultante inicial |
| M_z | Magnetização resultante no eixo Z |
| ν | frequência |
| π | pi |
| P1 | Pulso de 90° (Bruker) |
| Rf | Fator de retenção |
| <i>s</i> | singleto |
| <i>s/</i> | singleto largo |
| SW | Spectral Width |
| <i>t</i> | tripleto |
| T^* | Tempo de relaxação efetivo |
| T_1 | Relaxação longitudinal |
| T_2 | Relaxação transversal |
| τ | Tempo entre pulsos |
| TD | Size of Fid |
| T_p | Tempo de espera entre pulsos |
| ω_0 | Frequência de Larmor |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO | 16 |
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 1.1. COPAÍBA..... | 18 |
| 1.2. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE COPAÍBA..... | 20 |
| 1.3. ADULTERAÇÃO DO ÓLEO DE COPAÍBA..... | 22 |
| 1.4. REGULAMENTAÇÃO..... | 26 |
| 2. MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NA ANÁLISE DE ÓLEO DE COPAÍBA | 27 |
| 2.1. CROMATOGRAFIA GASOSA | 28 |
| 2.1.1. DETECTOR POR IONIZAÇÃO DE CHAMA | 29 |
| 2.1.2. DETECTOR POR ESPECTRÔMETRO DE MASSAS | 29 |
| 2.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) | 30 |
| 2.3. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR – RMN | 31 |
| 2.4. SEQUÊNCIAS DE PULSOS PARA RMN-DT | 36 |
| 2.4.1. IR (Inversão Recuperação) | 36 |
| 2.4.2. CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill)..... | 38 |
| 2.4.3. CP-CWFP _{x-x} | 40 |
| 2.4.4. CWFP-T1 | 42 |
| 2.4.5. SAFF | 43 |
| 2.5. TRANSFORMADA INVERSA DE LAPLACE (ILT) | 44 |
| 3. ANÁLISE EXPLORÁTORIA E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA DE DADOS | 45 |
| 3.1. PCA | 46 |
| 3.2. PLSR | 46 |
| 4. OBJETIVOS | 48 |
| 4.1. OBJETIVO GERAL..... | 48 |
| 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 48 |
| 5. METODOLOGIA..... | 49 |
| 5.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRA DE ÓLEO DE COPAÍBA | 49 |
| 5.2. PREPARO DE BLENDS BINÁRIOS | 51 |
| 5.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA | 52 |
| 5.3.1. VISCOSIDADE DINÂMICA | 52 |

| | |
|---|-----|
| 5.3.2. TESTE DE CONGELAMENTO | 53 |
| 5.4. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA | 53 |
| 5.4.1. CROMATOGRAFIA GASOSA | 53 |
| 5.4.2. RMN DE ALTA RESOLUÇÃO..... | 54 |
| 5.4.2.1. QUANTIFICAÇÃO POR ERETIC2 | 54 |
| 5.4.3. RMN DE BAIXO CAMPO OU NO DOMÍNIO DO TEMPO (RMN-DT) | 55 |
| 5.5. ANÁLISE MULTIVARIADA DE DADOS..... | 56 |
| 5.5.1. PROCESSAMENTO DOS DADOS OBTIDOS POR RMN DE ALTA RESOLUÇÃO..... | 56 |
| 5.5.2. PROCESSAMENTO DOS DADOS OBTIDOS POR RMN-DT | 58 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 59 |
| 6.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS DE COPAÍBA..... | 59 |
| 6.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE COPAÍBA POR CG-EM..... | 64 |
| 6.2.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE COPAIBA POR RMN DE ALTA RESOLUÇÃO..... | 71 |
| 6.2.2. VERIFICAÇÃO DE AUTENTICIDADE DO ÓLEO DE COPAIBA POR RMN DE ALTA RESOLUÇÃO..... | 73 |
| 6.2.3. QUANTIFICAÇÃO DO ADULTERANTE (ÓLEO DE SOJA) POR RMN DE ALTA RESOLUÇÃO..... | 80 |
| 6.2.3.1. ERETIC2 | 80 |
| 6.2.3.2. PLSR..... | 83 |
| 6.3. VERIFICAÇÃO DE AUTENTICIDADE DO ÓLEO DE COPAIBA POR RMN NO DOMÍNIO DO TEMPO..... | 89 |
| CONCLUSÃO..... | 111 |
| REFERÊNCIAS..... | 113 |
| APÊNDICE | 119 |

INTRODUÇÃO

A Amazônia é maior floresta tropical úmida do mundo e abriga uma enorme biodiversidade de fauna e flora. Abrigando mais de um milhão de espécies de insetos, 40,000 de plantas, 3,000 de peixes, 1,300 de aves, 430 de mamíferos e de anfíbios, além de 380 de répteis. A ocorrência e a distribuição dessas espécies neste bioma se fazem de forma heterogênea em função da complexidade e vastidão territorial (LÓPEZ-OSORIO; MIRANDA-ESQUIVEL, 2010).

Da Amazônia é possível obter uma grande quantidade de produtos naturais que possuem inúmeras propriedades farmacológicas e medicinais. E esses produtos naturais são utilizados a gerações pelos indígenas e pela população em geral para curar males e enfermidades (MORELLI et al., 2015).

Neste contexto, entre as diversas matrizes vegetais exploradas pelo ser humano, ganham destaques as produtoras de óleo vegetal (castanha-do-brasil, babaçu, andiroba, etc.) e de óleo resina, como a copaíba, que despertam grande interesse no mercado nacional e internacional podendo ser aproveitadas no ramo de alimentos, cosméticos e fitoterápicos.

Dos diversos bioprodutos oriundos da Amazônia destaca-se o óleo de copaíba que é um óleo resina extraído de árvores do gênero *Copaifera* spp. com grande ocorrência na região Amazônica e central do Brasil. É um produto natural que possui diversas propriedades farmacológicas, tais como: anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica e outras, que ocasionam um intenso uso popular. É também utilizado por indústrias cosméticas para a produção de cremes, loções, sabonetes e xampus, e como fixador de fragrância em perfumes (NOGUEIRA; FURTADO; BASTOS, 2015; SHANLEY; SERRA; MEDINA, 2010).

Devido a suas propriedades farmacológicas, baixa produção (obtido por extrativismo), e elevado preço do óleo de copaíba, é bastante comum encontrá-lo adulterado a venda no comércio local, como nas feiras e lojas de produtos naturais, pois ainda não há parâmetros de controle de qualidade bem definido para este produto.

Comumente, para verificar a autenticidade do produto, utiliza-se de técnicas de custo elevado, como a cromatografia gasosa. Contudo, o custo dessas análises as torna um obstáculo para verificações rotineiras, dificultando a identificação de fraudes no comércio do óleo de copaíba. Com isso, busca-se desenvolver métodos simples, rápidos, com resultados confiáveis e menor custo para atestar a autenticidade de óleo-resina de copaíba vendida no comércio, garantindo qualidade ao produto que é vendido ao consumidor. Algumas propostas para resolver este problema já foram apresentadas nas últimas décadas, entretanto, ainda são um tanto laboriosas e com resultados não tão confiáveis.

Assim, neste trabalho, a RMN de alta resolução e a RMN no domínio do tempo serão empregadas com o objetivo de solucionar o problema de adulteração, através do desenvolvimento de metodologias para verificar a autenticidade de amostras de copaíba comercial e quantificar o teor de adulterante, quando a mesma for uma amostra adulterada.

A RMN tem se mostrado uma técnica excelente, deixando nos últimos anos de ser aplicada somente a determinação de estruturas químicas, e passando a ser utilizada também no controle de qualidade de produtos e alimentos, principalmente a RMN no domínio do tempo que é uma técnica com menor custo instrumental e custo de análise extremamente baixo, além de possuir análise rápida, simples modo operacional e resposta confiável. Sendo amplamente utilizado nas indústrias nas últimas décadas.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. COPAÍBA

O óleo de copaíba é um óleo resina que é extraído do tronco de árvores do gênero *Copaifera* spp. que são espécies nativas das regiões tropicais da América Latina e África Ocidental. A extração (Figura 1) ocorre através de um furo realizado com ferramenta perfurante, denominada trado, sem danificar a árvore e que permite novas extrações posteriores, bastando selar o furo adequadamente com um tubo de PVC com tampa (HECK; VIANA; VICENTINI, 2012; MORELLI et al., 2015; NAKAMURA et al., 2017).



Figura 1 - Extração do óleo resina do tronco da copaibeira

Fonte: Foto do autor

Existem mais de 72 espécies do gênero *Copaifera* catalogadas, distribuídas pela América Central, grande parte da América do Sul e em algumas regiões da África. No Brasil há cerca de 16 espécies endêmicas encontradas principalmente na região amazônica e no centro-oeste, podendo serem encontradas nas matas de terra firme nos solos argilosos e arenosos, em todos os estados da região. As espécies com maior incidência na Amazônia, são a *C. multijuga* Hayne, *C. reticulata* Ducke e *C. officinalis* (HECK; VIANA; VICENTINI, 2012; MENDONÇA; ONOFRE, 2009; MORELLI et al., 2015; VEIGA; PINTO, 2002).

As copaibeiras são árvores de grande porte e de crescimento lento, alcançam entre 25 a 40 metros de altura e podem viver até 400 anos. O tronco é áspero, de coloração escura, medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro. As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma ou duas sementes ovais, com arilo amarelo intenso. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arranjas em panículos axilares. A floração dessa espécie de copaíba acontece de janeiro a março, os frutos são coletados de março a agosto e no mês anterior à floração ocorre perda parcial das folhas (MENDONÇA; ONOFRE, 2009; VEIGA; PINTO, 2002).

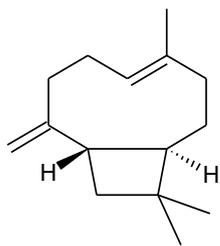
O óleo resina de copaíba é um líquido transparente, viscoso e fluido, com coloração que pode se apresentar desde um amarelo claro à marrom acastanhado, possui sabor amargo e forte odor amadeirado. Quimicamente, é constituído por sesquiterpenos e diterpenos que apresentam variações em suas quantidades mesmo em árvores da mesma espécie. Essas variações influenciam nas características do óleo, como a viscosidade e coloração, e certamente estão relacionadas a espécie, condições ambientais e sazonalidade (DE GALÚCIO et al., 2016; NAKAMURA et al., 2017; PLOWDEN, 2003; TAPPIN et al., 2005; TRINDADE et al., 2013). Portanto, não há parâmetros físicos característicos que tipifiquem o óleo resina de copaíba.

1.2. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE COPAÍBA

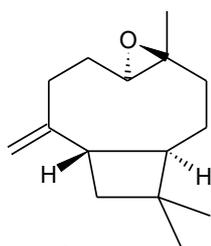
O óleo resina de copaíba é amplamente utilizado na medicina popular, principalmente pelos índios, por apresentar atividades farmacológicas. Diversos estudos demonstraram potencial farmacológico para tratar ou prevenir doenças, como por exemplo, a prevenção da ulceração gástrica, cicatrização de feridas, proteção gastrintestinal na colite, além de ser usado como agente cicatrizante, anti-inflamatório, antibiótico e antinociceptivo, inseticida e outros. Seu uso se dá através da ingestão oral ou pelo uso tópico, onde é aplicado diretamente sobre pele ou ferida (LUCCA et al., 2015; MORELLI et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2015; PASCOAL et al., 2017).

As substâncias majoritárias encontradas no óleo de copaíba, são: β -cariofileno (5 - 62%), óxido de cariofileno (0,2 - 44,3%) α -humuleno (1,3 - 8,7%), germacreno-D (0 - 29,2%), α -copaeno (2 - 14,8%), δ -cadieno (0 - 6,3%), além do ácido copálico (0,5 - 5,1%) que tem sido considerado um biomarcador da espécie, e diterpenos derivados do ácido hardwickiiico e caurenóico (ARRUDA et al., 2019; BARBOSA et al., 2013b; BIAVATTI et al., 2006).

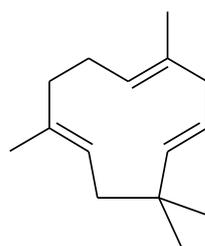
Na Figura 2 encontram-se as estruturas dos principais componentes que podem ser encontrados no óleo resina de copaíba.



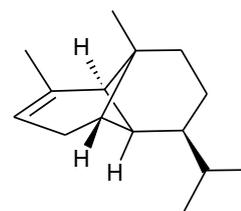
α -cariofileno



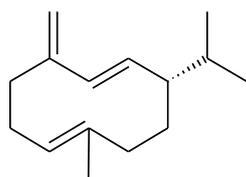
Óxido de cariofileno



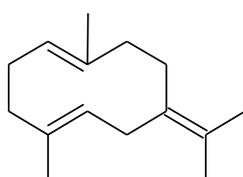
α -humuleno



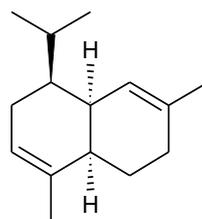
α -copaeno



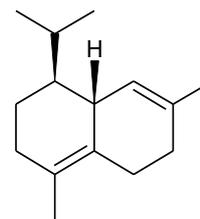
Germacreno D



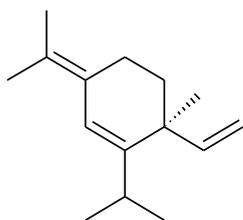
Germacreno B



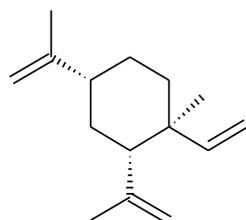
α -cadineno



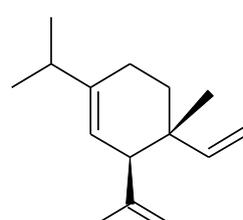
δ -cadineno



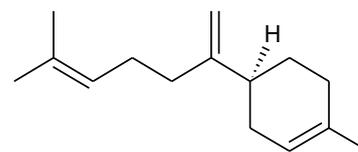
α -elemeno



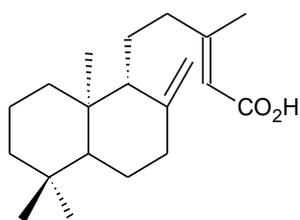
β -elemeno



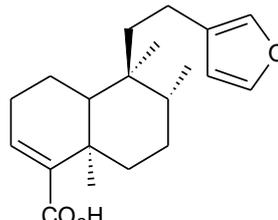
δ -elemeno



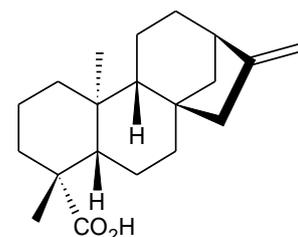
α -bergamoteno



Ácido Copálico



Ácido Hardwckiico



Ácido Caurenóico

Figura 2 - Principais terpenos encontrados no óleo resina de copaíba

1.3. ADULTERAÇÃO DO ÓLEO DE COPAÍBA

No sistema de produção extrativista tradicional utilizado na maioria das regiões amazônicas, há pouca preocupação com as características físicas ou químicas do óleo resina, sendo comum a mistura de óleos de diferentes qualidades e espécies, além de adulteração com outros produtos, como o óleo de soja (RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2004).

O óleo resina de copaíba costuma ser adulterado ao longo de sua cadeia produtiva pelos intermediários na comercialização com produtos de menor valor, com o objetivo maximizar o volume comercializado e obter maior lucro. Contudo, essa adulteração lesa o consumidor que compra o óleo de copaíba objetivando seus benefícios farmacológicos.

A adulteração do óleo resina de copaíba que são comercializados no Brasil é comumente realizada pela adição de substâncias miscíveis que possuem aspecto e densidade semelhantes ao óleo de copaíba, como: o óleo de soja, óleo mineral e/ou outros óleos vegetais com menor valor agregado (VEIGA; PINTO, 2002).

Além disso, devido ao sistema extrativista familiar e a baixa produção, é comum a mistura dos óleos resinas coletadas de diferentes indivíduos e/ou espécies de copaibeiras. Porém, neste caso, não é considerado uma adulteração, apesar da composição química variável das espécies (BARBOSA et al., 2009).

Diante disto, a melhor alternativa para o problema seria ter como identificar se o óleo de copaíba está puro ou adulterado. Atualmente, as técnicas analíticas de cromatografia gasosa e RMN são as melhores formas de identificar presença de adulterantes. No entanto, são técnicas de elevado custo, pois são equipamentos com preços elevados e que requerem o uso de insumos caros (solventes deuterado para RMN e para cromatografia gasosa são necessários: solventes, derivatizantes, gás de arraste ultrapuro e coluna cromatográfica capilar de alta resolução), além de requerer mão de obra qualificada para operação e interpretação dos resultados.

Assim, busca-se formas mais baratas e simples para verificar a autenticidade dos óleos resina de copaíba vendidos comercialmente.

Embora algumas metodologias mais baratas já tenha sido propostas por alguns autores, como por Vasconcelos e Godinho (2002) que sugeriram o uso de titulometria para obter o índice de acidez e índice de éster como um método simples e barato para detectar adulteração em copaíba, conforme as considerações abaixo.

Se o valor do índice de acidez obtido for maior que 80 mg KOH/g a amostra é considerada autêntica, se o valor deste índice for menor que 80 mg KOH/g admite-se tratar de amostra adulterada. Se o índice de acidez for menor que 80 mg KOH/g e o índice de éster maior que 23 mg KOH/g considera-se o adulterante como sendo constituído de óleo graxo. Por outro lado, se o índice de acidez da amostra for menor que 80 mg KOH/g e o índice de éster for menor que 23 mg KOH/g admite-se que o adulterante é constituído de material não saponificável (VASCONCELOS; GODINHO, 2002).

Entretanto, como o estudo foi realizado com apenas com 8 amostras de óleo de copaíba, ou seja, com reduzida variabilidade química amostral, podendo conduzir a resultados falso-positivos, conforme foram demonstrados por Biavatti e colaboradores (2006). Esses autores aplicaram esta metodologia de análise e obtiveram resultados para índice de acidez entre 9,5 a 45,8 mg KOH/g para amostras autênticas e comerciais de óleo de copaíba. Enquanto, Silva e colaboradores (2012) obtiveram índice de acidez de 6,20 a 11,44 mg KOH/g e índice de éster de 48,8 a 116,71 mg KOH/g para 30 amostras autênticas coletadas na Floresta Nacional do Tapajós no estado do Pará. Esses resultados demonstram, portanto, que o método sugerido por Vasconcelos e Godinho não é eficiente para verificar a autenticidade do óleo de copaíba.

Barbosa e colaboradores (2009) sugeriram uma metodologia para verificar autenticidade do óleo de copaíba utilizando CCD (Cromatografia em Camada Delgada) e índice de refração, as 8 amostras puras analisadas apresentaram índice de refração entre 1,5028 a 1,5079 e perfil cromatográfico com manchas menores de cor lilás escura em baixo fator de retenção (R_f) e uma mancha grande e arredonda em R_f elevado. Para as 12 amostras comerciais analisadas foram obtidos índice de refração entre 1,4818 a 1,5089 e perfil cromatográfico com manchas azuis sobrepostas em R_f baixo e um mancha grande e alongada em R_f alto, além de uma mancha alongada e incolor em R_f intermediário. Das 12 amostras comerciais, três

apresentaram perfil cromatográfico similar as amostras puras. Contudo, as amostras comerciais não foram analisadas por uma técnica mais confiável, como a cromatografia gasosa, para atestar sua autenticidade. Entretanto, a metodologia por CCD aparenta ter bom potencial para verificar qualitativamente a autenticidade do óleo de copaíba, no entanto um conjunto mais abrangente de amostras deveria ser testada.

Moreira e colaboradores (2018) desenvolveram um modelo de calibração multivariada utilizando espectroscopia por infravermelho próximo (NIR, do inglês Near Infrared Spectroscopy) e regressão PLS (PLSR) em um conjunto de amostras de óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) com adulteração controlada com óleo de soja. Como resultado, foram obtidos para o modelo PLS um $R^2 = 0,991$, erro de predição RMSEP igual a 1,5% e erro de predição relativo REP $\leq 2\%$. Sendo considerado pelo autor um bom modelo para predizer o teor de adulterante em amostras de óleo de copaíba. Entretanto, o modelo foi construído apenas com amostras com teor de adulteração acima de 50%, e nenhuma amostra com teor abaixo disso foi testada, limitando o estudo. De certa forma, este modelo acaba sendo pouco eficiente, já que esse teor de adulterante indica uma adulteração grosseira. Com isso, o uso da técnica de Ressonância Magnética Nuclear surge como alternativa no controle de qualidade de amostras líquidas e complexas.

Assim, a RMN de alta resolução é bastante eficiente na identificação e na quantificação de adulterante do tipo triacilglicerídeos (TAGs), conforme será discutido nos resultados deste trabalho.

E de forma a diminuir os custos, o uso do RMN-DT será investigado, uma vez que é um equipamento de custo moderado, as análises são obtidas de forma rápida, sem destruição da amostra e com menor custo, quando comparado a cromatografia gasosa e a RMN de alta resolução, pois não é necessário o uso de insumos caros e nenhum preparo da amostra. Por exemplo, utilizando a RMN-DT, Santos e colaboradores (2017) conseguiram identificar a presença de adulteração com óleo de soja em amostras de azeite de oliva, mesmo em garrafas seladas comercializadas como “extra virgem”. Portanto, foi possível a partir deste método verificar que os produtos vendidos como puros são na verdade adulterados com óleo de soja.

Barbosa e colaboradores (2013) conseguiram prever propriedades físicas, como a viscosidade cinemática e grau API de amostras de petróleo através do uso da RMN-DT utilizando a sequência CPMG e ferramentas quimiométricas (PCA, HCA e LDA) que permitiram correlacionar e identificar as amostras de acordo com a camada do reservatório que deu origem a amostra, podendo ser pré ou pós sal, e sua qualidade relacionada. Esses resultados mostraram potencial para obter uma assinatura química dos óleos de diferentes campos e reservatórios, permitindo decidir qual poço é mais satisfatório a extração uma vez que petróleo de grau API médio são de maior interesse para empresas petrolíferas, pois representam um petróleo de melhor qualidade.

Os estudos acima demonstram o potencial da técnica de RMN-DT aplicado no controle de qualidade dos produtos oleaginosos vendidos ao consumidor e petrolíferos de maior interesse para empresas do ramo dos combustíveis fósseis, que também chega ao consumidor final com mais qualidade

1.4. REGULAMENTAÇÃO

Para que novos fármacos possam circular no Brasil é necessária a solicitação de registro junto a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) pela empresa interessada em comercializar o produto. Entretanto, é necessário que uma série de critérios estabelecidos em leis e à regulamentação específica sejam obedecidas para comprovar a qualidade e eficácia do produto com o objetivo de minimizar eventuais riscos associados ao produto. A resolução da ANVISA, RDC N°26 (2014) é que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.

Contudo, no Brasil não há registros ou regulamentação vigentes pela ANVISA para o óleo resina de copaíba em decorrência da sua variabilidade química intra- e inter-específica, que dificulta o controle de qualidade em relação a sua padronização química (VEIGA; PINTO, 2002; YAMAGUCHI; GARCIA, 2012).

Embora, não tenha sido aprovado no Brasil, o óleo de copaíba foi aprovado no Estados Unidos da América (EUA) em 1972 pela FDA (Food and Drug Administration), órgão de regulamentação de drogas e alimentos do governo americano (VEIGA; PINTO, 2002; YAMAGUCHI; GARCIA, 2012).

Ainda assim, apesar de não possuir registro na ANVISA, a *Copaifera ssp.* faz parte da lista do RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse do SUS) que incluem espécies vegetais com potencial de avançar nas diversas fases das pesquisas e gerar produtos de grande interesse do Ministério da Saúde em nosso país (LIMA et al., 2012).

2. MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NA ANÁLISE DE ÓLEO DE COPAÍBA

Dentre os diversos métodos analíticos que podem ser empregados na análise do óleo resina de copaíba, a Cromatografia Gasosa certamente é o mais empregado, pois apesar de ser destrutiva, requer pouca amostra, possui elevada resolução cromatográfica e boa reprodutibilidade, contudo, é bastante demorada e no caso de amostras pouco voláteis, como os diterpenos, a técnica se torna dependente de um processo de derivatização eficiente para detectar os analitos presentes, para que os mesmos não fiquem retidos na coluna cromatográfica.

Já a RMN de alta resolução fornece informações sobre a estrutura molecular dos componentes presentes na amostra, porém, em amostras complexas que possuem diversos componentes, como o óleo de copaíba, por exemplo, a identificação de todos os componentes se torna difícil e bastante laboriosa. No entanto, apenas para identificar a presença de adulterantes, como o óleo de soja e óleo mineral, através do uso do espectro de RMN de ^1H como um *fingerprint* das amostras é uma excelente técnica, conforme poderá ser visto nos resultados. Entretanto, a necessidade de utilizar solvente deuterado para a análise e o consumo de criogênicos para o funcionamento do equipamento a torna uma técnica bastante cara.

Com a espectroscopia NIR é possível obter algumas informações de sobre grupos funcionais da amostra através da presença de estiramentos e sobretons de ligações C-H, C-C, C-O e C-N, contudo geralmente essa técnica é voltada ao controle de qualidade, sendo utilizada como fingerprint e geralmente associada a ferramentas de análise multivariada e calibração multivariada para obter parâmetros de qualidade da amostra. No entanto, devido a leitura ser realizada sobre a superfície da amostra, a reprodutibilidade e repetibilidade do método sofre bastante flutuações na análise de uma mesma amostra.

2.1. CROMATOGRAFIA GASOSA

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica físico-química de separação baseada na diferença de distribuição de espécies de uma mistura entre duas fases não miscíveis, na qual a fase móvel é um gás de arraste que se move através da fase estacionária contida em uma coluna (BRASIL, 2010).

Para que os analitos sejam analisados por CG, eles devem ser capazes de passarem para o estado gasoso (vaporização) sem que ocorra sua degradação nas temperaturas empregadas para a análise. A separação é baseada nos mecanismos de adsorção e dessorção, distribuição de massa ou exclusão por tamanho, sobre a fase estacionária. A maneira como os analitos interagem com a fase estacionária é que determina um menor ou maior tempo de retenção, permitindo assim, separar os componentes de uma amostra (BRASIL, 2010; SKOOG, 2008).

Esta técnica é bastante utilizada para identificação, teste de pureza e determinação quantitativa dos analitos, e tem sido bastante empregada para caracterização química do óleo de copaíba e para verificar sua autenticidade. Embora seja uma técnica destrutiva, utiliza-se pouca amostra, entretanto, possui custo de análise elevado, pois utiliza insumos caros (gás de arraste, solventes, derivatizantes) e necessita de mão de obra especializada para operar o equipamento.

O equipamento consiste em uma fonte de gás de arraste, um controlador de fluxo, uma câmara de injeção, uma coluna cromatográfica contida em um forno, um detector e um sistema de aquisição de dados (computador). O gás de arraste – geralmente, hidrogênio ou hélio de alta pureza – circula através da coluna com fluxo e pressão controlados levando os analitos até o detector. O injetor, a coluna e o detector apresentam temperatura controlada, que pode ser constante ou variável, utilizando um programa de temperatura adequado durante a corrida, para que ocorra a melhor separação dos analitos (BRASIL, 2010; SKOOG, 2008). Os compostos eluem separadamente da coluna e passam pelo detector onde o registro é realizado em função do tempo de retenção, gerando um cromatograma, que consiste de uma série de picos no eixo do tempo. Cada pico representa um composto da mistura vaporizada, embora alguns picos possam sair sobrepostos. O tempo de eluição é

característico de um componente individual e sua área pode estar relacionada a quantidade do analito na amostra (BRASIL, 2010).

Contudo, a cromatografia é um método que requer algum tipo de detector integrado, a fim de maximizar a resposta analítica. Dentre os principais detectores hifenados a Cromatografia Gasosa, destaca-se os detectores por Ionização em Chama (DIC) e por Espectrometria de Massas (EM).

2.1.1. DETECTOR POR IONIZAÇÃO DE CHAMA

O detector por ionização de chama (DIC) é o mais utilizado na cromatografia gasosa em geral, pois possui alta sensibilidade e resposta quase universal. O analito após ser separado pela coluna cromatográfica é dirigido para uma pequena chama de ar/hidrogênio, onde ocorre a ionização dos analitos em íons e elétrons que são detectados em função do monitoramento de corrente emitidos por estes através de um eletrodo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997; SKOOG, 2008).

A quantidade de íons formados quando a amostra está presente no gás arraste é muito maior que a quantidade formada quando somente o gás de arraste está sendo queimado. A corrente gerada é convertida em voltagem, amplificada e captada pelo registrador, com magnitude do sinal proporcional ao número de átomos de carbono na molécula (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

2.1.2. DETECTOR POR ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

É também um dos detectores mais utilizado para a cromatografia gasosa, mede a razão massa/carga (m/z) de íons que são produzidos pela amostra. No espectrômetro de massas, as moléculas da amostra entram em uma fonte de ionização que ioniza a amostra, esta fonte é energética o suficiente para quebrar as ligações químicas das moléculas da amostra, mas não suficientemente energéticas para decompor as moléculas da amostra em seus átomos constituintes, portanto produzem fragmentos denominados íons moleculares, íons de fragmentos e moléculas não-ionizadas (SKOOG, 2008).

Esses fragmentos passam pelo analisador que serve para selecionar os íons de acordo com seus valores m/z , assim como na espectrometria de massas atômicas. Os íons separados são então detectados e um gráfico contendo a intensidade do sinal gerado pelo íon *versus* m/z é produzido pelo sistema de dados. Através da razão massa/carga dos fragmentos é possível identificar qual é o analito. Geralmente utiliza-se bibliotecas de dados de massas para essa identificação. (SKOOG, 2008)

2.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)

Existe na literatura uma grande variedade de trabalhos nos quais a espectrometria na região do infravermelho próximo (NIR) é utilizada para o controle de qualidade nos mais diversos produtos e áreas de aplicação, como em química de alimentos, farmácia, bioquímica, química do petróleo, síntese orgânica, entre outras, de forma obter soluções em relação ao controle de qualidade (LACERDA JR., 2018).

O infravermelho próximo (NIR) compreende uma faixa aproximada que vai de 780 até 2500 nm ($12.800 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$) e os espectros de NIR são obtidos como bandas relativamente largas e fracas, como resultado de sobretons e bandas de combinação das transições vibracionais fundamentais associadas basicamente com grupos funcionais C-H, N-H, S-H e O-H. O uso de NIR associada a ferramentas quimiométricas, permite a obtenção de informações relevantes, como propriedades físico-químicas das amostras (KUMARAVELU; GOPAL, 2015; LACERDA JR., 2018; TEYE; HUANG; AFOAKWA, 2013).

Esta é uma técnica não invasiva, não destrutiva, de baixo custo e que requer mínima ou nenhuma preparação da amostra. Amostras sólidas podem ser medidas diretamente com pouco pré-tratamento, ou mesmo sem tratamento, caso se utilize um dispositivo apropriado. Contudo, espectroscopia NIR é uma metodologia relativa, e portanto, geralmente empregada para construir modelos, principalmente utilizando regressão PLS (*Partial Least Square*), onde é necessário conhecimento prévio do valor de um parâmetro alvo, que deve ser previamente determinado usando um método de referência já conhecido e confiável (KUMARAVELU; GOPAL, 2015).

2.3. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR – RMN

O fenômeno de Ressonância Magnética Nuclear é observado quando certos núcleos atômicos que possuem momento angular (L) e momento magnético (μ) diferentes de zero, como por exemplo o ^1H , ^{13}C , ^{19}F , são submetidos a um campo magnético estático, denominado B_0 , e a um campo magnético oscilante, denominado B_1 (GÜNTHER, 2013; LACERDA JR., 2018).

Quando os spins desses núcleos não estão na presença de um campo magnético, suas direções são aleatórias (Figura 3, $B_0 = 0$). Ao serem submetidos a um campo B_0 , os spins orientam-se a favor e contra ao campo magnético (Figura 3, $B_0 > 0$) e passam a precessionar¹ com uma frequência angular denominada frequência de Larmor (Equação 1). A frequência de precessão é proporcional ao campo magnético (B_0) e à razão magnetogírica (γ), que é uma constante intrínseca de cada núcleo (COLNAGO; ANDRADE, 2010; LACERDA JR., 2018).

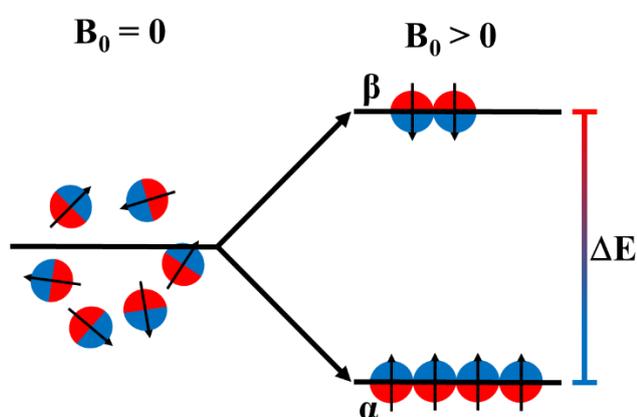


Figura 3 - Orientação dos spins na ausência ou presença de campo magnético externo

Fonte: adaptado pelo autor

¹ fenômeno que consiste na mudança do eixo de rotação, movimento similar à de um peão

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad \text{ou} \quad \nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad \text{Equação 1}$$

O efeito de B_0 sobre momento magnético (μ) dos núcleos também dá origem a uma magnetização resultante M_0 , que correspondente ao somatório dos momentos magnéticos no eixo z. O sinal de RMN é obtido quando é aplicado um campo B_1 perpendicular a B_0 na forma de um pulso de radiofrequência, que faz com que a magnetização M_0 , que estava na direção do campo B_0 (eixo z), gire um ângulo θ (comumente 90° ou 180° , dependendo da sequência utilizada) em direção aos eixos x' e y' , onde os spins entram em fase, originando as componentes M_{xy} (Figura 4), que após o pulso, voltam a precessionar em torno de B_0 e induz um sinal na bobina da sonda, denominado de FID (decaimento livre da indução, do inglês free induction decay). Ou seja, o fenômeno de RMN ocorre quando núcleos alinhados com um campo aplicado são induzidos a absorver energia e a mudar a orientação de *spin* em relação ao campo aplicado (COLNAGO; ANDRADE, 2010; ROBERT M. SILVERSTEIN FRANCIS X. WEBSTER; KIEMLE, 2005).

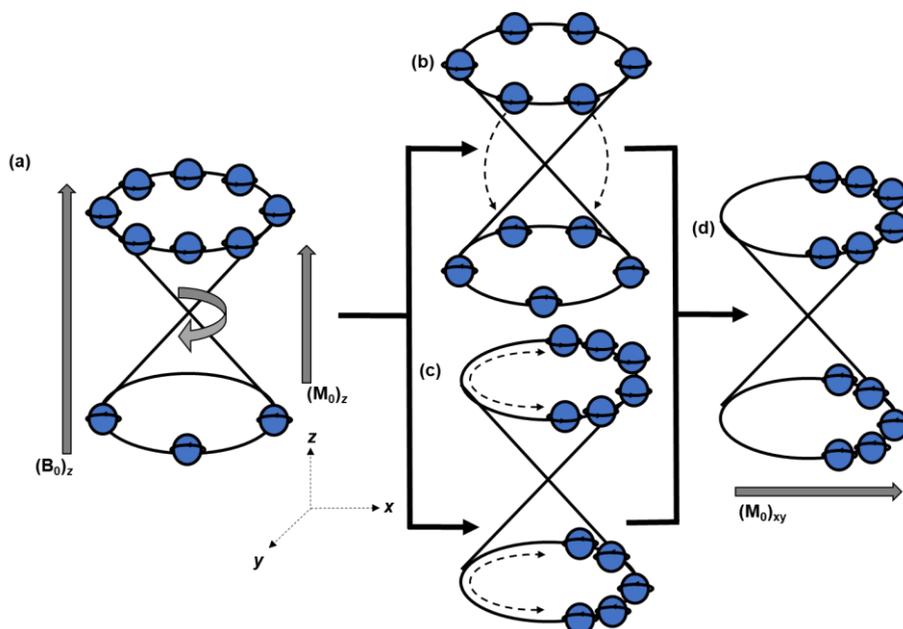


Figura 4 - Representação esquemática da magnetização dos spins: **a)** aplicação do campo magnético B_0 ; **b)** e **c)** magnetização resultante M_0 , ocorrendo dois efeitos: b) deslocamento de spins de estado de menor energia para estado de maior energia e **c)** spins entrando em fase; **d)** todos os spins do sistema alinhados no plano $x'y'$.

Quando o campo de radiofrequência B_1 é desativado, a magnetização M_0 diminui e o sistema gradualmente retorna ao equilíbrio (Figura 5). Durante esse processo, os prótons perdem gradualmente sua energia extra e retornam ao equilíbrio emitindo ondas de rádio e transferindo energia para as moléculas vizinhas. Os processos pelos quais os núcleos transferem energia para o ambiente para retornar ao estado de equilíbrio são chamados de relaxação.

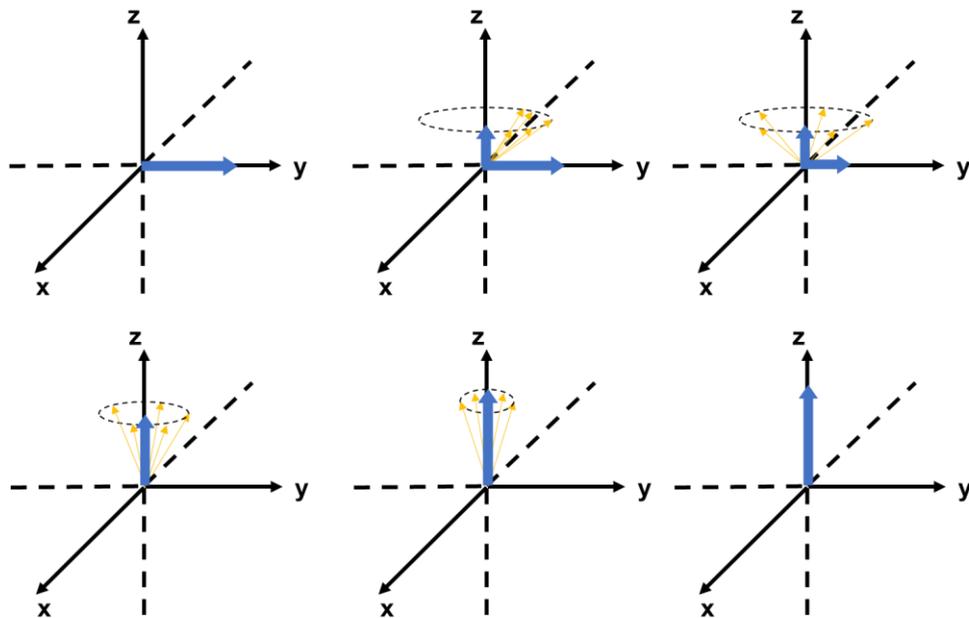


Figura 5 - Retorno do vetor magnetização M_0 ao equilíbrio através do fenômeno de precessão, após aplicação de pulso de 90°

Os processos de relaxação são exponenciais e são descritos por duas constantes de tempo: por T_1 (constante de tempo de relaxação magnético longitudinal) e T_2 (constante de tempo de relaxação magnético transversal). Esses dois valores raramente são iguais, a relaxação transversal quase sempre é mais rápida que a relaxação longitudinal, ou seja, geralmente T_2 é menor que T_1 . Em geral, para prótons

em amostras sólidas, T_2 é muito menor que T_1 (KANTZAS; JONATHAN BRYAN; TAHERI, 2018).

Em relação às suas aplicações para o controle de qualidade, a RMN pode ser dividida em duas classes: RMN de alta resolução ou alto campo ou ainda no domínio da frequência e a RMN de baixo campo ou baixa resolução, ou ainda RMN no domínio do tempo (RMN-DT).

1. RMN em alta resolução ou alto campo – é utilizada principalmente para elucidação estrutural de moléculas, pois permite observar as pequenas diferenças de frequência de ressonância entre núcleos de um mesmo isótopo, quando expostos a ambientes magnéticos distintos, produzidos pelos seus próprios ambientes químicos. Essa modalidade utiliza a transformada de Fourier para converter o sinal de RMN no domínio do tempo (FID) em espectros no domínio da frequência, possibilitando discriminar os núcleos de acordo com sua localização na estrutura da molécula. Quanto maior a intensidade do campo magnético maior a resolução espectral e a sensibilidade dos experimentos. Este tipo de RMN emprega magnetos supercondutores que variam de 4,7 a 22,4 teslas (frequência de 200 a 950 MHz para o núcleo ^1H) com campo magnético constante e altamente homogêneo. Porém, possui como desvantagens os elevados custos de manutenção necessitando de refrigeração com criogênicos, como o hélio e nitrogênio líquidos.

2. RMN em baixa resolução, baixo campo, ou no domínio do tempo – tem sido bastante aplicada em processos de controle de qualidade nas diversas áreas da indústria. Os experimentos de RMN em baixo campo baseiam-se principalmente no registro da amplitude do sinal no domínio do tempo (FID ou eco), ou na medição dos tempos de relaxação magnética (T_1 e T_2) e difusão molecular. Geralmente utiliza-se magnetos permanentes com campo magnético inferior a 2,1 Teslas (90 MHz), e possui baixa homogeneidade de campo quando comparado aos usados em equipamentos de alta resolução.

A RMN em baixo campo é uma técnica simples, rápida, não destrutiva, não invasiva e livre de resíduos. A grande vantagem desta técnica é permitir a análise de amostras brutas exigindo mínima ou nenhuma preparação, ao contrário da RMN de alta resolução, em que normalmente a amostra deve ser diluída em um solvente

deuterado apropriado. Além disso, o baixo custo, a robustez, a facilidade operacional e da interpretação dos resultados, vêm fazendo com que as indústrias e laboratórios de pesquisa substituam, total ou parcialmente, as técnicas convencionais (extrativas, gravimétricas, titulométricas, etc.) pela RMN em baixo campo (LACERDA JR., 2018).

Em relação a caracterização química das amostras, dentre as técnicas apresentadas, somente a espectrometria de massas (CG-EM) e RMN de alta resolução permitem caracterizar a composição química, já a espectroscopia NIR permite obter apenas algumas informações sobre grupos funcionais caso estejam presentes. Contudo, com a RMN de baixa resolução essa caracterização não é possível, sendo está, uma desvantagem da técnica.

A RMN de alta resolução também pode ser usada de maneira quantitativa através do ERETIC2 (*Electronic to Access In Vivo Concentration*) que é uma ferramenta de quantificação incluído no software TopSpin da Bruker, que se baseia no método PULCON (WIDER; DREIER, 2006) que correlaciona a intensidade absoluta de dois espectros diferentes, levando em conta o princípio da reciprocidade que diz que os comprimentos de pulso 90° ou 360° são inversamente proporcional a intensidade do sinal. Portanto, sabendo exatamente a concentração de uma amostra de referência, e desde que o pulso de 90° seja calibrado corretamente para as duas amostras, referência e desconhecida, é possível descobrir a concentração da amostra desconhecida.

O ERETIC2 pode ser utilizado com padrão interno ou externo. Sendo apenas necessário calibrar corretamente o pulso (90°) do sinal de interesse. Além disso, este sinal de ser livre de coalescência, possuir alto relação sinal/ruído (SNR) e é necessário esperar um tempo de relaxação de pelo menos $5T_1$ entre as aquisições (TYBURN; COUTANT, 2016).

O tempo de espera de $5T_1$ entre os scans é necessário para permitir a recuperação do máximo de magnetização (M_z) ao equilíbrio inicial (M_z^0), assim ao esperar $5T_1$, mais de 99% já terá retornado ao equilíbrio inicial. (Figura 6)

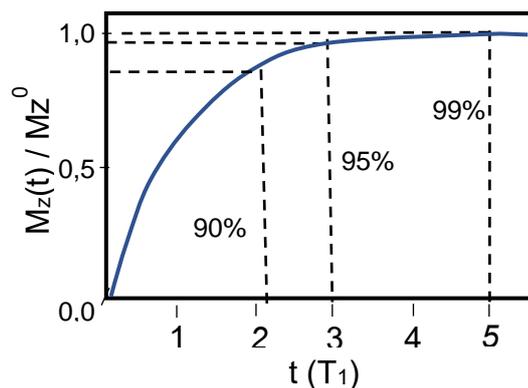


Figura 6 - Recuperação da Magnetização (M_z) ao equilíbrio inicial (M_z^0)

Fonte: adaptado pelo autor a partir de KEELER, 2005

2.4. SEQUÊNCIAS DE PULSOS PARA RMN-DT

As sequências de pulsos são utilizadas na RMN para obter informações provenientes da amostra que estão intrinsecamente ligados aos núcleos presentes. Elas que permitem excitar as amostras, com o objetivo de mensurar o tempo de relaxação longitudinal (T_1) e/ou relaxação transversal (T_2).

Cada sequência de pulso permite obter o valor de relaxação T_1 ou T_2 , ou ainda, T_1 e T_2 simultaneamente. A escolha da sequência adequada varia conforme a necessidade da análise, e, principalmente em função do tempo de aquisição e da relação sinal/ruído.

Abaixo serão apresentadas algumas das principais sequências utilizadas em RMN-DT e dentre estas as que foram aplicadas neste trabalho, a SAFF e CPMG.

2.4.1. IR (Inversão Recuperação)

A sequência de inversão recuperação (IR) (Figura 7a) permite medir o tempo de relação longitudinal (T_1) das amostras, este valor está totalmente relacionado ao retorno da magnetização ao equilíbrio.

Nesta sequência um pulso de inversão (180°) é aplicado, levando a magnetização M_0 que originalmente estava no eixo $+z$ ao eixo $-z$. Após a inversão, espera-se um tempo τ_n , seguido de um pulso de excitação (90°) seguido da obtenção

do FID. Esse experimento é realizado por diversos valores de tempo tau (τ) que é variado com valores bem curtos e que aumentam exponencial, sendo sempre $\tau_n \ll T_1$ (Figura 7b). A intensidade do sinal é totalmente negativa após o pulso de inversão e torna-se exponencialmente crescente a cada repetição com a variação do tempo τ (Figura 7c). O valor de T_1 corresponde ao retorno de 63% da magnetização M_z ao equilíbrio (GÜNTHER, 2013; MORAES; COLNAGO, 2014).

Como esta sequência requer um tempo de espera de pelo menos $5T_1$ entre cada repetição, de forma a recuperar cerca de 99% da magnetização ao equilíbrio (BAKHMUTOV, 2004), esta sequência torna-se bastante demorada quando a amostra possui valor de T_1 elevado. No entanto, esta é a sequência de referência para se obter o valor de relaxação longitudinal T_1 .

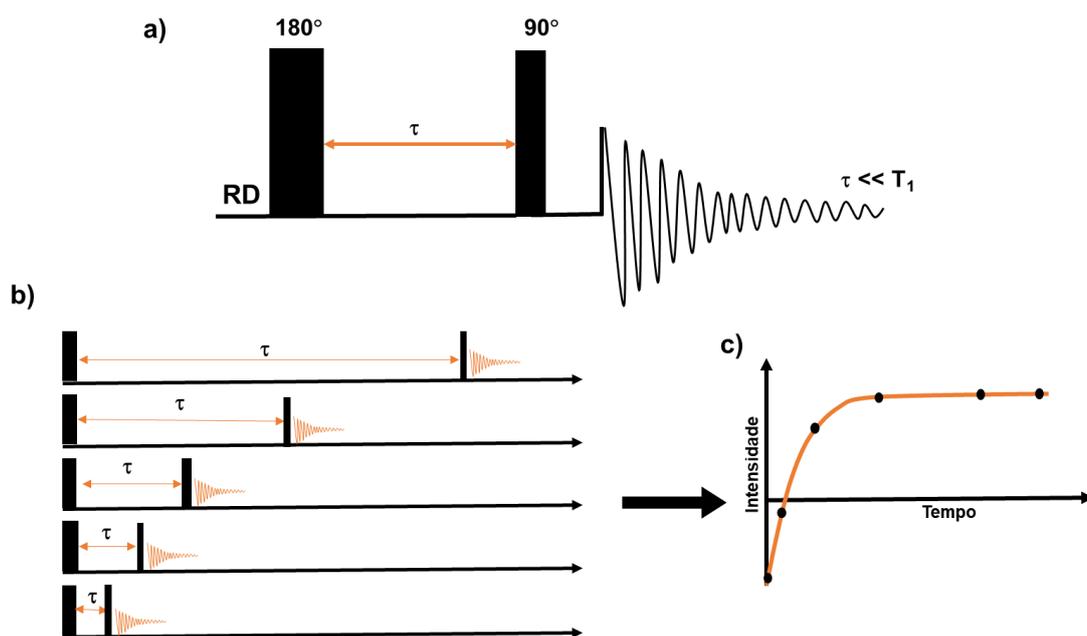


Figura 7 - **a)** sequência Inversão Recuperação (IR); **b)** repetições da sequência IR com aumento do tempo de espera τ ; **c)** sinal exponencial obtido pela sequência IR

Fonte: adaptado pelo autor a partir de BAKHMUTOV, 2013 e TELKKI, 2018

2.4.2. CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill)

Para obter o valor de relaxação longitudinal (T_2), usualmente utiliza-se a sequência de pulso denominada CPMG, que foi aprimorada a partir da sequência de pulso FID-ECO ($90_x^\circ - \tau - 180_x^\circ$), com o objetivo de minimizar ou eliminar o problema de difusão e acelerar a medida de T_2 . Para isso Carr e Purcell propuseram uma sequência de pulsos chamada CP, onde aplicaram um trem de pulsos de 180° após um tempo τ (tau) da aplicação do pulso de 90° (CARR; PURCELL, 1954).

Esse trem de pulsos de 180°_x separados por dois tempos τ permite gerar um eco entre esses pulsos de 180° , até o completo desaparecimento do sinal. Isto permitiu que todo o decaimento do sinal de RMN fosse adquirido (ecos) em uma única sequência de pulsos. Assim, o método CP economiza tempo, pois permite obter os ecos necessários para a medida de T_2 em uma única medida, e não é mais necessário esperar um tempo de $5T_1$ entre cada eco (COLNAGO; ANDRADE, 2010).

Ainda assim, Meiboom e Gill (1958) modificaram a sequência CP aplicando agora, os pulsos de 180° no eixo y' (180_y°), ou seja, com uma diferença de fase de 90° em relação ao pulso de 90_x° inicial, assim, além de eliminar o problema de erros na calibração dos pulsos de 180° , também faz com que todos os ecos possuam uma mesma fase, o que não ocorre com o método CP. Essa nova sequência passou a ser chamada de CPMG e está ilustrada na Figura 8 (COLNAGO; ANDRADE, 2010; GÜNTHER, 2013; MEIBOOM; GILL, 1958).

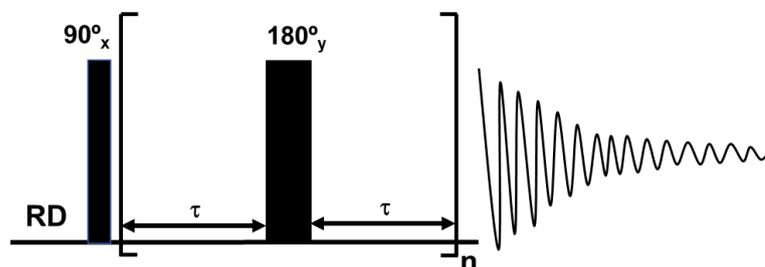


Figura 8 - Sequência de pulso CPMG

Fonte: adaptado pelo autor a partir de ZERBE; JURT, 2014

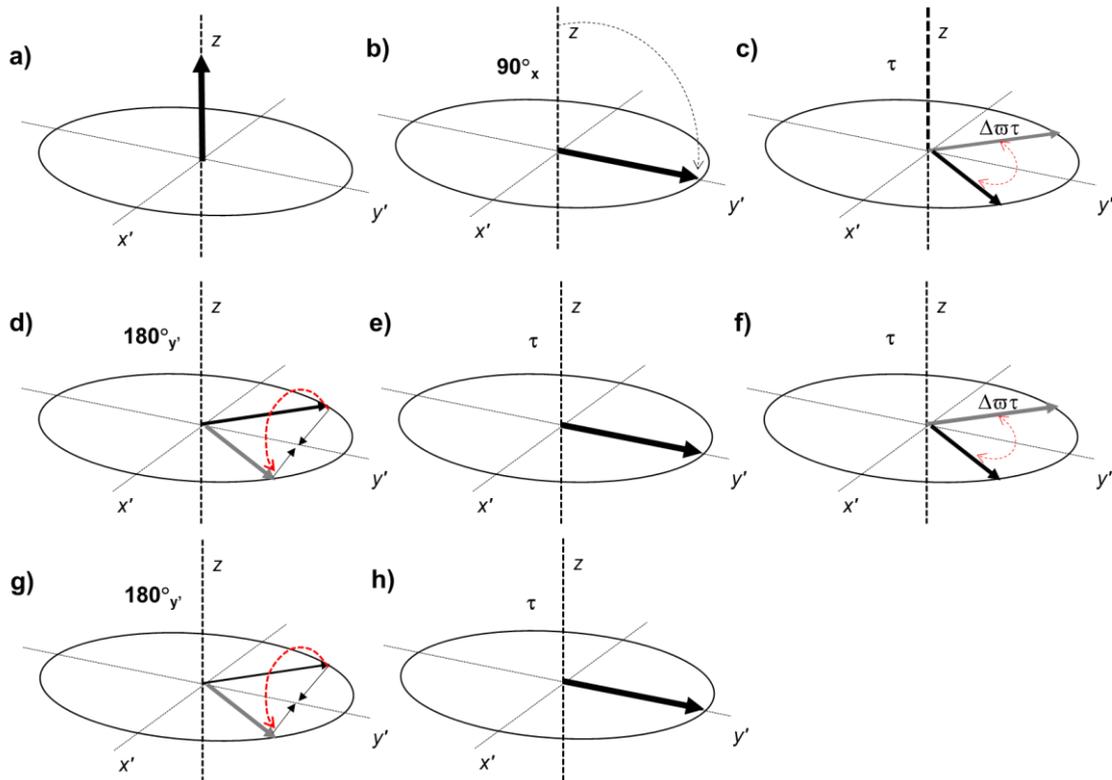


Figura 9 - Representação vetorial da evolução temporal da magnetização da sequência de pulso CPMG

Fonte: Adaptador pelo autor a partir de COLNAGO; ANDRADE, 2010

A Figura 9 descreve a evolução da magnetização durante a CPMG: **(A)** estado de equilíbrio térmico **(B)** aplicação do pulso de 90° até o plano $x'y'$. **(C)** durante o tempo τ , as isocromatas de spins (cinza e preta) se defasam devido à não homogeneidade de campo. **(D)** um pulso de 180° aplicado em $-y'$ gira as componentes no plano $x'y'$, invertendo a direção dos dois vetores. **(E)** como eles mantêm o mesmo sentido de rotação, eles se reencontram (são refocalizados) no eixo y' , após um tempo 2τ , a partir do primeiro pulso. Após isso, **(F)** ocorre outra defasagem em outro tempo τ , **(G)** um segundo pulso de $180^\circ_{y'}$, gira novamente a magnetização e **(H)** obtém-se um sinal de eco em um tempo de 4τ . Esse procedimento de defasagem e refocalização com pulsos de 180° ocorre até o desaparecimento completo do sinal em função de T_2 (COLNAGO; ANDRADE, 2010).

Pela capacidade do método CPMG de suprimir os efeitos da falta de homogeneidade do campo magnético, ele oferece a maneira mais rápida e robusta de registrar um sinal de decaimento exponencial com uma alta SNR (CISTOLA; ROBINSON, 2016).

A CPMG costuma ser utilizada como método padrão para a medida de T_2 , e é largamente usada para análises qualitativas e quantitativas por RMN-DT, como por exemplo, na avaliação e controle da qualidade de alimentos, petróleo, produtos agrícolas, etc (COLNAGO; ANDRADE, 2010).

Essas análises são baseadas, principalmente, nas diferenças entre os tempos de relaxação transversal (T_2), dos vários componentes da amostra. Os sinais obtidos pelo CPMG podem ser tratados através de ajuste mono ou multiexponencial para obter os valores de relaxação da amostra, e podem também, ser analisados pela transformada inversa de Laplace (ILT) e/ou por métodos quimiométricos.

2.4.3. CP-CWFP_{x-x}

A sequência de pulso chamada CP-CWFP (*Carr-Purcell-Continuous Wave Free Precession*) permite obter os valores de relaxação longitudinal (T_1) e relaxação transversal (T_2) simultaneamente, do mesmo modo que as sequências IR e CPMG separadas, porém com a vantagem de obter valores de relaxação T_1 e T_2 com duração de experimento similar ao da CPMG. Esta é uma sequência aprimorada a partir da CWFP (*Continuous Wave Free Precession*) (VENÂNCIO et al., 2005).

A CWFP é uma sequência que atinge o regime de Precessão Livre no Estado Estacionário (SSFP, do inglês *Steady State Free Precession*) estado que é obtido quando é aplicado um trem de pulsos de radiofrequência, separado por um intervalo de tempo, T_p , menor que o tempo de relaxação transversal efetivo (T_2^*) da amostra. Além disso, a amplitude do sinal na CWFP não depende de T_1 , como nas sequências de IR, Spin-Eco e CPMG. Isso permite que o valor de T_p seja o mais curto possível, possibilitando dezenas de *scans* por segundo, o que melhora bastante a SNR da amostra (BUENO MORAES; MONARETTO; COLNAGO, 2019).

A diferença entre a CWFP e CP-CWFP se dá apenas pela aplicação de um pulso de 90°_x e um tempo de espera de $T_p/2$ antes do trem de pulso da sequência CWFP. No entanto, estas são sequências que devem ser utilizadas com ajuste de *offset* de frequência de modo a obter intensidade de sinal, porém, foi verificado que ao utilizar alternância de fases entre cada pulso, essa necessidade é perdida. Assim, surge a CP-CWFP_{x-x} que é aplicada sem *offset* da frequência de ressonância (COLNAGO et al., 2015; MONARETTO et al., 2015).

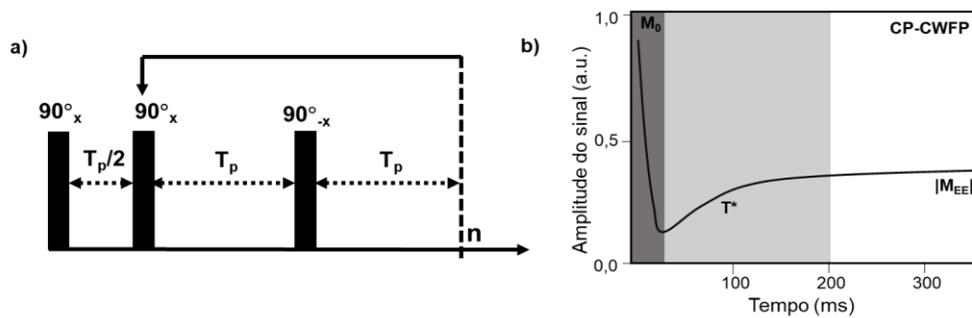


Figura 10 - a) Sequência de pulso CP-CWFP_{x-x} e b) composição do sinal obtido por CP-CWFP_{x-x}

Fonte: Adaptador pelo autor a partir de COLNAGO et al., 2015

Os valores de relaxação T_1 e T_2 provenientes da CP-CWFP_{x-x} são obtidos pela equação 2, a partir dos valores da magnetização M_0 , do ajuste exponencial do decaimento T^* e da constante do estado estacionário $|M_{EE}|$ adquiridos do sinal CP-CWFP_{x-x}, conforme a Figura 10b.

$$T_1 = \frac{\frac{T^*}{2}}{\frac{|M_{EE}|}{M_0}} \quad e \quad T_2 = \frac{\frac{T^*}{2}}{\left(1 - \frac{|M_{EE}|}{M_0}\right)} \quad \text{Equação 2}$$

2.4.4. CWFP-T1

O uso de valores de relaxação longitudinal (T_1) não costumavam ser muito empregados devido ao longo tempo de experimento (como por exemplo, a sequência IR), porém, com a chegada das sequências de medição única (*one shot*), como a CWFP, foi possível obter o valor de relaxação T_1 e T_2 da amostra de forma mais rápida. Contudo, essas sequências só são aplicáveis a instrumentos com tempo morto curto, pois a magnitude do sinal no equilíbrio inicial/térmico (M_0) é necessária para obter os valores de relaxação.

No entanto, Moraes e colaboradores (2016) demonstraram que é possível obter o valor de relaxação T_1 de maneira simples, rápida e independente do tempo morto dos instrumentos, a partir da utilização de baixo ângulo de inclinação. Essa sequência de pulso foi denominada de CWFP- T_1 .

Esta sequência é baseada na sequência com alternância de fase CP-CWFP $_{x-x}$. Contudo, inicia-se com aplicação de um pulso de 180°_x seguido de um tempo de espera $T_p/2$ e de um trem de pulsos utilizando pequenos ângulos (θ), entre 5° e 10° , utilizando alternância de fase, e separados por um tempo de espera T_p , conforme pode ser observado na Figura 11.

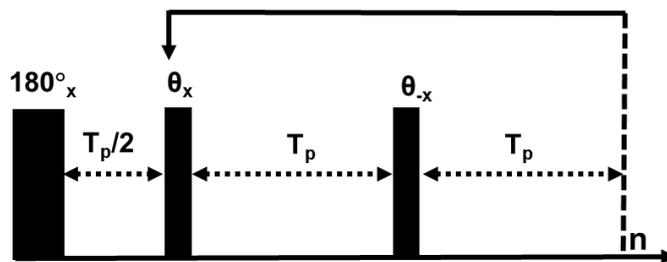


Figura 11 - Sequência de pulso CWFP-T1

Fonte: Adaptado pelo autor a partir de MORAES; MONARETTO; COLNAGO, 2016

Assim, essa sequência possibilita obter o valor de relaxação T_1 de forma rápida e precisa, em apenas uma única medida, podendo ser utilizada em análises qualitativas e quantitativas, principalmente em situações que a medida de T_1 da amostra é fator determinante para análise.

2.4.5. SAFF

A sequência de pulso SAFF (do inglês, *small angle flip-flop*), Figura 12, desenvolvida por Cucinelli e colaboradores (2019), surgiu como uma alternativa para obter valores de relaxação longitudinal (T_1) de forma mais rápida quando comparado ao uso da sequência tradicional, Inversão-Recuperação, podendo ser utilizada tanto para amostras sólidas quanto líquidas. Esta sequência de pulso obedece aos princípios do estado estacionário e da conservação da magnetização, isso possibilita que não seja necessário o tempo de espera de $5T_1$ entre as aquisições, além de ser uma sequência *oneshot*, similar a CWFP- T_1 , onde é possível obter T_1 com uma única aquisição.

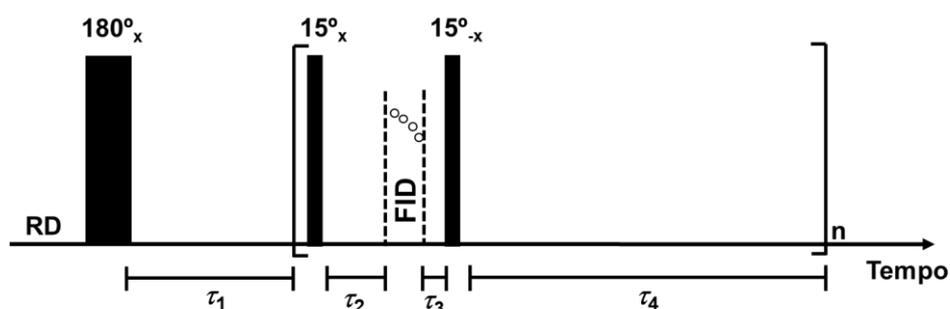


Figura 12 - Sequência de pulso *small flip-flop* (SAFF)

Fonte: Adaptado pelo autor a partir de CUCINELLI NETO; RODRIGUES; TAVARES, 2019

A sequência SAFF é composta por um pulso de inversão (180_x^0) seguido por um tempo τ_1 , que pode variar de $10 \mu\text{s}$ (para sólidos e materiais rígidos) a $5000 \mu\text{s}$ (para líquidos com T_1 de alguns segundos). Após, é aplicado um trem de pulsos de 15° com alternância de fase separados por um tempo τ_2 (tempo morto da bobina) seguido por uma aquisição de poucos pontos do FID, e de um tempo τ_3 (tempo curto de pós aquisição, cerca de $3 \mu\text{s}$) seguido de um tempo de recuperação τ_4 (recuperação da magnetização do vetor M_z).

Para τ_4 foi empiricamente determinado que $\tau_4 \approx T_1/4$ para sólidos e amostras rígidas, com T_2 de alguns microssegundos, $\tau_4 \approx T_1/10$ para borrachas e polímeros com

T_2 entre 0,2 e 5,0 ms e $\tau_4 \approx T_1/60$ para amostras líquidas com T_2 de alguns milissegundos a segundos, como os óleos, água, e solventes orgânicos).

Visto, que para utilizar a sequência de pulso SAFF é requerido ajustes dos tempos τ_1 e τ_4 , recomenda-se que se use a sequência inversão-recuperação como referência, para ajudar na correta calibração da sequência e valor mais apropriado de τ_4 , principalmente para amostras totalmente desconhecidas.

2.5. TRANSFORMADA INVERSA DE LAPLACE (ILT)

A transformada inversa de Laplace é uma abordagem matemática que pode ser aplicada as curvas exponenciais (FID) obtidas por RMN no domínio do tempo em um gráfico gaussiano ainda no domínio do tempo, resultando em uma informação da distribuição da população de spins da amostra, similar a transformada de Fourier que é aplicada a RMN de alta resolução para transformar a informação obtida no domínio do tempo em diferentes frequências relacionadas a informação química de cada hidrogênio da amostra.

Contudo a ILT é um problema matemático mal posto e pode levar a resultados inadequados, pois depende de certos parâmetros para correta resolução. Necessitado assim da escolha correta do parâmetro de regularização (α), uma vez que este parâmetro influencia fortemente na resolução correta dos picos. O valor ótimo de α pode ser calculado automaticamente por equações de regularização de Tikhonov (DAY, 2011).

3. ANÁLISE EXPLORÁTORIA E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA DE DADOS

De modo a possibilitar comparar e analisar uma grande quantidade de dados instrumentais que serão obtidos neste trabalho, serão utilizadas ferramentas matemáticas/estatísticas de análise multivariada de dados que contribuirão para melhor interpretação dos dados. Dentre estas ferramentas, serão utilizadas a análise por componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e calibração por regressão dos mínimos quadrados parciais (PLSR, do inglês *Partial Least Square Regression*).

A análise multivariada de dados permite conhecer as propriedades e a composição de sistemas, que apresentam difícil solução pelos métodos convencionais de laboratório. Essas propriedades podem ser obtidas de forma indireta, a partir de outras variáveis descritas como variáveis latentes, de forma a encontrar as relações existentes entre os dados químicos e físico-químicos do sistema em questão (FERRÃO et al., 2004).

Para realizar as análises multivariadas, os dados obtidos pelas técnicas analíticas devem ser organizados em forma de matriz (amostras em linhas e variáveis em colunas). Também é importante que esses dados passem por pré-tratamentos antes de serem aplicadas as análises quimiométricas, com o objetivo de reduzir pequenos erros de variações indesejáveis decorrentes da obtenção de dados que podem afetar o resultado final (FERREIRA, 2015).

3.1. PCA

A PCA (*Principal Component Analysis*) é um método de análise exploratória de dados, e é considerado um método não supervisionado, pois não há supervisão de como os dados irão se distribuir no modelo. Sua principal função é reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados constituído por um grande número de variáveis inter-relacionadas, preservando o máximo possível a variação presente no conjunto de dados. Após a sua aplicação, obtém-se um novo conjunto de variáveis, que não são correlacionadas e ordenadas, onde as primeiras componentes contêm a maior parte da variação em todas as variáveis originais (KUMAR et al., 2014; ROGGO et al., 2007). Assim, esse método permite converter grande quantidade de dados em representações gráficas de *scores* e de *loadings*, descrevendo as amostras e as variáveis, respectivamente. Portanto, a PCA possibilita interpretar de forma mais simples as similaridades ou diferenças de um conjunto de dados.

3.2. PLSR

A regressão por PLS ou PLSR (*Partial Least Squares Regression*) é um método de calibração multivariada, ou seja, os resultados obtidos são em função dos dados utilizados na calibração realizada pelo operador. O objetivo do PLSR é estabelecer uma relação linear entre duas matrizes: uma matriz contendo os dados experimentais e a outra matriz contendo os valores de referência. Este método modela as matrizes X e Y para descobrir as variáveis na matriz X que melhor descreverão a matriz Y (ROGGO et al., 2007).

Após a calibração é possível prever as propriedades de novas amostras a partir de medidas instrumentais. Os sinais instrumentais são definidos numa nova matriz X_p , e aplicados na correlação construída na fase de calibração, e as propriedades desconhecidas das amostras preditas são coletadas numa nova matriz Y_p .

Um bom modelo PLSR deve descrever o sistema, considerando o maior número possível de variação dos dados e uma quantidade de fatores ou VL (Variável Latente) suficiente para obter um menor desvio da reta de calibração. A quantidade ótima de fatores a ser utilizada é aquela onde há um menor erro de predição possível, conhecido como RMSEP (*Root Mean Square Error of Prediction*) (FERRÃO et al., 2004).

Além disso, o modelo deve apresentar um coeficiente de correlação (R^2) satisfatório e valores baixos e similares de RMSEC (*Root Mean Standard Error of Calibration*) e RMSECV (*Root Mean Standard Error of Cross-Validation*) (WU; LI; GAO, 2016). Um valor entre 0,5 e 1 obtida a partir da razão RMSEC/RMSECV geralmente configura um modelo bem ajustado e com boa predição. Porém, um valor de RMSEV muito menor ou muito maior que o RMSEC gera um modelo pouco ajustado ou sobreajustado, respectivamente, podendo resultar em erros na predição de novas amostras(FERRÃO et al., 2004).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia para controle de qualidade do óleo de copaíba por RMN capaz de identificar e quantificar a adulteração por óleo de soja em amostras comerciais de óleo de copaíba.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar a química dos óleos de copaíba comerciais e extraídos de *Copaifera multijuga* por CG-EM e RMN de alta resolução;

Desenvolver metodologia por RMN de alta resolução para quantificação do teor de adulterante (óleo de soja) em amostras de óleo de copaíba.

Desenvolver modelos quimiométricos utilizando RMN-DT, capazes de identificar a amostra de óleo de copaíba como adulterada (com óleo de soja) e predizer o teor de adulteração.

5. METODOLOGIA

5.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRA DE ÓLEO DE COPAÍBA

As amostras de óleo resina de copaíba, denominadas amostras puras de copaíba, foram extraídas a partir da perfuração (Figura 13) do tronco da copaibeira nunca perfurada utilizando uma ferramenta perfurante, denominada trado, até atingir o cerne, ou de árvores com tronco já perfurado e selado com tubo de PVC, de indivíduos da espécie *Copaifera multijuga* Hayne em localidades aos arredores da cidade de Manaus - Amazonas (Autorização SISBIO nº 64614-1).

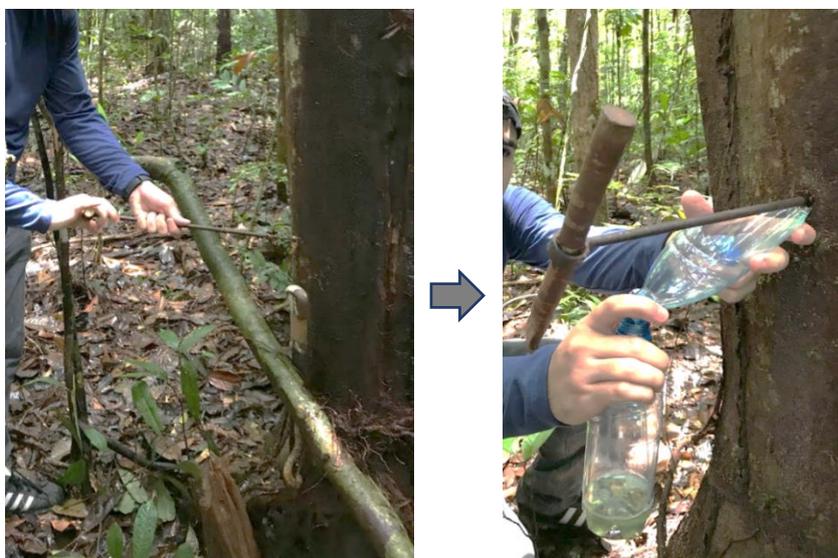


Figura 13 - Extração de óleo de copaíba com trado (amostra F1)

Fonte: Fotos do autor

Foram obtidas 12 amostras puras de óleo de copaíba a partir de:

10 indivíduos na Reserva Florestal Adolpho Ducke ($2^{\circ}57'47.6''S$ $59^{\circ}55'26.2''W$) localizada na zona Norte de Manaus no período do mês de outubro de 2018, período de estiagem/seca na região. Estas amostras foram codificadas por D1 a D10.

1 indivíduo na Fazenda Experimental da UFAM, localizada no KM 38 da rodovia BR-174; ($2^{\circ}38'56.5''S$ $60^{\circ}02'38.7''W$). Esta amostra foi codificada por F1.

1 amostra fornecida por doação do Prof. Ari Hidalgo – do Laboratório de Plantas Medicinais da UFAM, bloco V, setor Sul – proveniente de um indivíduo aos arredores da Usina de Belo Monte, no Estado do Pará. Esta amostra foi codificada por BM1.



Figura 14 - Região Metropolitana de Manaus - Amazonas

Fonte: Google Maps

Todas as amostras coletadas foram armazenadas em frasco âmbar para mantê-los protegidos da luz e mantidas a temperatura amena de 20 ± 2 °C.

Foram obtidas ainda, um total de 64 amostras comerciais de óleo de copaíba. Sendo 58 amostras obtidas no mercado local em Manaus (codificada por ACM1 a ACM58), em farmácias, na feira Manaus Moderna, no Mercado Adolpho Lisboa e em empresas exportadoras de óleo de copaíba. 4 amostras foram obtidas no Mercado Ver-o-Peso em Belém/PA (codificadas por ACP1 a ACP4), e 2 amostras obtidas no centro comercial de São Carlos/SP (codificadas por ACSC1 e ACSC2). Além de óleo de soja comercial comprado em supermercado (codificado por OS-100) que serviu de adulterante padrão para preparação de *blends* binários de óleo de copaíba + óleo de soja.

Para estas amostras comerciais, geralmente não há informações em seu rótulo sobre época de coleta, local de origem, ou da identificação botânica. Essas amostras foram mantidas em seus frascos originais, geralmente recipiente plástico transparente, ao abrigo da luz e em temperatura amena de 20 ± 2 °C.

5.2. PREPARO DE BLENDS BINÁRIOS

Foram preparados dois “*mix*” de óleo de copaíba (B1 e B2) através da mistura das copaíbas puras, de forma a simular uma amostra de copaíba comercial autêntica e que fosse mais representativa para o restante das amostras.

O mix de **B1** foi preparado apenas por amostras puras obtidas na Reserva Florestal Adolpho Ducke e **B2** pelas amostras da Fazenda da UFAM e de Belo Monte, com quantidades distintas de acordo com a maior disponibilidade das amostras.

Para as análises por RMN de alta resolução foram preparadas 25 amostras de *blends* binários (massa/massa), utilizando balança analítica Shimadzu AY220, contendo óleo de copaíba e óleo de soja, com teor conhecido variando de 5 a 90%. Todas os *blends* foram preparados em triplicata e utilizando diferentes indivíduos, assim, temos os: *blends* de **B1-X** (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90%) que foi utilizado para verificação do ERETIC2 e calibração do PLSR, e os *blends* de **D1-X** (16, 30 ou 50%), **D4-X** (10, 40 ou 75%), **D7-X** (10, 35 ou 70%), **D9-X** (7, 30 ou 75%) e **F1-X** (15, 45 ou 90%) que foram utilizados como amostras de validação, onde o **X** representa numericamente o teor de óleo de soja (%) presente no *blend* binário.

Para as análises por RMN-DT foram preparados 81 *blends* binários (volume/volume). Todos os *blends* foram preparados em triplicata e com diferentes indivíduos, com teor de óleo de soja variando de 5 a 90%. Assim, temos os *blends* de **B1-X** (5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 ou 90%), **B2-X** (5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 ou 90%), **D1-X** (3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 75, 80 ou 90%), **D4-X** (5, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 60, 70, 80 ou 90%), **D9-X** (5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 ou 90%), **F1-X** (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90%), **BM-X** (5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 80 ou 90%) e **PA1-X** (5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 ou 90%), onde **X** representa numericamente o teor de óleo de soja (%) presente no *blend*.

5.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

5.3.1. VISCOSIDADE DINÂMICA

A viscosidade dinâmica das amostras foi medida utilizando um reômetro Antor Paar, modelo *Physica* MCR 301 equipado com banho termostático, através da análise de 3,5 mL de amostra depositada no copo porta amostra, utilizando pipeta volumétrica com volume ajustável até 5 mL.

A cada amostra, o copo porta amostra foi lavado com solução de Extran® 20%, seguido de enxágue com água corrente, enxágue com água destilada e secagem com papel toalha absorvente. As medidas foram realizadas em duas temperaturas: 0 e 20 °C. Cada amostra foi mantida por mais 3 minutos na temperatura de análise, após a estabilização térmica.

As leituras foram realizadas a partir da variação da taxa de cisalhamento, de 1 a 100 cisalhamentos por segundo, em dois *steps*: 1-10/s e 10-100/s, sendo 20 pontos em cada *step*, totalizando 40 pontos de medida da viscosidade dinâmica, cujos valores foram expressos em miliPascal segundo (mPa.s).

5.3.2. TESTE DE CONGELAMENTO

As amostras de óleo de copaíba autênticos, óleo de soja comercial, e *blends* binários de copaíba/óleo de soja (com teor variando entre 5 e 90% de óleo de soja) foram submetidos a congelamento em congelador doméstico (-18 °C) por 1 hora e 5h. Após, foi verificada se ocorreu o congelamento da amostra através de inspeção visual, foram avaliados ainda, a fluidez e coloração das amostras.

5.4. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

5.4.1. CROMATOGRAFIA GASOSA

Por CG-EM, apenas 12 amostras puras (D1 a D10, F1 e BM) e 6 amostras comerciais (ACM1, ACM2, ACM3, ACP1, ACP2 e ACP3) foram analisadas por CG-EM no laboratório de cromatografia da Universidade Federal de Roraima (UFRR) em um cromatógrafo Shimadzu GC-2010 acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu QP2010 Plus, utilizando uma coluna capilar Restek RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de filme) (5% difenil 95% dimetil polisiloxano). O modo de injeção foi o *split* com razão de 1:10 e o volume amostra injetado foi de 1 µL. Gás Hélio (He) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 2 mL.min⁻¹ e com controle de fluxo por velocidade linear de 36,6 cm/s. A programação de temperatura foi de 60 °C a 310 °C (3 °C.min⁻¹). A temperatura do injetor e do detector foi de 260 e 280 °C, respectivamente. O ganho do detector foi de 1,12 kV e a voltagem de ionização de 70 eV foi aplicada. A aquisição do espectro de massas foi realizada a 300 °C no modo *scan* na faixa de 40-600 *m/z* com velocidade de 1250 e um delay do solvente de 5 min.

A análise qualitativa dos componentes da amostra foi realizada pela comparação dos seus espectros de massas com os espectros contidos na base de dados Wiley 8. Não foi utilizado um padrão de série homologa de hidrocarbonetos para obter índices de retenção de Kovats ou aritmético. Antes de serem submetidas a análise as amostras foram derivatizadas utilizando 120 µL de TMSD (trimetilsilildiazometano) que foi adicionado lentamente a aproximadamente 10 mg de óleo dissolvido em 120 µL de hexano (grauHPLC) imerso em banho de gelo. Deixou-se reagir por 30 minutos e após evaporou-se o solvente com gás nitrogênio.

5.4.2. RMN DE ALTA RESOLUÇÃO

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLAB) da UFAM, localizado na Central Analítica, no setor norte do campus universitário.

O equipamento utilizado foi o espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III HD de 11,7 Teslas (frequência de 500,13 MHz para o ^1H e 125 MHz para ^{13}C), equipado com sonda multinuclear BBFO Plus SmartProbe™. A aquisição e processamento dos espectros foi realizado no software TopSpin® 4.0.

As amostras foram preparadas a partir de ~10 mg de óleo copaíba solubilizado em 550 μL de solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3 , 99,95% de pureza, com 5,0 mM de TMS-*d*₄ [3-(trimetilsilil) propionico-2,2,3,4-*d*₄, Sigma-Aldrich®]).

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos a 25 °C utilizando a sequência de pulso *zg* com $P1 = 9,97 \mu\text{s}$, $D1 = 10 \text{ s}$, $DS = 2$ e 32 scans, e os espectros foram apodizados com $LB = 0,3 \text{ Hz}$. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e referenciados pelo sinal do TMS-*d*₄ em 0,0 ppm. Correção de fase e ajustes da linha de base foram executados.

Os espectros de RMN de ^{13}C foram adquiridos utilizando a sequência de pulso *zgpg30* com $TD = 64\text{k}$, $SW = 240 \text{ ppm}$, $AQ = 0,90 \text{ s}$, $P1 = 14,8 \mu\text{s}$, $D1 = 2 \text{ s}$, $DS = 4$ e 512 scans.

5.4.2.1. QUANTIFICAÇÃO POR ERETIC2

Para realizar a quantificação por ERETIC2 foi preparado um padrão de referência externa a partir de um MCR de Dimetilsulfona (99,8%) (INMETRO, Brasil, certificado DIMCI 1506/2019, Lote: MRC 8783.0001) em 3 réplicas com cerca de 3,5 mg do MCR em 550 μL de CDCl_3 (5,0 mM TMS-*d*₄). Os parâmetros $P1$ e $D1$ foram calibrados e a integral da área do sinal de hidrogênio (s , 2,98 ppm) foi utilizada como referência na calibração do ERETIC2. A Quantificação por ERETIC2 foi realizada em triplicata para todas as amostras e os resultados foram expressos em % teor de adulterante (TAGs).

5.4.3. RMN DE BAIXO CAMPO OU NO DOMÍNIO DO TEMPO (RMN-DT)

As amostras de óleos de copaíba autênticas, 64 amostras comerciais, *blends* binários e o óleo de soja foram submetidas a análise em RMN-DT, utilizando um espectrômetro de bancada SpecFit (Fine Instrument Technology) operando a 0,33 Teslas (frequência de 13,8 MHz para núcleos de hidrogênio) equipado com sonda de 40 mm de diâmetro.

Devido a limitação da quantidade de amostra, apenas 3 mL de óleo foram analisados em frascos de 12 mm de diâmetro inserido no meio do tubo de 40 mm do equipamento, conforme Figura 15. Antes de ser inserido no equipamento o frasco de 12mm contendo amostra foi termalizado à temperatura de 20 ± 2 °C.

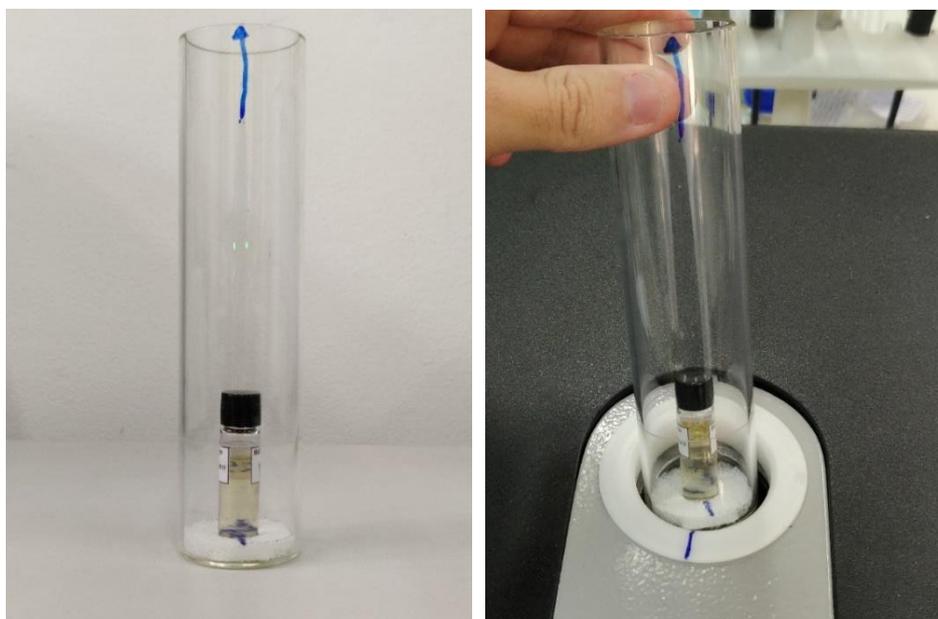


Figura 15 – Tubos contendo amostras de óleo de copaíba utilizada nas análises por RMN-DT no equipamento SpecFit

Fonte: Fotos do autor

As análises foram realizadas utilizando a sequência de pulso CPMG para obter valores de relaxação transversal (T_2), com os seguintes parâmetros: pulso de 90° de 27,5 μ s, pulso de 180° de 55 μ s, tempo entre pulsos (τ) de 300 μ s, tempo de aquisição (REC) de 80 μ s, *recycle delay* (RD) de 3 s, 2000 ecos e 32 scans.

E para obter valores de relaxação transversal (T_1) utilizou-se da sequência de pulso SAFF com os seguintes parâmetros: pulso de 180° de 55 μs , pulso de 15° de 4,6 μs , τ_1 de 3000 μs , τ_2 de 20 μs , τ_3 de 3 μs , τ_4 de 5000 μs , 600 pontos, *recycle delay* (RD) de 0,5 s e 64 scans.

Para obter os valores de relaxação T_1 e T_2 das sequências de pulso CPMG e SAFF foram realizados ajustes biexponencial para cada amostra utilizando a componente real do sinal de RMN com fase corrigida por SVD em rotina do software Matlab®. O software utilizado para o ajuste exponencial foi o Origin 9.5 (OriginLab®).

5.5. ANÁLISE MULTIVARIADA DE DADOS

Os dados obtidos por RMN de alta resolução e RMN-DT foram submetidos a análise exploratória de dados e/ou calibração multivariada por PCA e/ou PLSR com o objetivo de criar um modelo de predição do teor de adulterante (óleo de soja) em amostras comerciais de óleo de copaíba.

Todas as análises quimiométricas foram realizadas no software para análise multivariada de dados, The Unscrambler 10.2.

5.5.1. PROCESSAMENTO DOS DADOS OBTIDOS POR RMN DE ALTA RESOLUÇÃO

Os espectros de RMN de ^1H tiveram seus sinais de referência interna (TMS- d_4) calibrados em 0,0 ppm, em seguida, realizou-se a correção de fase e da linha de base dos espectros de ^1H no software TopSpin®.

O alinhamento dos espectros é um passo importante quando a RMN é utilizada para fins multivariados, por isso, os espectros de RMN de ^1H foram alinhados utilizando o algoritmo Icoshift (do inglês, *Interval Correlation Optimised Shifting*) (SAVORANI; TOMASI; ENGELSEN, 2010, 2013).

Anteriormente ao alinhamento, os espectros foram normalizados pela área total do espectro. 40 intervalos espectrais foram definidos manualmente de modo a obter-se o melhor alinhamento. O alinhamento foi executado em modo *target*

utilizando o espectro de RMN de ^1H da amostra binária de copaíba/óleo de soja contendo 30% de óleo de soja como referência, pois essa amostra possui boa representatividade de todos os sinais de copaíba e do óleo de soja. O resultado do alinhamento pode ser visualizado na Figura 16.

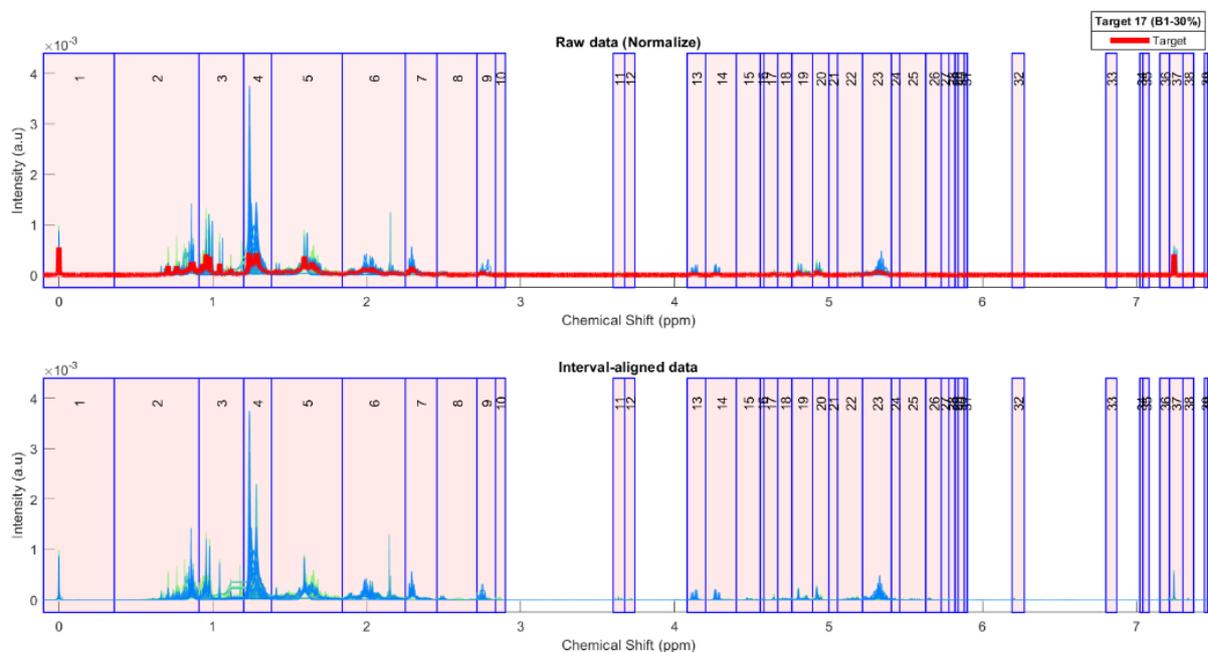


Figura 16 - Alinhamento dos espectros de RMN ^1H através do algoritmo icoshift

Após o alinhamento com o icoshift, os espectros foram exportados para o software The Unscrambler[®] X, onde foi obtida uma matriz de dados transposta, em seguida realizou-se a normalização dos dados pela área seguida da análise por PCA, com dados centrados na média e usando o algoritmo SVD. O PLSR dos dados de RMN de alta resolução foi calibrado com os *blends* binários de B1-X e os *blends* restantes foram utilizados como conjunto de validação, para atestar a eficiência do modelo.

5.5.2. PROCESSAMENTO DOS DADOS OBTIDOS POR RMN-DT

Os dados de FIDs obtidos por RMN-DT foram processados a fim de obter os melhores agrupamentos das amostras autênticas e adulteradas de copaíba.

Após obtida a triplicata de todas as amostras analisadas por RMN-DT, cada espectro foi normalizado pelo máximo, após obteve-se um espectro médio para cada amostra. Em seguida foram submetidos a ajuste mono-, bi- ou triexponencial para obter os valores de relaxação e de área. Esse ajuste foi aplicado a todas as curvas de CPMG e SAFF.

Foram realizadas análise de PCA com os valores obtidos do ajuste exponencial, esses dados discretos foram exportados para uma matriz transposta (amostras em linhas e variáveis em colunas), em seguida os dados foram normalizados para deixar todas as variáveis comparáveis entre si. O algoritmo de processamento usado pela PCA foi o SVD.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS DE COPAÍBA

As amostras de copaíba obtidas apresentaram variação de coloração de amarelo claro a marrom, as amostras puras e o óleo de soja podem ser visualizadas na Figura 17 e as amostras comerciais na Figura 18. Observa-se que a coloração e aspecto do óleo de soja é bastante similar ao do óleo de copaíba, sendo este o principal adulterante utilizado.

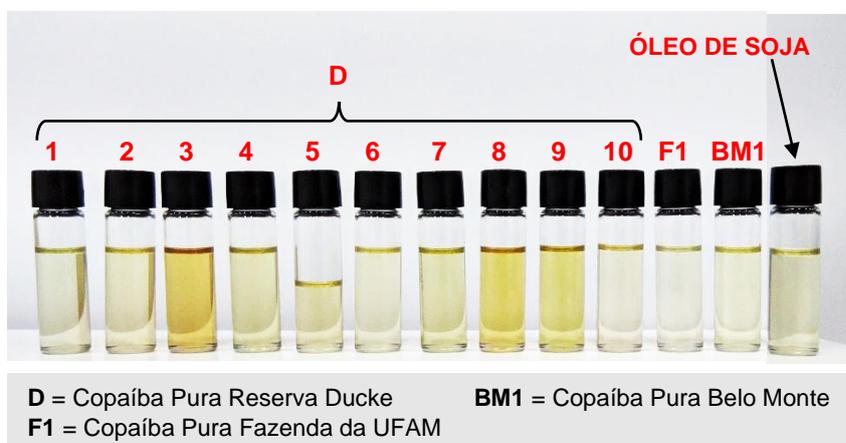


Figura 17 - Amostras Puras de óleo de Copaíba e óleo de soja

Fonte: Foto do autor

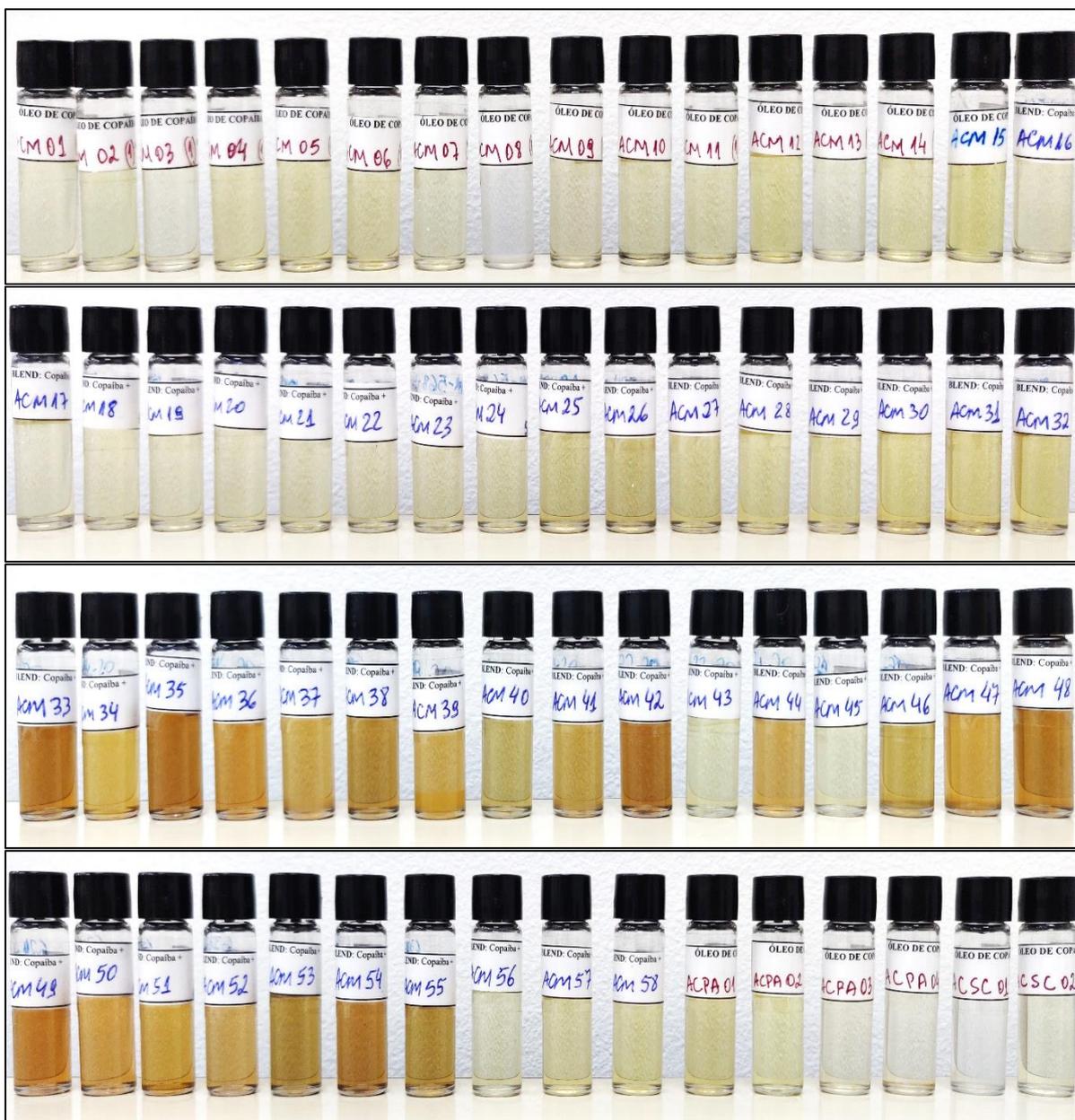


Figura 18 - Amostras comerciais de óleo de copaíba de Manaus (ACM), Pará (ACP) e São Carlos (ACSC)

Fonte: Foto do autor

Na Tabela 1 encontram-se informações do DAP (diâmetro a altura do peito), altura aproximada, volume de óleo obtido da extração e coloração das amostras puras e de algumas amostras comerciais de óleo de copaíba, as quais foram obtidos valores de viscosidade. Verifica-se que houve grande variação no volume de óleo obtido (20 a 700 mL). Porém, levando em consideração que os indivíduos encontrados na Reserva Florestal Adolpho Ducke já estavam perfurados e selados com tubo de PVC,

não é possível obter conclusão acerca da produção do óleo de copaíba, uma vez que possivelmente ocorreu extração anterior a coleta realizada, podendo esta ser também uma justificativa para o menor volume coletado de alguns indivíduos.

Tabela 1 - Parâmetros físicos e Viscosidade dinâmica para os óleos resina de copaíba por indivíduo

| AMOSTRA | DAP ¹ (cm) | ALTURA ² (m) | VOLUME OBTIDO ³ (mL) | COLORAÇÃO | VISCOSIDADE (mPa.s) | |
|---------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------|------------------------|-------|
| | | | | | 0 °C | 20 °C |
| D1 | 35,7 | 20 | 250 | Amarelo claro | 101 | 25 |
| D2 | 57,3 | 35 | 70 | | 108 | 28 |
| D3 | 53,2 | 30 | 25 | Amarelo ouro | 366 | 55 |
| D4 | 51,0 | 30 | 150 | Amarelo claro | 232 | 41 |
| D5 | 41,7 | 25 | 20 | | 172 | 38 |
| D6 | 31,2 | 20 | 20 | | 98 | 28 |
| D7 | 41,1 | 25 | 40 | | 69 | 21 |
| D8 | 36,6 | 20 | 50 | Amarelo ouro | 125 | 28 |
| D9 | 33,8 | 20 | 100 | | 61,5 | 19 |
| D10 | 31,4 | 20 | 50 | | 36 | 12 |
| F1 | 55,73 | 40 | 700 | Amarelo claro | 69 | 15 |
| BM1 | - | - | 600 | | 93 | 29 |
| ACM1 | | | | | 44 | 13 |
| ACM2* (8,8 ± 4,4%) | | *** | | Amarelo claro | 72 | 22 |
| ACM3* (83,7 ± 2,2%) | | | | | 138 | 50 |
| ACP1 | | *** | | Amarelo | 88 | 27 |
| ACP2* (83,1 ± 0,6%) | | | | | 131 | 48 |
| ACP3* (86,6 ± 4,6%) | | *** | | Amarelo claro | 133 | 48 |
| Óleo de Soja | | | | | 145 | 57 |

¹ Diâmetro a Altura do Peito

² Altura aproximada

³ Volume aproximado

* Amostra adulterada com óleo de soja (confirmado por RMN de ¹H)

*** Amostras comerciais sem dado disponível

D – Copaíba Pura Reserva Duce

F1 – Copaíba Pura Fazenda da UFAM

BM1 – Copaíba Pura Belo Monte

ACM – Amostra Comercial de Copaíba de Manaus

ACPA – Amostra Comercial de Copaíba do Pará

Foi observado uma elevada variabilidade das características físicas como a coloração e viscosidade das amostras autênticas e comerciais de óleo de copaíba (Tabela 1). A viscosidade dinâmica das amostras analisadas variou entre 36 e 366 mPa.s (0 °C) e 12 e 57 mPa.s (20 °C).

Conforme pode ser observado na Tabela 1, mesmo entre amostras autênticas de óleo de copaíba, houve indivíduos como as amostras **D3**, **D4** e **D5** que apresentaram a 0 °C os valores mais elevados de viscosidade dinâmica (366, 232 e 172 mPa.s, respectivamente) do que as amostras adulteradas grosseiramente (131 ~ 145 mPa.s) e do restante das amostras autênticas (36 ~ 108 mPa.s).

A 20 °C, as amostras adulteradas grosseiramente com óleo de soja (48 ~ 57 mPa.s) obtiveram valores de viscosidade maior do que as amostras autênticas (12 ~ 29 mPa.s), com destaque para a **D3 (55 mPa.s)** que possui uma viscosidade bastante próxima a viscosidade do óleo de soja comercial (57 mPa.s), enquanto que as amostras autênticas restantes apresentaram viscosidade média de 25 mPa.s. A amostra D3 é bastante distinta, em termos de viscosidade dinâmica, quando comparação ao grupo de amostras autênticas.

Observa-se ainda, que mesmo entre as amostras obtidas no mesmo local, como é o caso das amostras obtidas na Reserva Adolpho Ducke (amostras iniciadas com o código D), coletadas concomitantes no mesmo dia e de indivíduos relativamente próximos, ocorreu uma variabilidade da coloração e viscosidade bastante expressiva.

Silva e colaboradores (2017) verificam uma variação de viscosidade (a 25 °C) de 9,46 a 92,62 mPa.s para 11 amostras autênticas de óleo de copaíba (*C. multijuga* Hayne) coletadas na Floresta Nacional de Sacará Taquera em Oriximiná/PA.

Essa diferença de viscosidade pode estar relacionada à maior quantidade de diterpenos presente nas amostras, uma vez que a relação entre sesquiterpenos e diterpenos nos óleos de copaíba deve afetar a viscosidade (VEIGA JR.; PINTO, 2005).

A viscosidade está diretamente correlacionada ao tempo de relaxação transversal (T_2), e atrelada ao conceito de mobilidade molecular, que reflete, geralmente, em um tempo de relaxação mais curto para amostras mais viscosas, e uma relaxação mais longa para as amostras menos viscosas (COLNAGO; ANDRADE, 2010).

Em RMN-DT, para a correta identificação de amostras autênticas e adulteradas, uma diferença expressiva de viscosidades entre o adulterante e amostra autêntica de copaíba seria o ideal. Geralmente, isto foi observado para a maioria das amostras analisadas, entretanto, a similaridade da viscosidade de algumas amostras puras (mais viscosas) frente ao adulterante (óleo de soja) torna-se uma dificuldade ao objetivo proposto, conforme será discutido mais adiante.

6.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE COPAÍBA POR CG-EM

Na Figura 19 encontram-se os cromatogramas TIC das amostras de copaíbas analisadas, em ordem decrescente de viscosidade a 20 °C.

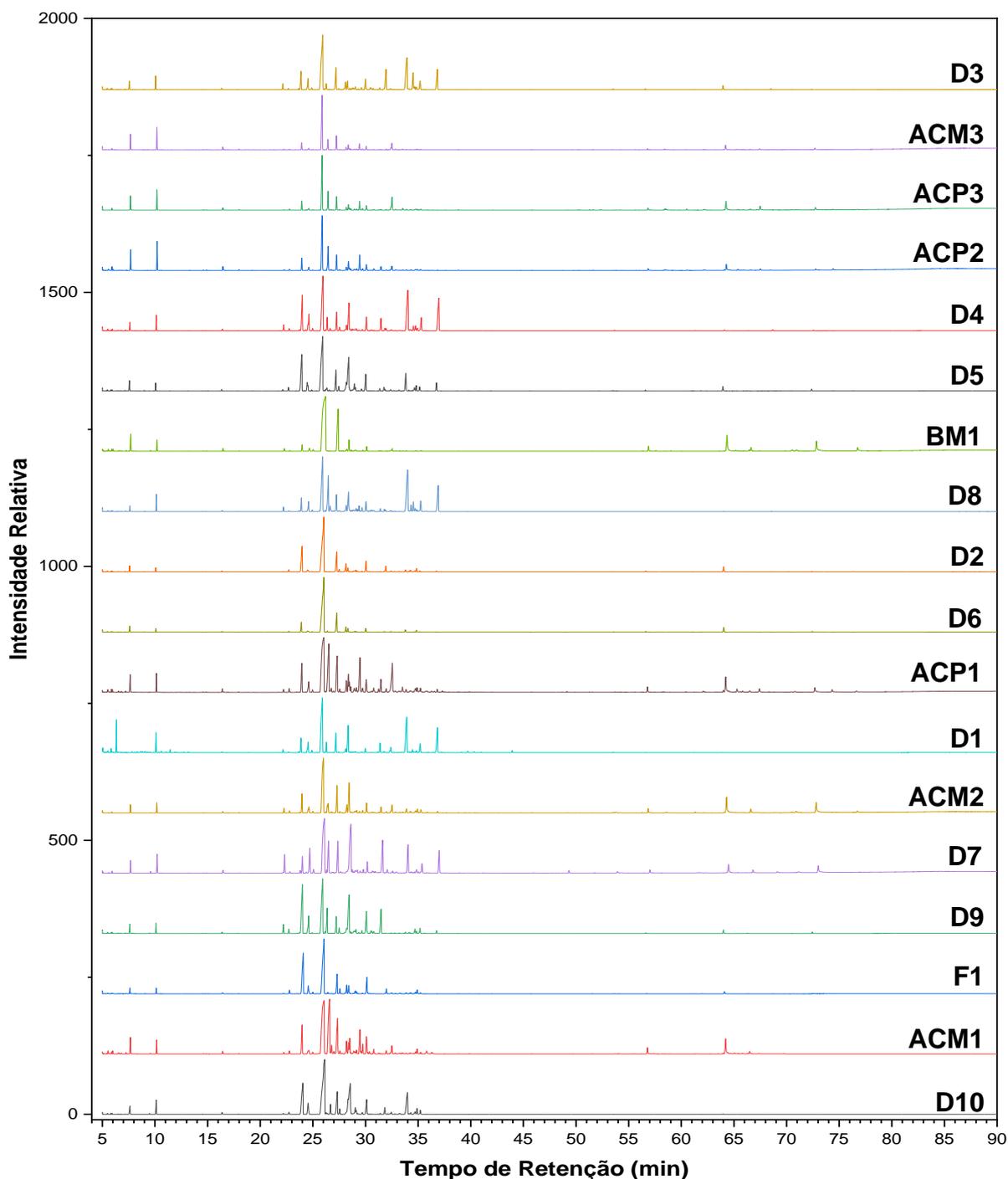


Figura 19 - Cromatogramas TIC amostras de óleo de copaíba em ordem decrescente de viscosidade a 20 °C

Em termo da quantidade de componentes, as amostras comerciais apresentaram maiores quantidades de componentes do que as amostras autênticas, sugerindo que essas amostras são um *mix* de óleo de vários indivíduos, o que acaba enriquecendo a sua composição química. Neste caso, enquanto as amostras autênticas de indivíduos únicos apresentaram em média 28 compostos, as autênticas comerciais apresentaram em média 48 componentes.

Os componentes majoritários foram identificados através da comparação do espectro de massa com os espectros da biblioteca Wiley 8 e estão listados na Tabela 2.

O β -cariofileno foi o componente majoritário em todas as amostras variando de 22,9 a 68,7%, seguido do α -copaeno (1,5 a 24,2%), germacreno D (1,2 a 16,4%), e α -humuleno (3,5 a 15,7%), esses 4 constituintes estão presentes em todas as amostras. Barbosa e colaboradores (2013) analisando amostras de óleo de copaíba coletadas na Reserva Adolpho Ducke, também identificaram o β -cariofileno, α -copaeno e α -humuleno como componentes majoritários.

O Óxido de cariofileno (0,2 a 16,0%) foi encontrado em 13 amostras e δ -cadineno (1,6 a 6,1%) em 14 amostras. Já o α -bergamoteno (2,2 a 19,1%) foi encontrado apenas nas amostras comerciais e na amostra pura D8.

Os sesquiterpenos oxigenados, drimenol (5,1 a 20,3%) e juniper camphor (2,0 a 12,1%) foram identificados em 6 amostras autênticas, cada um, em especial naquelas coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke que apresentaram maior viscosidade.

A derivatização dos TAGs presentes nas amostras ACM2, ACM3, ACP2 e ACP3 não foi efetiva, visto que não ocorreu eluição no cromatograma TIC (Figura 19). Não foi possível identificar nenhum dos diterpenos eluídos com tempo de retenção entre 40 e 80 minutos, contudo observa-se que os mesmos possuem baixa concentração quando comparado a fração sesquiterpênica.

Tabela 2 - Percentual relativo dos componentes do óleo resina de copaíba identificados por CG-EM

| Componente | AMOSTRA | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D8 | D9 | D10 | F1 | BM1 | ACM1 | ACM2 | ACM3 | ACP1 | ACP2 | ACP3 |
| β-cariofileno | 30.1 | 54.81 | 31.44 | 22.87 | 32.33 | 68.66 | 26.45 | 23.52 | 24.39 | 37.62 | 42.93 | 39.68 | 30.8 | 36.57 | 40.54 | 28.4 | 32.57 | 33.12 |
| Óxido de Cariofileno | 1.22 | | 16.01 | | 0.27 | 1.13 | 0.21 | | | 0.3 | | 0.45 | 1.2 | 2.12 | 3.6 | 6.32 | 0.37 | 6.44 |
| α-humuleno | 5.05 | 9.19 | 6.08 | 3.93 | 5.65 | 10.83 | 6.46 | 3.77 | 3.56 | 6.42 | 7.13 | 15.73 | 8.75 | 8.29 | 7.35 | 7.7 | 6.19 | 6.09 |
| Germacreno-D | 8.4 | 1.23 | 2.18 | 6.99 | 13.51 | 1.51 | 16.36 | 5.92 | 13.95 | 12.04 | 2.41 | 2.53 | 1.72 | 10.77 | 2.7 | 3.03 | 3.7 | 2.55 |
| Germacreno-B | 2.32 | | | 2.63 | | | 7.07 | | 5.93 | | | | | 1.99 | | | | |
| α-copaeno | 3.53 | 14.65 | 4.77 | 9.86 | 14.87 | 4.5 | 2.68 | 2.93 | 18.6 | 12.64 | 24.24 | 1.52 | 5.81 | 5.17 | 3.69 | 5.12 | 4.92 | 4.05 |
| α-cadineno | | | | | 2.5 | 2.3 | | 1.33 | 1.13 | 3.29 | 2.66 | | 1.91 | 2.2 | 1.25 | 1.7 | 1.16 | 1.19 |
| δ-cadineno | | 4.18 | 2.39 | 2.75 | 4.57 | | 1.62 | 2.26 | 5.76 | 3.35 | 6.08 | | | 2.51 | 1.96 | 2.07 | 2.57 | 2.12 |
| β-elemeno | 2.54 | | 2.97 | 3.27 | 0.87 | | 4.89 | 2.39 | 4.77 | | | 0.75 | 1.08 | 1.52 | | 2.12 | 0.95 | 0.44 |
| Juniper Camphor | 9.34 | | 7.09 | 12.12 | 2.01 | | 4.88 | 9.18 | | | | | | | | | | |
| α-bergamoteno | | | | | | | | 10.66 | | | | | 19.07 | 2.24 | 5.72 | 12.09 | 11.11 | 8.75 |
| α-muroleno | | | | | | | | | | | | | | | 0.48 | 0.74 | | |
| β-bisaboleno | | | | | | | | 1.13 | | | | | 4.34 | | 3.1 | | | 3.88 |
| Drimenol | 16.2 | | | 17.66 | 5.13 | | 6.64 | 20.27 | | 8.38 | | | | | | | | |
| TOTAL % | 78.7 | 84.06 | 72.93 | 82.08 | 81.71 | 88.93 | 77.26 | 83.36 | 78.09 | 84.04 | 85.45 | 60.66 | 74.68 | 73.38 | 70.39 | 69.29 | 63.54 | 68.63 |

Nas amostras analisadas acima, há também a presença de outros componentes com teor < 2% ou que não conseguiram ser identificadas. Assim, nesta tabela consta apenas os constituintes majoritários das amostras totalizando mais de 60% do percentual relativo.

| | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D8 | D9 | D10 | F1 | BM1 | ACM1 | ACM2 | ACM3 | ACP1 | ACP2 | ACP3 |
|------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| D1 | 1.000 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D2 | 0.792 | 1.000 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D3 | 0.721 | 0.851 | 1.000 | | | | | | | | | | | | | | | |
| D4 | 0.941 | 0.691 | 0.580 | 1.000 | | | | | | | | | | | | | | |
| D5 | 0.815 | 0.917 | 0.737 | 0.765 | 1.000 | | | | | | | | | | | | | |
| D6 | 0.824 | 0.976 | 0.873 | 0.667 | 0.869 | 1.000 | | | | | | | | | | | | |
| D7 | 0.873 | 0.773 | 0.671 | 0.751 | 0.857 | 0.806 | 1.000 | | | | | | | | | | | |
| D8 | 0.890 | 0.613 | 0.505 | 0.867 | 0.629 | 0.647 | 0.660 | 1.000 | | | | | | | | | | |
| D9 | 0.602 | 0.806 | 0.591 | 0.594 | 0.921 | 0.712 | 0.767 | 0.370 | 1.000 | | | | | | | | | |
| D10 | 0.867 | 0.939 | 0.763 | 0.788 | 0.985 | 0.915 | 0.869 | 0.701 | 0.861 | 1.000 | | | | | | | | |
| F1 | 0.696 | 0.962 | 0.766 | 0.665 | 0.929 | 0.885 | 0.679 | 0.518 | 0.879 | 0.918 | 1.000 | | | | | | | |
| BM1 | 0.794 | 0.942 | 0.840 | 0.625 | 0.833 | 0.971 | 0.807 | 0.607 | 0.670 | 0.880 | 0.838 | 1.000 | | | | | | |
| ACM1 | 0.595 | 0.817 | 0.671 | 0.440 | 0.686 | 0.832 | 0.578 | 0.628 | 0.549 | 0.728 | 0.742 | 0.818 | 1.000 | | | | | |
| ACM2 | 0.805 | 0.950 | 0.837 | 0.643 | 0.926 | 0.964 | 0.890 | 0.608 | 0.811 | 0.946 | 0.875 | 0.952 | 0.810 | 1.000 | | | | |
| ACM3 | 0.781 | 0.964 | 0.872 | 0.610 | 0.850 | 0.987 | 0.772 | 0.643 | 0.692 | 0.895 | 0.871 | 0.959 | 0.892 | 0.960 | 1.000 | | | |
| ACP1 | 0.667 | 0.889 | 0.833 | 0.496 | 0.771 | 0.905 | 0.667 | 0.614 | 0.634 | 0.809 | 0.811 | 0.888 | 0.954 | 0.896 | 0.949 | 1.000 | | |
| ACP2 | 0.737 | 0.931 | 0.787 | 0.586 | 0.838 | 0.940 | 0.746 | 0.677 | 0.704 | 0.872 | 0.856 | 0.913 | 0.954 | 0.935 | 0.969 | 0.976 | 1.000 | |
| ACP3 | 0.725 | 0.931 | 0.876 | 0.547 | 0.806 | 0.954 | 0.710 | 0.625 | 0.652 | 0.851 | 0.840 | 0.920 | 0.925 | 0.928 | 0.988 | 0.974 | 0.970 | 1.000 |

| Legenda | |
|---------|-------|
| | > 0.8 |
| | < 0.6 |

Figura 20 - Correlação de Pearson dos dados de CG-EM

Na Figura 20, a correlação de Pearson para as amostras analisadas pelo CG-EM indicam altas correlações (> 0,8) para as amostras D2, D6 e D5, indicando boa similaridade com as outras amostra autênticas. Já as amostras D4, D8 e D9 mostram-se bastante diferente das demais, apresentando correlações bem baixas (< 0,6) entre si. Já as amostras comerciais são bastante similares entre si, apresentando maior variabilidade química em função das misturas de diversos óleos de copaíba distintos.

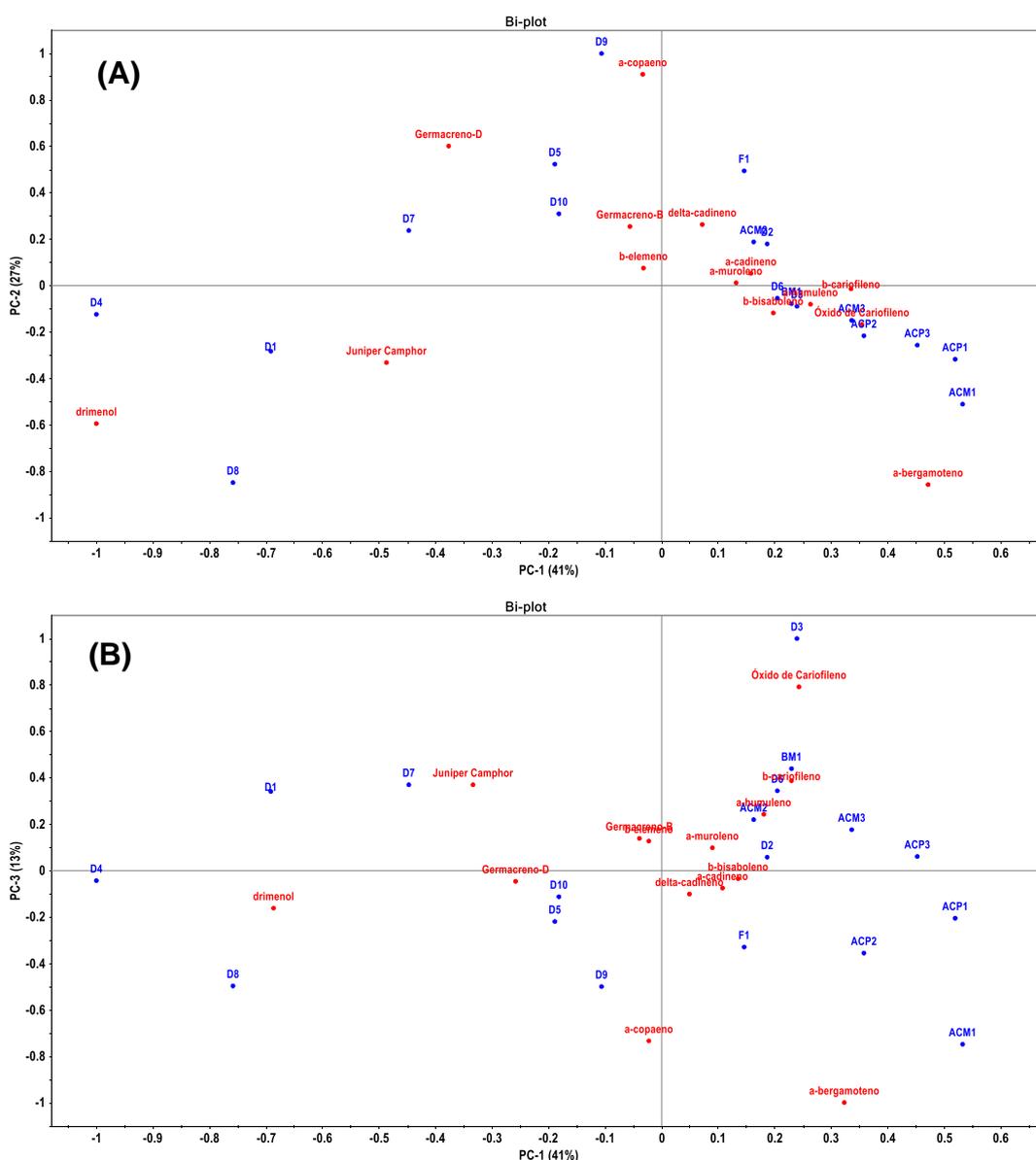


Figura 21 - Gráfico *biplot* da PCA das amostras analisadas por CG-EM. **A)** PC1xPC2, **B)** PC1xPC3

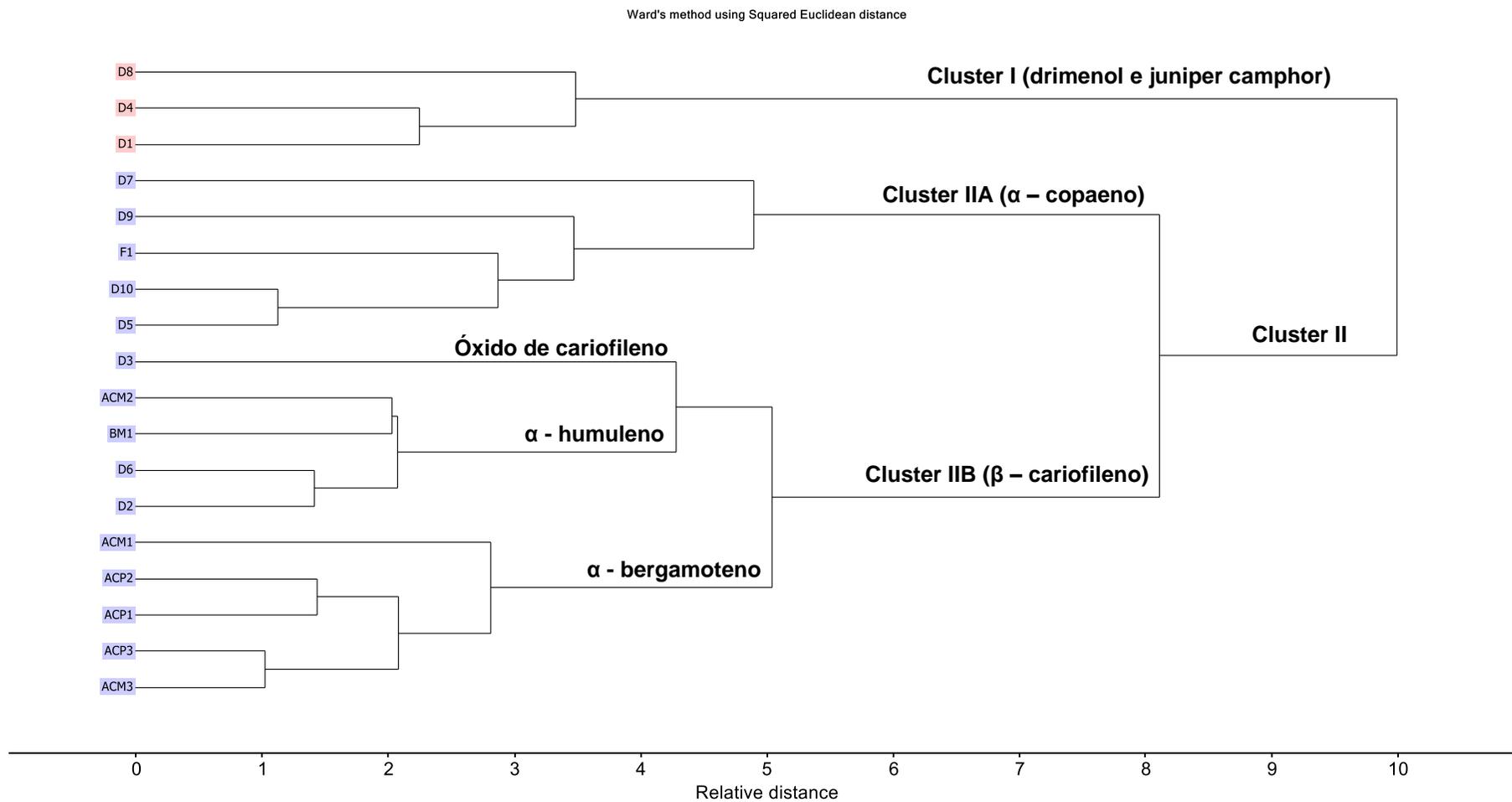


Figura 22 - Dendrograma HCA das amostras analisadas por CG-EM

A PCA foi realizada em função dos componentes presentes nas amostras. Os gráficos de *biplot* podem ser visualizados na

Figura 21 e do HCA na Figura 22. Anteriormente, os dados foram normalizados e auto escalonados.

Em valores mais negativos de PC1,

Figura 21A, encontram-se as amostras D4, D8 e D1 com maiores quantidades de drimenol e juniper camphor. Essas amostras foram as mais distintas em relação as demais, conforme pode ser observado também na Figura 22, onde apenas essas se encontram no Cluster I, apresentando maior dissimilaridade das demais que . Sugere-se que esses sesquiterpenos oxigenados sejam os responsáveis por uma relaxação transversal (T_2) mais rápida, o que acaba dificultando a diferenciação das amostras autênticas e adulteradas, conforme poderá ser observado ao discutirmos os dados de RMN-DT mais adiante.

As amostras do subcluster IIA apresentaram maiores teores de α -copaeno, como a D9, F1, D7, D10 e D5 foram as que apresentaram maiores quantidades de α -copaeno. Já as amostras do subcluster IIB apresentaram em geral maiores quantidade de β -cariofileno, com destaque para a D3, que foi a que apresentou maior teor de óxido de cariofileno e D2, D6, BM1 e ACM2 que também apresentaram maiores teores de α -humuleno. E as amostras comerciais (ACM e ACP) foram as únicas que apresentaram α -bergamoteno e maiores quantidades de óxido de cariofileno em relação as demais. Para a amostra D3 que possui maior quantidade de óxido de cariofileno entre as amostras analisadas, neste caso, acredita-se que esse sesquiterpeno oxigenado deve ser o responsável pela relaxação mais rápida dessa amostra, similarmente as amostras D8 e D4 com drimenol e juniper camphor.

6.2.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE COPAIBA POR RMN DE ALTA RESOLUÇÃO

A partir dos espectros RMN de ^1H e ^{13}C obtidos foi possível confirmar alguns sinais característicos de alguns componentes presente no óleo de copaíba, como o β -cariofileno, α -humuleno, germacreno D, óxido de cariofileno e do ácido copálico. De acordo com os dados dos deslocamentos químicos obtidos na literatura, descritos na Tabela 3 e ilustrado na Figura 23.

Tabela 3 - Sinais característicos das substâncias majoritárias em amostras de óleo de copaíba

| Componente | Deslocamento químico δ (ppm) | | Referência |
|----------------------|-------------------------------------|--------------------|--|
| | ^{13}C | ^1H | |
| β -cariofileno | 124,3 | 5,31 (<i>dd</i>) | (LARIONOV; COREY, 2008; RIBEIRO, 2015) |
| α -humuleno | 125,0 | 5,44 (<i>sl</i>) | (RANDRIAMIHARISOA et al., 1986) |
| | 125,8 | 4,87 | |
| Germacreno-D | 129,7 | 5,13 (<i>s</i>) | |
| | 135,5 | 5,76 (<i>s</i>) | |
| | 135,5 | 5,78 (<i>s</i>) | |
| Óxido de cariofileno | 67,2 | 3,64 (<i>t</i>) | (RIBEIRO, 2015) |
| Ácido copálico | 114,81 | 5,66 (<i>sl</i>) | (ROMERO, 2007) |

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das amostras puras e comerciais podem ser visualizados nos Apêndice 1 e Apêndice 2.

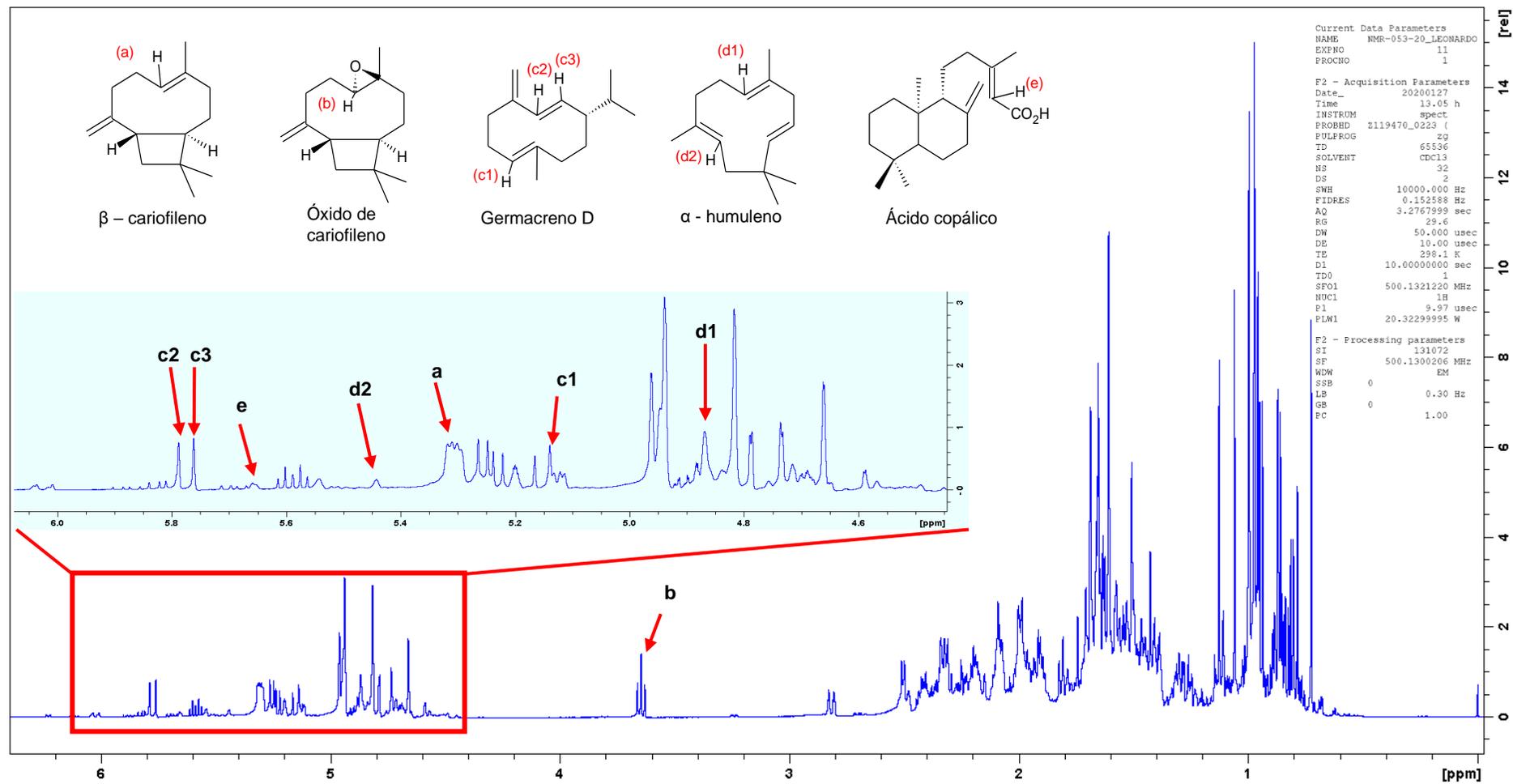


Figura 23 - Identificação dos sinais de RMN de ^1H dos componentes presentes no óleo de copaíba (amostra D1)

Já é bastante conhecido que há grande variabilidade química entre amostras de óleo de copaíba, tanto intra- e inter-específica, além disso, amostras provenientes de um mesmo indivíduo em diferentes períodos sazonais também apresentam expressiva variação de seus constituintes químicos conforme observado pelo estudo realizado por Barbosa e colaboradores (2012) com 16 indivíduos de *Copaifera multijuga* Hayne coletados na Reserva Florestal Adolfo Ducke em Manaus/AM mostrou a grande variabilidade química existente decorrente entre o período de chuvas e de estiagem da região, onde ocorreu variação tanto das quantidades dos constituintes, quanto da ausência ou presença de novos constituintes.

Isso demonstra a necessidade de criar modelos com amostras bem representativas de forma a obter maior robustez, por isso os *mix* de copaíba B1 e B2 foram preparados e incluídos nos modelos.

6.2.2. VERIFICAÇÃO DE AUTENTICIDADE DO ÓLEO DE COPAIBA POR RMN DE ALTA RESOLUÇÃO

No teste de congelamento (-18 °C) realizado foi observado que amostras com adulterações expressivas podem ser identificadas com certa facilidade, pois o óleo de soja congela, enquanto que amostras autênticas de óleo de copaíba não congelam. Esse teste foi realizado com diversas amostras e observou-se que a maioria das amostras autênticas ou com teor de adulteração menor que 40 % permanecem líquidas e com boa fluidez. Embora, devido a elevada variabilidade química intra- e interespecífica, algumas amostras permanecem líquidas apenas com teor de adulterante menor que 15%.

Portanto, pode-se concluir que as amostras que congelarem devem possuir pelo menos 15% de adulterante (óleo de soja). Devido a presença do óleo de soja a coloração da amostra adulterada fica cada vez mais esbranquiçada, conforme se aumenta a quantidade de adulterante. Após alguns segundos em temperatura ambiente esses óleos voltam ao estado líquido, sugerindo que o ponto de solidificação do óleo de soja é próximo a -18 °C.

Assim, o teste de congelamento demonstrou ser um teste qualitativo rápido e simples para identificar se uma amostra comercial de óleo de copaíba é autêntica ou não. Contudo, este teste deve ser usado com cautela, visto que esse teste foi realizado com um conjunto amostral reduzido, e pode não ser representativo para todas as amostras de óleo de copaíba.

Em relação a verificação de autenticidade, ao utilizar-se da RMN de alta resolução identifica-se com facilidade a presença de adulteração com óleo vegetal, como o óleo de soja que é composto por TAGs (triacilglicerídeos).

Os TAGs possuem sinais de hidrogênios característicos e que não existem em amostras autênticas de óleo de copaíba. Na Tabela 4, estão tabelados os sinais característicos do óleo de soja.

A maioria dos sinais de hidrogênios dos TAGs possuem deslocamentos que coalescem com os sinais do óleo de copaíba autêntico, contudo há três sinais dos TAGs que podem ser observados sem coalescência, quando estes estão presente em uma amostra de copaíba. Os deslocamentos químicos destes sinais são: δ 2,76 (*t*), δ 4,19 (*dd*), δ 4,29 (*dd*).

Tabela 4 - Sinais de RMN ¹H de alta resolução característicos do óleo de soja

| Deslocamento Químico (ppm) | Multiplicidade | Constante de Acoplamento J (Hz) |
|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 0,91 – 0,86 | duplo duplete (<i>dd</i>) | 6,73 (6,31) |
| 0,97 | Tripleto (<i>t</i>) | 7,50 |
| 1,40 – 1,21 | multiplete (largo) (<i>m</i>) | - |
| 1,66 – 1,57 | multiplete (largo) (<i>m</i>) | - |
| 2,10 – 1,97 | Multiplete (<i>m</i>) | - |
| 2,33 – 2,28 | sexteto | 3,97 |
| 2,76 | triplete (<i>t</i>) | 6,80 |
| 4,19 | duplo duplete (<i>dd</i>) | 5,88 (12,0) |
| 4,29 | duplo duplete (<i>dd</i>) | 4,45 (12,0) |
| 5,43 - 5,29 | multiplete (largo) (<i>m</i>) | - |

Nos espectros de RMN de ^1H na Figura 25 é possível visualizar destacados em vermelho os sinais dos hidrogênios metínicos (5,34 ~ 5,29 ppm) e metilênicos (4,29 e 4,19 ppm) da parte do glicerol, sinais de hidrogênios olefínicos (2,76 ppm) entre insaturações e os metilênicos olefínicos (2,10 ~ 1,97 ppm) provenientes dos ácidos graxos insaturados, presente em grande quantidade no óleo de soja, além de um grande sinal (1,40 ~ 1,21 ppm) proveniente dos hidrogênios das partes saturadas das cadeias graxas (BARISON et al., 2010). Esses sinais permitem essa rápida verificação de autenticidade dos óleos de copaíba ao visualizar o espectro de RMN de ^1H .

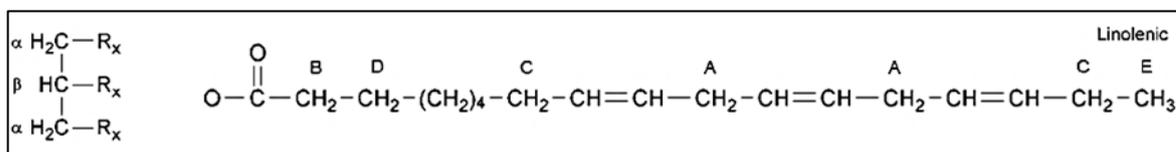


Figura 24 - Estruturas moleculares do Glicerol e do Ácido Linolênico (18:3)

Fonte: adaptado de (BARISON et al., 2010)

Na Figura 24 podem ser observadas as estruturas moleculares do TAG identificando os hidrogênios correspondentes aos sinais destacados no espectro de RMN de ^1H da Figura 25.

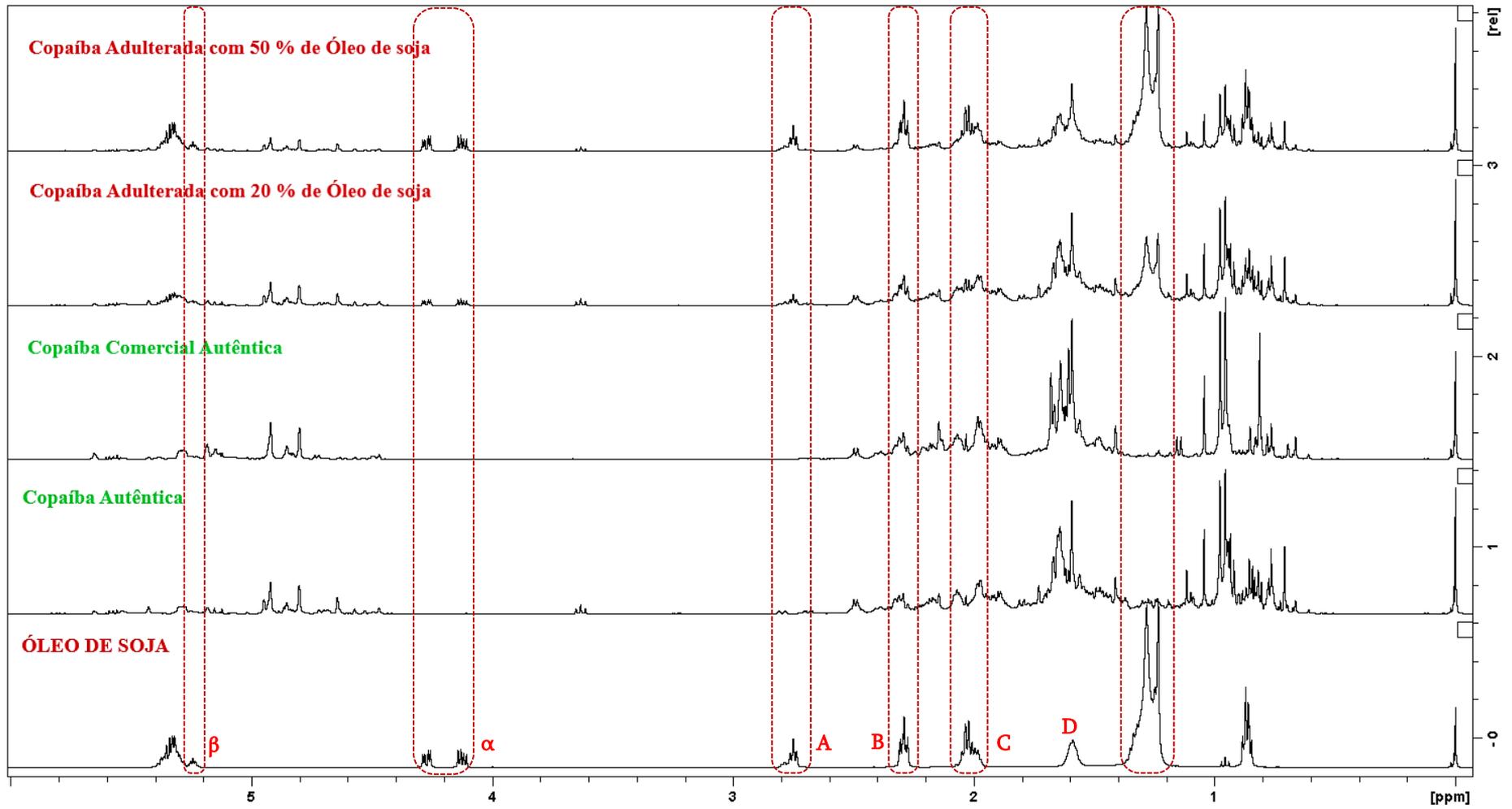


Figura 25 - Espectros de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do óleo de soja, copaibas autênticas e adulteradas

A PCA dos espectros de RMN de ^1H na Figura 26, mostra a distinção entre as amostras autênticas e adulteradas com óleo de soja ao longo de PC1, conforme se aumenta o teor de adulterante na amostra. Observa-se ainda a distinção do óleo mineral e de 2 amostras comerciais de copaíba contendo óleo mineral, uma vez que o óleo mineral possui uma notável diferença espectral. Assim, o óleo mineral e as amostras ACM8 e ACSC1 acabam sendo consideradas *outliers* ao modelo quimiométrico, sendo assim essas amostras foram excluídas desse modelo.

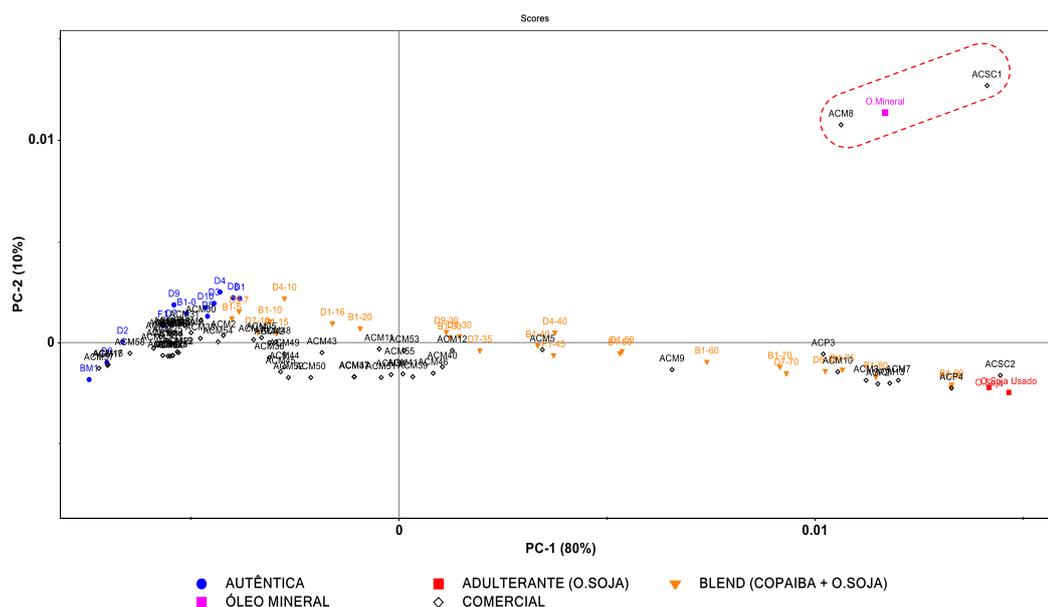


Figura 26 – Gráfico de *scores* da PCA (PC1 x PC2) dos espectros de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de amostras de óleos de copaíba autênticas, comerciais, *blends* e adulterantes (óleo de soja e óleo mineral)

No gráfico de *scores* da PCA na Figura 27, observa-se um agrupamento das amostras autênticas em valores negativos de PC1, com um gradiente crescente do teor de óleo de soja – conforme pode ser observado pelos *blends* de B1, D1, D4 e D9 – ao longo de PC1 até seus valores mais positivos onde se encontra o adulterante (óleo de soja). O gráfico de *loadings* (Figura 28) indica os sinais do óleo de soja que são responsáveis por essa separação em PC1 (87%). A PC2 (6%) exibe a variabilidade química das amostras adquiridas na RFAD, estando as amostras com maiores quantidades de óxido de cariofileno em valores mais positivos de PC2 e amostras com maiores quantidades de β -cariofileno e α -humuleno em valores mais negativos de PC2.

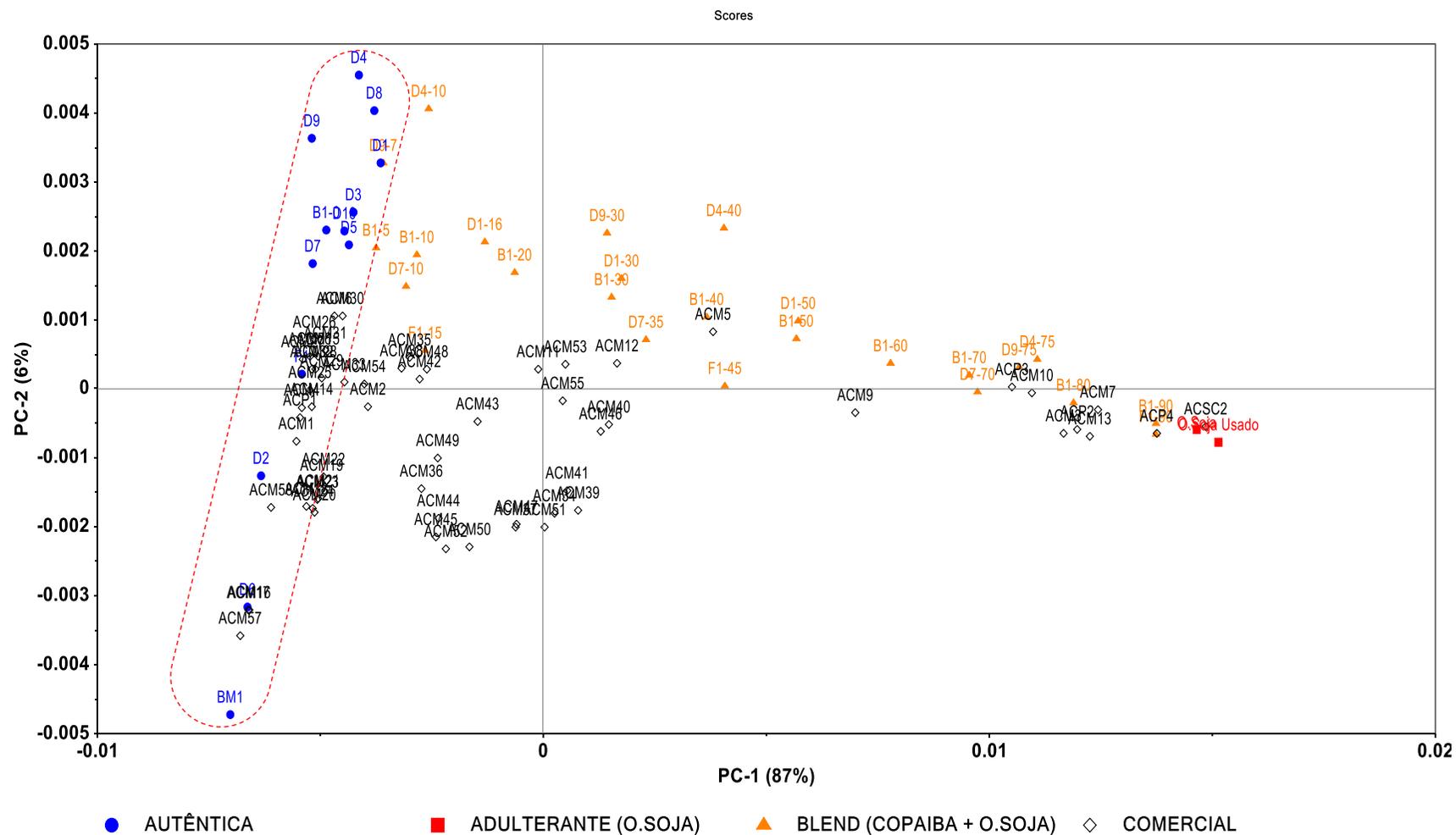


Figura 27 - Gráficos de scores da PCA (PC1 x PC2) dos espectros de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), dados normalizados pela área

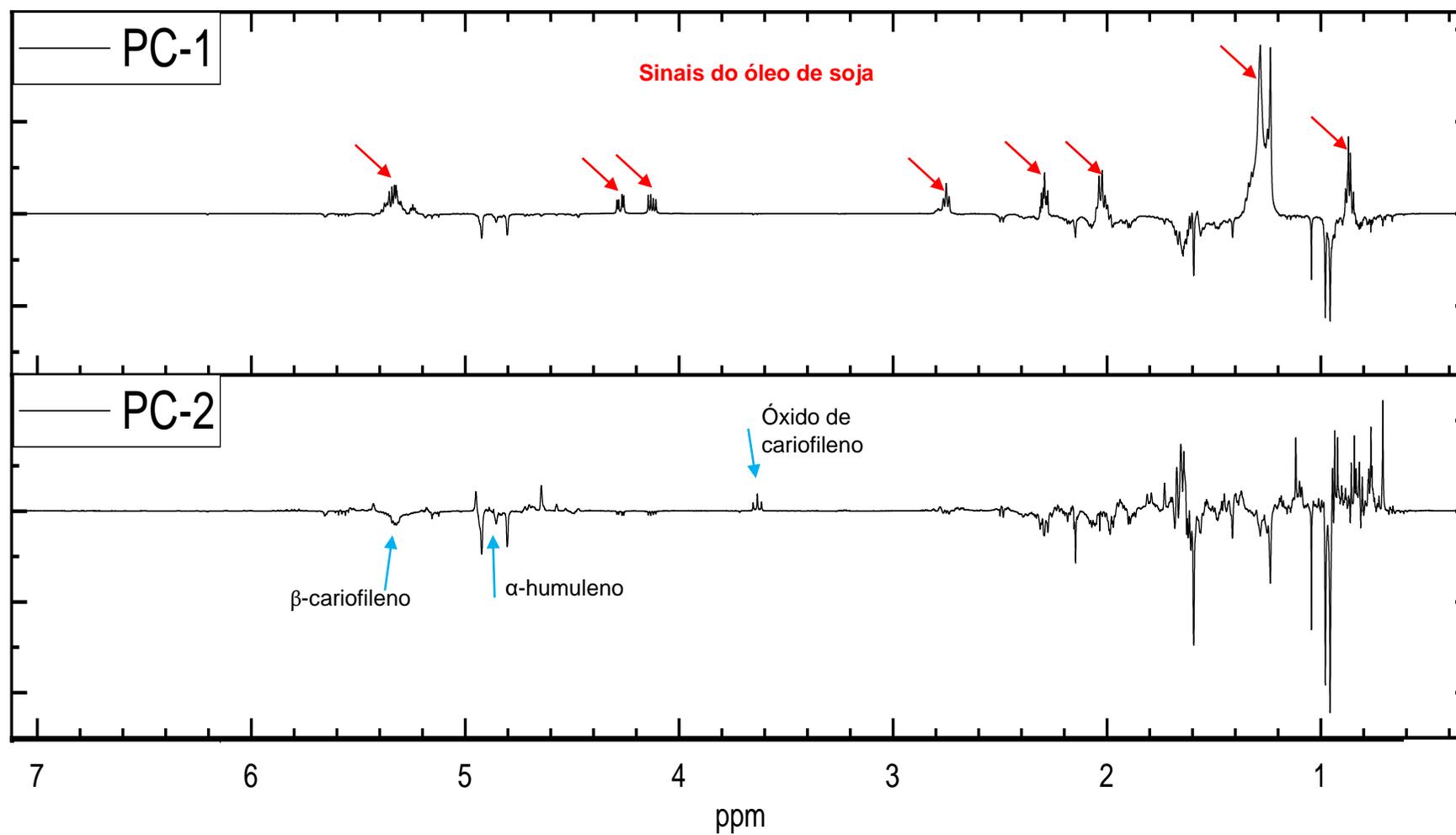


Figura 28 - Gráficos de *loadings* da PCA (PC1 x PC2) dos espectros de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)

Vimos que a verificação da autenticidade de uma amostra de óleo de copaíba, pela técnica de RMN de alta resolução é bastante eficiente. Porém, conforme já foi discutido, seu custo de análise elevado inviabiliza análises rotineiras, principalmente para o consumidor final. Além de identificar a presença de adulterante, é possível por esta técnica, desde que se possua um sinal livre, quantificar o teor de adulterante do tipo TAG, de forma rápida e precisa, através do uso do ERETIC2 utilizando um padrão de referência corretamente calibrado.

6.2.3. QUANTIFICAÇÃO DO ADULTERANTE (ÓLEO DE SOJA) POR RMN DE ALTA RESOLUÇÃO

6.2.3.1. ERETIC2

O uso do ERETIC2 permitiu estimar o teor de adulterante em amostras de óleo de copaíba adulterada com óleo de soja. O uso mais comum do ERETIC2 é para quantificar substâncias únicas, pois o seu cálculo requer que seja conhecida o peso molecular da substância. A priori, o óleo de soja por ser composto por diversas moléculas de TAGs, não poderia ser quantificado pelo ERETIC2. Contudo, sabendo que os TAGs são compostos por 3 moléculas de ácido graxo ligadas a uma molécula de glicerol, foi possível estimar um peso molecular média para o óleo de soja a partir das massas dos TAGs constituintes. A Tabela 5 mostra o cálculo médio realizado. A composição graxa do óleo de soja foi obtida a partir do método desenvolvido por (BARISON et al., 2010), e apresentou boa concordância com o relatório técnico da fabricante de óleo de soja.

Tabela 5 - Cálculo estimado da massa molecular média para o óleo de soja

| Componente | % Teor de Ácidos Graxos ^[1] | Fórmula Molecular | Massa Molecular (Cadeia R) | Cadeia R (x3) | Contribuição da parte do Glicerol | Peso Estimado do TAG | Peso Estimado do TAG (Média Ponderada) |
|-----------------------------------|--|-------------------|--|---------------|-----------------------------------|----------------------|--|
| Ácido Linolênico | 18:3 | 7.49 | C ₁₈ H ₂₉ O ₂ | 277.42 | 832.26 | 873.26 | 65.44 |
| Ácido Linoleico | 18:2 | 44.13 | C ₁₈ H ₃₁ O ₂ | 279.44 | 838.33 | 879.33 | 388.08 |
| Ácido Oleico | 18:1 | 27.35 | C ₁₈ H ₃₃ O ₂ | 281.47 | 844.41 | +41 | 242.19 |
| Ácido Esteárico | 18:0 | 8.19 | C ₁₈ H ₃₅ O ₂ | 283.48 | 850.44 | 891.44 | 73.01 |
| Ácido Palmítico | 16:0 | 12.38 | C ₁₆ H ₃₁ O ₂ | 255.43 | 766.29 | 807.29 | 99.94 |
| Soma (g.mol⁻¹) | | | | | | 4336.74 | 868.66 |
| Média (g.mol⁻¹) | | | | | | 867.35 | |
| Erro relativo | | | | | | | 0.15% |

Sabendo que os TAGs encontrados no óleo de soja são compostos por cadeias de ácido linoleico (18:2), ácido oleico (18:1), ácido linolênico (18:3), ácido palmítico (16:0) e ácido esteárico (18:0) que correspondem a mais de 98% da sua composição química, foi realizado um cálculo de peso molecular médio, conforme a Tabela 5, onde se considerou que o TAG contenha 3 moléculas idênticas (ácido graxo) ligadas ao glicerol, assim o peso do TAG é igual a massa do glicerol + massa do ácido graxo (x3), resultando para um TAG com 3 moléculas de ácido linoleico, por exemplo, uma massa molecular estimada de 879,33 g.mol⁻¹. Este procedimento foi realizado para todos os ácidos graxos que compõem o óleo de soja, e no final realizou-se a média dos TAGs para obter o peso molecular médio estimada do óleo de soja.

Assim, o peso molecular médio estimado para o óleo de soja foi de 867,35 g.mol⁻¹. Tanto a média simples quanto a média ponderada – que levou em consideração o percentual de cada componente graxo – obtiveram valores semelhantes com um erro relativo de apenas 0,15%. Esse valor de peso molecular médio apresentou excelente resultado, uma vez que estimou corretamente por ERETIC2 os teores de óleo de soja dos *blends* binários de B1 preparados com teor conhecido, e que foram utilizados como amostras de verificação para o ERETIC2.

A quantificação das amostras de óleo de copaíba por ERETIC2 foi realizada a partir do sinal de hidrogênio em δ 4,19 (*dd*) referente aos dois hidrogênios metínicos, da porção do glicerol. Cada quantificação foi realizada com 3 réplicas do padrão de Dimetilsulfona, em cada uma das 3 réplicas amostral, de forma a se obter o desvio padrão.

Na Tabela 6 podem ser visualizados os teores de óleo de soja obtidos para as amostras quantificadas. As quantificações dos *blends* de B1 mostraram boa exatidão em toda a faixa testada (teor variando entre 5 e 90% de adulterante) apresentando desvio médio de 1,4% e desvio máximo de 3,4%.

Tabela 6 - Quantificação do Teor de Adulterante (óleo de soja) por ERETIC2 em amostras de óleo de copaíba

| Amostra | % TEOR DE ADULTERANTE (ERETIC 2) | % DESVIO PADRÃO (n= 3) | Amostra | % TEOR DE ADULTERANTE (ERETIC 2) | DESVIO PADRÃO (n= 3) |
|---------|----------------------------------|------------------------|---------|----------------------------------|----------------------|
| O. Soja | 99.7 | 1.2 | ACM14 | não se aplica | - |
| B1-0 | não se aplica | - | ACM15 | não se aplica | - |
| B1-5 | 5.7 | 1.0 | ACM16 | não se aplica | - |
| B1-10 | 9.9 | 0.9 | ACM17 | não se aplica | - |
| B1-20 | 20.1 | 1.1 | ACM18 | 5.5 | 0.3 |
| B1-30 | 31.0 | 0.8 | ACM19 | 5.8 | 1.1 |
| B1-40 | 41.4 | 1.6 | ACM20 | 6.0 | 0.9 |
| B1-50 | 51.0 | 1.6 | ACM21 | 6.3 | 0.9 |
| B1-60 | 61.8 | 3.4 | ACM22 | 6.7 | 0.3 |
| B1-70 | 71.6 | 0.4 | ACM23 | 6.6 | 0.1 |
| B1-80 | 81.1 | 0.4 | ACM24 | 5.9 | 0.0 |
| B1-90 | 93.0 | 2.1 | ACM25 | 4.3 | 1.2 |
| D1-16 | 15.6 | 0.5 | ACM26 | não se aplica | - |
| D1-30 | 31.5 | 0.3 | ACM27 | não se aplica | - |
| D1-50 | 50.5 | 3.2 | ACM28 | não se aplica | - |
| D4-10 | 7.1 | 0.9 | ACM29 | não se aplica | - |
| D4-40 | 40.4 | 0.9 | ACM30 | não se aplica | - |
| D4-75 | 77.3 | 2.4 | ACM31 | não se aplica | - |
| D7-10 | 9.6 | 0.8 | ACM32 | não se aplica | - |
| D7-35 | 36.4 | 2.4 | ACM33 | 4.5 | 0.2 |
| D7-70 | 71.8 | 2.2 | ACM34 | 27.7 | 0.6 |
| D9-7 | 6.9 | 1.3 | ACM35 | 10.2 | 0.5 |
| D9-30 | 31.9 | 1.0 | ACM36 | 14.6 | 0.4 |
| D9-75 | 75.2 | 0.8 | ACM37 | 20.8 | 0.9 |
| F1-15 | 17.2 | 1.4 | ACM38 | 10.6 | 0.8 |
| F1-45 | 45.4 | 1.7 | ACM39 | 24.4 | 1.1 |
| F1-90 | 91.1 | 1.8 | ACM40 | 27.1 | 1.5 |
| D1 | não se aplica | - | ACM41 | 24.1 | 0.0 |
| D2 | não se aplica | - | ACM42 | 11.7 | 0.9 |
| D3 | não se aplica | - | ACM43 | 19.5 | 0.8 |
| D4 | não se aplica | - | ACM44 | 17.6 | 0.6 |
| D5 | não se aplica | - | ACM45 | 15.7 | 0.2 |
| D6 | não se aplica | - | ACM46 | 23.1 | 1.4 |
| D7 | não se aplica | - | ACM47 | 20.4 | 0.6 |
| D8 | não se aplica | - | ACM48 | 12.7 | 0.5 |
| D9 | não se aplica | - | ACM49 | 15.3 | 0.5 |
| D10 | não se aplica | - | ACM50 | 17.5 | 0.5 |
| F1 | não se aplica | - | ACM51 | 24.1 | 1.0 |
| BM1 | não se aplica | - | ACM52 | 14.5 | 0.6 |
| ACM1 | não se aplica | - | ACM53 | 22.8 | 1.1 |
| ACM2 | 8.8 | 4.4 | ACM54 | 7.2 | 0.5 |
| ACM3 | 83.7 | 2.2 | ACM55 | 25.7 | 0.4 |
| ACM4 | 13.8 | 2.9 | ACM56 | não se aplica | - |
| ACM5 | 40.8 | 5.3 | ACM57 | não se aplica | - |
| ACM6 | 3.2 | 0.9 | ACM58 | não se aplica | - |
| ACM7 | 85.4 | 2.9 | ACP1 | 1.0 | 0.3 |
| ACM8 | 4.4 | 1.1 | ACP2 | 83.1 | 0.6 |
| ACM9 | 57.6 | 0.9 | ACP3 | 86.6 | 4.6 |
| ACM10 | 79.1 | 0.8 | ACP4 | 92.5 | 1.5 |
| ACM11 | 26.3 | 1.3 | ACSC1 | -0.6 | 0.7 |
| ACM12 | 34.9 | 0.6 | ACSC2 | 96.0 | 1.1 |
| ACM13 | 86.6 | 1.2 | | | |

6.2.3.2. PLSR

Outra alternativa, para se obter o teor de adulterante através da RMN de alta resolução é através do uso da Quimiometria, utilizando calibração multivariada realizada a partir dos espectros obtidos. Os mesmos espectros utilizados para o ERETIC2 foram utilizados para realizar uma quantificação através da regressão PLS ou PLSR.

Para calibração do PLSR os *blends* de B1, com teor de adulterante conhecido foram utilizados. A curva obtida (Figura 29) apresentou excelente linearidade para o 1 fator ou 1 LV (*Latent Variable*) e baixos valores dos parâmetros RMSEC e RMSECV, a razão RMSEC/RMSECV de 0,808 demonstra que o modelo apresenta uma boa robustez e previsibilidade. O PLSR foi validado por *cross-validation* pelo esquema *leave-one-out*, onde o modelo retira uma amostra por vez, resultando em um modelo n-1 que é usado para prever a amostra que foi retirada, realizando a validação cruzada de todas as amostras.

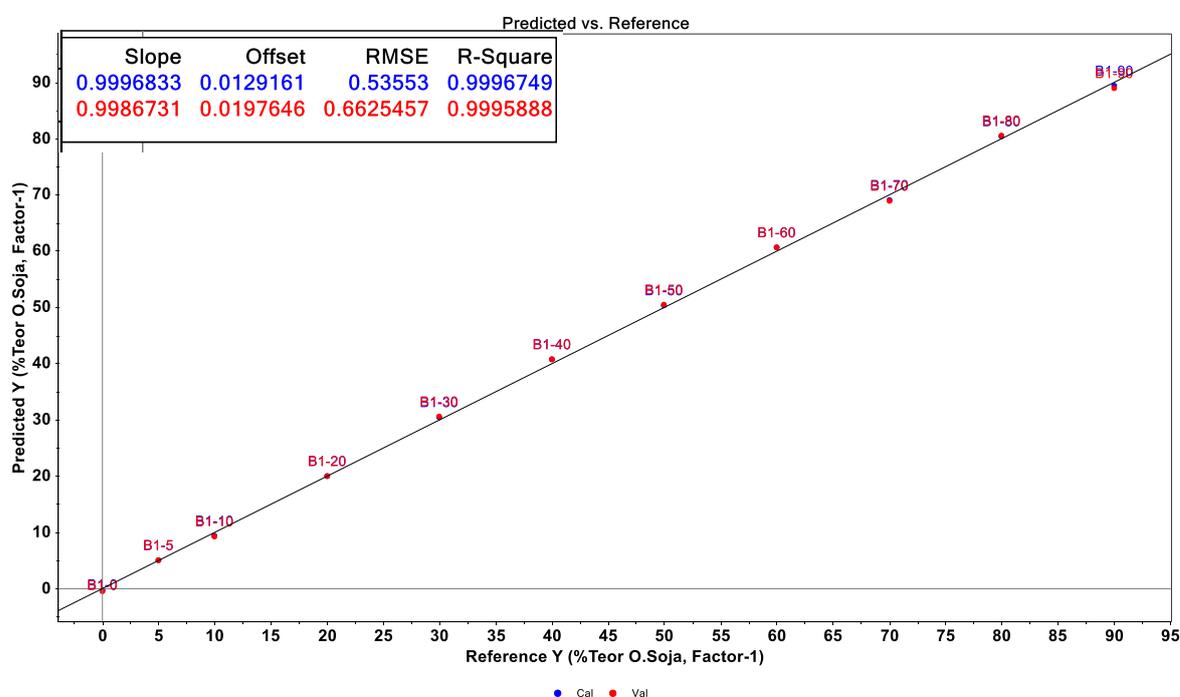


Figura 29 - Curva de calibração PLSR dos *blends* de B1, obtidos a partir dos espectros de RMN de ^1H

A precisão do modelo PLSR foi avaliada pelo uso de um conjunto de amostras para validação, contendo 15 amostras *blends* preparadas com óleo de copaíba de diferentes indivíduos e com teor de adulterante conhecido, o resultado da predição do conjunto de validação se encontra na Tabela 7 e resultou em um erro de predição (RMSEP) de 1,37%.

Ou seja, as amostras de validação foram preditas corretamente, demonstrando que o modelo pode ser utilizado para prever com boa precisão as amostras comerciais de óleo de copaíba adulteradas com óleo de soja, e independente da grande variabilidade química existente, uma vez que o *loadings* responsáveis pela predição pertencem ao óleo de soja.

Tabela 7 – Predição do Teor de Adulterante por PLSR das amostras do conjunto de validação

| Amostra | % Teor de Referência (ERETIC2) | Desvio Médio ± | % TEOR DE ADULTERANTE Predição (Fator 1) PLSR | Desvio Médio ± |
|---------|--------------------------------|----------------|---|----------------|
| D1-16 | 16.0 | 0.5 | 16.2 | 2.9 |
| D1-30 | 30.3 | 0.3 | 31.2 | 2.4 |
| D1-50 | 50.1 | 3.2 | 50.3 | 1.6 |
| D4-10 | 10.1 | 0.9 | 9.1 | 4.2 |
| D4-40 | 40.0 | 0.9 | 41.5 | 2.8 |
| D4-75 | 75.6 | 2.4 | 76.0 | 1.3 |
| D7-10 | 10.1 | 0.8 | 8.7 | 3.2 |
| D7-35 | 34.9 | 2.4 | 34.6 | 2.5 |
| D7-70 | 70.3 | 2.2 | 70.1 | 1.2 |
| D9-30 | 30.2 | 1.3 | 29.6 | 4.5 |
| D9-7 | 7.0 | 1.0 | 5.3 | 6.2 |
| D9-75 | 75.5 | 0.8 | 74.4 | 1.7 |
| F1-15 | 15.0 | 1.4 | 11.4 | 5.8 |
| F1-45 | 45.1 | 1.7 | 43.4 | 3.8 |
| F1-90 | 90.3 | 1.8 | 89.4 | 1.3 |

Após a validação do modelo, as 64 amostras comerciais tiveram seu teor de adulteração preditos. O resultado da predição das amostras comerciais podem ser observados na Tabela 8 e comparado com teor de referência obtido por ERETIC2. O RMSEP do conjunto de predição foi de 12,45%.

Tabela 8 - Predição de amostras autênticas e comerciais por PLSR

| Amostra | % Teor de Referência por (ERETIC2) | Desvio médio ± | % TEOR DE ADULTERANTE Predição (Fator 1) PLSR | Desvio médio ± |
|---------|------------------------------------|----------------|---|----------------|
| D1 | não se aplica | - | 4.7 | 5.1 |
| D2 | não se aplica | - | -4.7 | 7.4 |
| D3 | não se aplica | - | 2.2 | 4.7 |
| D4 | não se aplica | - | 1.4 | 4.9 |
| D5 | não se aplica | - | 2.4 | 3.4 |
| D6 | não se aplica | - | -5.0 | 9.9 |
| D7 | não se aplica | - | -1.4 | 3.7 |
| D8 | não se aplica | - | 3.5 | 5.8 |
| D9 | não se aplica | - | -2.4 | 6.8 |
| D10 | não se aplica | - | 1.8 | 4.2 |
| F1 | não se aplica | - | -1.1 | 8.2 |
| BM1 | não se aplica | - | -5.7 | 12.8 |
| ACM1 | não se aplica | - | -0.8 | 8.5 |
| ACM2 | 8.8 | 4.4 | 6.1 | 5.5 |
| ACM3 | 83.7 | 2.2 | 79.7 | 1.2 |
| ACM4 | 13.8 | 2.9 | -0.6 | 6.3 |
| ACM5 | 40.8 | 5.3 | 41.8 | 2.8 |
| ACM6 | 3.2 | 0.9 | 1.8 | 4.2 |
| ACM7 | 85.4 | 2.9 | 83.1 | 1.2 |
| ACM8* | 4.4 | 1.1 | 66.9 | 21.0 |
| ACM9 | 57.6 | 0.9 | 57.5 | 2.4 |
| ACM10 | 79.1 | 0.8 | 76.0 | 1.7 |
| ACM11 | 26.3 | 1.3 | 23.7 | 3.6 |
| ACM12 | 34.9 | 0.6 | 32.0 | 3.4 |
| ACM13 | 86.6 | 1.2 | 82.4 | 1.6 |
| ACM14 | não se aplica | - | 0.5 | 6.5 |
| ACM15 | não se aplica | - | 0.5 | 5.3 |
| ACM16 | não se aplica | - | -4.4 | 11.7 |
| ACM17 | não se aplica | - | -4.6 | 10.1 |
| ACM18 | 5.5 | 0.3 | 0.5 | 7.1 |
| ACM19 | 5.8 | 1.1 | 1.9 | 6.5 |
| ACM20 | 6.0 | 0.9 | 1.4 | 7.1 |
| ACM21 | 6.3 | 0.9 | 1.6 | 6.7 |
| ACM22 | 6.7 | 0.3 | 2.0 | 6.3 |
| ACM23 | 6.6 | 0.1 | 1.5 | 6.8 |
| ACM24 | 5.9 | 0.0 | 1.1 | 7.0 |
| ACM25 | 4.3 | 1.2 | -0.2 | 4.9 |
| ACM26 | não se aplica | - | -0.1 | 4.5 |
| ACM27 | não se aplica | - | -1.2 | 4.8 |
| ACM28 | não se aplica | - | 0.6 | 5.9 |
| ACM29 | não se aplica | - | 1.3 | 5.8 |

| Amostra | % Teor de Referência por (ERETIC2) | Desvio médio ± | % TEOR DE ADULTERANTE Predição (Fator 1) PLSR | Desvio médio ± |
|---------|------------------------------------|----------------|---|----------------|
| ACM30 | não se aplica | - | 2.9 | 6.6 |
| ACM31 | não se aplica | - | 1.5 | 6.4 |
| ACM32 | não se aplica | - | 0.1 | 5.3 |
| ACM33 | 4.5 | 0.2 | 3.5 | 4.8 |
| ACM34 | 27.7 | 0.6 | 26.6 | 6.2 |
| ACM35 | 10.2 | 0.5 | 10.1 | 4.4 |
| ACM36 | 14.6 | 0.4 | 12.5 | 6.0 |
| ACM37 | 20.8 | 0.9 | 22.6 | 6.6 |
| ACM38 | 10.6 | 0.8 | 9.4 | 4.4 |
| ACM39 | 24.4 | 1.1 | 29.1 | 6.0 |
| ACM40 | 27.1 | 1.5 | 31.6 | 4.7 |
| ACM41 | 24.1 | 0.0 | 27.8 | 5.8 |
| ACM42 | 11.7 | 0.9 | 11.4 | 4.5 |
| ACM43 | 19.5 | 0.8 | 17.8 | 4.8 |
| ACM44 | 17.6 | 0.6 | 14.5 | 6.5 |
| ACM45 | 15.7 | 0.2 | 14.4 | 7.1 |
| ACM46 | 23.1 | 1.4 | 30.7 | 6.0 |
| ACM47 | 20.4 | 0.6 | 22.7 | 6.6 |
| ACM48 | 12.7 | 0.5 | 12.0 | 4.5 |
| ACM49 | 15.3 | 0.5 | 13.9 | 5.3 |
| ACM50 | 17.5 | 0.5 | 17.9 | 7.3 |
| ACM51 | 24.1 | 1.0 | 25.7 | 6.4 |
| ACM52 | 14.5 | 0.6 | 15.4 | 7.5 |
| ACM53 | 22.8 | 1.1 | 26.5 | 4.2 |
| ACM54 | 7.2 | 0.5 | 5.7 | 5.1 |
| ACM55 | 25.7 | 0.4 | 26.5 | 5.3 |
| ACM56 | não se aplica | - | -0.2 | 5.7 |
| ACM57 | não se aplica | - | -5.3 | 10.6 |
| ACM58 | não se aplica | - | -3.0 | 7.9 |
| ACP1 | 1.0 | 0.3 | -0.7 | 6.4 |
| ACP2 | 83.1 | 0.6 | 81.1 | 1.9 |
| ACP3 | 86.6 | 4.6 | 73.7 | 4.3 |
| ACP4 | 92.5 | 1.5 | 89.5 | 1.6 |
| ACSC1* | -0.6 | 0.7 | 82.0 | 25.8 |
| ACSC2 | 96.0 | 1.1 | 94.5 | 3.9 |

* Amostras comerciais contendo óleo mineral

Gráficos comparativos do teor de adulterante obtidos por RMN de alta resolução através do ERETIC2 e do PLSR podem ser observados na Figura 30. Os teores encontrados entre as duas abordagens apresentaram boa concordância entre si, embora o desvio padrão apresentado pelo PLSR seja ligeiramente maior. Observa-se ainda que o PLSR, que foi calibrado para detectar óleo de soja, classifica erroneamente amostras contendo óleo mineral, como as amostras ACM8 e ACSC1. Para essas amostras é necessária uma curva calibrada exclusivamente para óleo mineral.

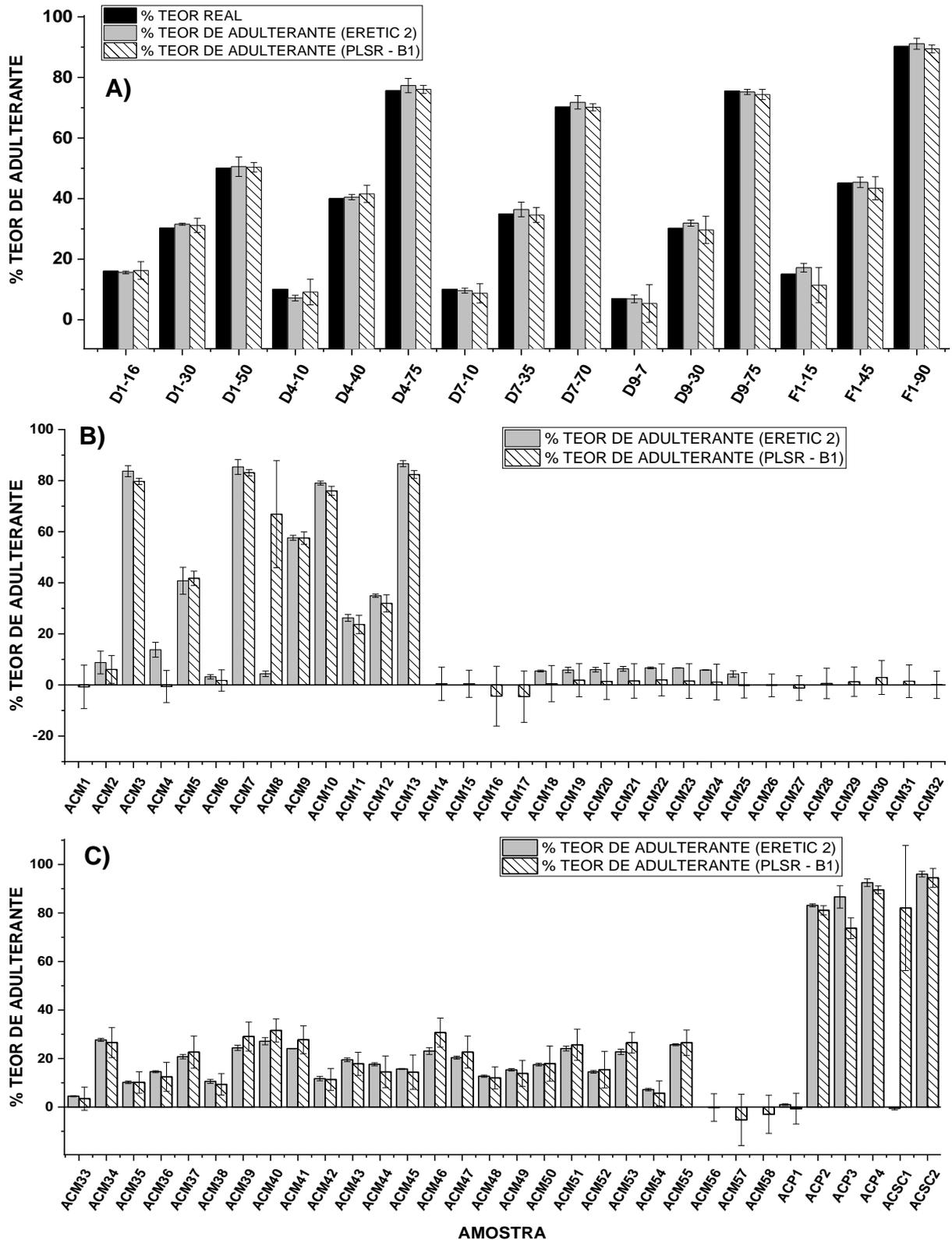


Figura 30 - Comparativo do Teor de adulterante obtido por ERETIC2 e PLSR. A) Conjunto de Validação; B e C) Conjunto de predição: Amostras Comerciais

Certamente, o uso do PLSR seria uma abordagem satisfatória caso o ERETIC2 não fosse possível de ser executado. Porém, certamente o ERETIC2 apresenta diversas vantagens frente ao PLSR, pois é menos laborioso, mais simples, com melhor precisão e resultando em menores desvios. No entanto, em casos onde o adulterante é óleo mineral, por exemplo, não é possível quantificá-lo por ERETIC2, visto que há coalescência de sinais entre os sinais do óleo mineral e do óleo de copaíba. Nesse caso, sim, um modelo PLSR calibrado com *blends* preparados com óleo mineral, se sairia melhor.

Embora, a adulteração com óleo mineral não seja tão comum, devido a sua maior viscosidade, coloração transparente, que clareia o óleo de copaíba, e maior preço quando comparado ao óleo de soja, o seu uso é menos acessível e inviável ao coletores no topo da cadeia de produção, onde se acredita ser o principal momento onde se realiza a adulteração.

Ainda assim, algumas empresas farmacêuticas utilizam-se da adição de óleo mineral ao óleo de copaíba com o objetivo de criar produtos para massagem. No entanto, geralmente a quantidade adicionada não é informada no rótulo, como é o caso da amostra ACM8. O espectro de RMN de ^1H dessa amostra se mostra muito similar ao óleo mineral puro, assim, estima-se um teor bastante elevado. Os espectros da amostra ACM8 e do óleo mineral puro podem ser visualizados no apêndice 1.

Embora nesse caso, não seja uma adulteração propriamente dita, uma vez que o rótulo informa a presença de óleo mineral, trata-se então de uma diluição. Diferentemente da amostra ACSC1 que apresenta adulteração com óleo mineral, uma vez que seu rótulo o apresenta como óleo de copaíba puro.

Em resultado, dentro do conjunto de 64 amostras comerciais obtidas para esse trabalho, por ERETIC2 verificou-se que apenas 16 amostras são autênticas e 48 amostras apresentaram adulteração, ou seja, 75% das amostras comerciais de óleo de copaíba não são autênticas. O teor de adulteração das 48 amostras comerciais adulteradas variou entre 5 a 10% para 12 amostras, entre 10 a 20% para 12 amostras, entre 20 a 30% para 11 amostras, entre 30 a 50% para 2 amostras, entre 50 a 80% para 2 amostras, e mais de 80% para 7 amostras, além de 2 amostras adulteradas com óleo mineral Resultando em 57,8% das amostras comerciais com teor de adulteração de até 50%, e 14,1% com teor de adulteração maior que 50%.

6.3. VERIFICAÇÃO DE AUTENTICIDADE DO ÓLEO DE COPAIBA POR RMN NO DOMÍNIO DO TEMPO

Um experimento preliminar realizado com 12 amostras autênticas coletadas e 6 amostras comerciais (ACM1, ACM2, ACM3, ACP1, ACP2 e ACP3) foi realizado em um equipamento MiniSpec mq20 (19,9 MHz) na EMBRAPA Instrumentação em São Carlos/SP utilizando a sequência CPMG. Neste experimento variou-se a temperatura da amostra de 0 a 50 °C para verificar em qual condição de temperatura a separação das amostras autênticas das adulteradas seria mais eficiente. Foi verificado que o experimento apresentou melhor separação a 20 °C. Portanto, as análises posteriores por CPMG e SAFF foram realizadas a 20 °C.

A partir das curvas CPMG foram obtidos perfis de distribuição dos tempos de relaxação de T_2 pela transformada inversa de Laplace (ILT) das amostras autênticas de óleo de copaíba e do óleo de soja, os quais podem ser visualizados na Figura 31. Os perfis ILTs foram obtidos por um add-on do software OriginLab 9.5, nesse software não é necessário inserir um valor de α , contudo não é possível dizer se o mesmo calcula um valor ótimo de α ou se usa um valor padrão.

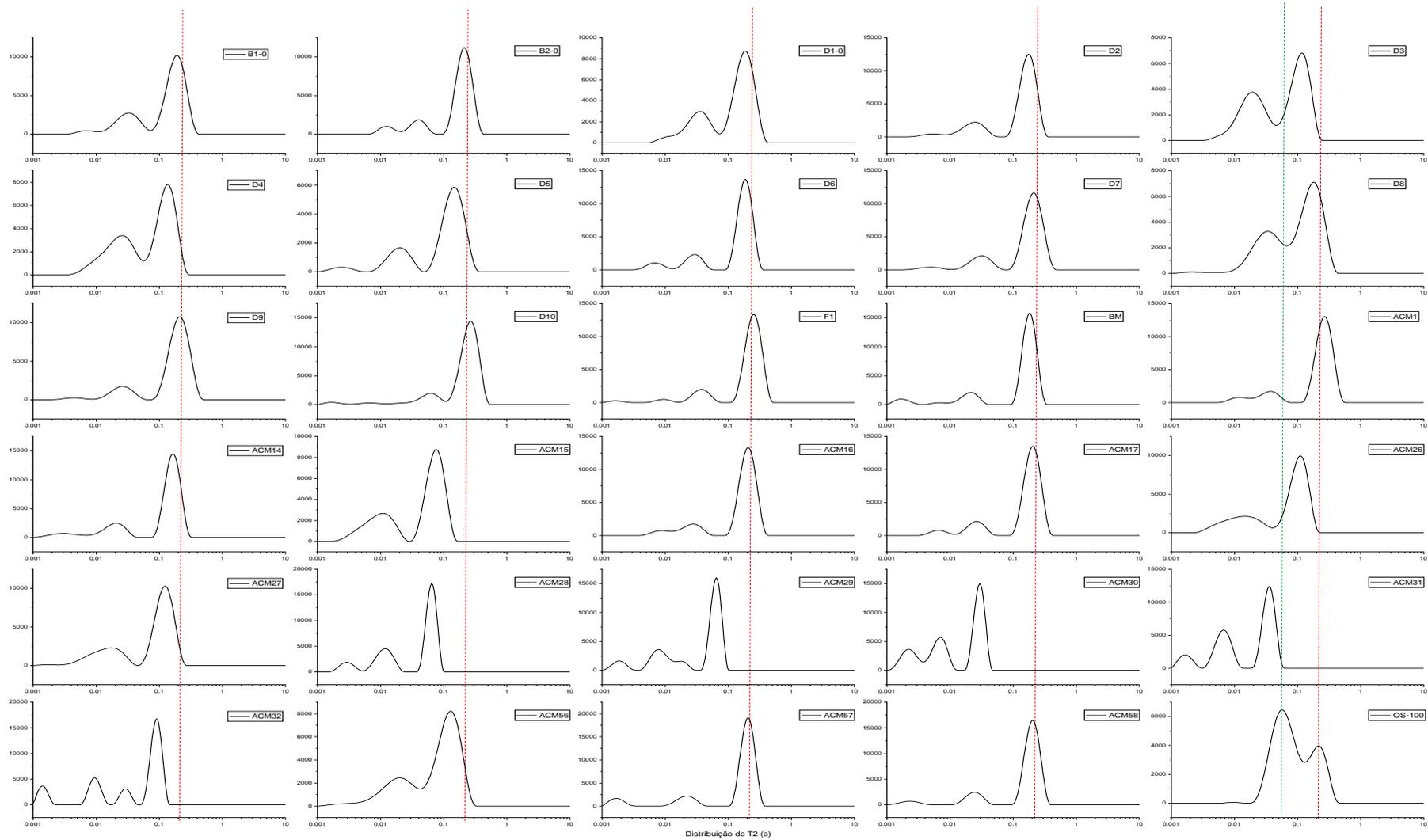


Figura 31 - Transformada Inversa de Laplace (ILT) para amostras autênticas de copaíba. Distribuição de T2 (CPMG)

O perfil ILT do óleo de soja apresenta dois picos, cujo pico menos intenso (~ 200 ms) possui tempo de relaxação T_2 similar ao pico mais intenso das copaíbas autênticas. Sabendo que o óleo de copaíba geralmente possui maior quantidade de sesquiterpenos, sugere-se que este pico mais intenso das amostras autênticas seja referente à parte sesquiterpênica do óleo de copaíba. O pico mais intenso do óleo de soja (~ 50 ms) encontra-se, geralmente, entre os dois picos das amostras autênticas.

Na condição de adição de adulterante a essas amostras autênticas é observada a formação de pico crescente similar ao maior pico do óleo de soja, conforme pode ser visto na Figura 32 e Figura 33, onde se observa a formação de um pico de maior intensidade conforme se aumenta o teor de adulterante. Esse comportamento indica que para as amostras de copaíba, um ajuste biexponencial é mais adequado.

Contudo, o uso da ILT para identificar uma amostra adulterada é limitada, conforme ainda se observa na Figura 31, pois os diferentes perfis de amostras autênticas dificultam a identificação de um comportamento típico. Isso se agrava no caso de uma amostra desconhecida. Como é o caso das amostras mais viscosas (D3, D4, D8, etc) que apresentam intensidade elevada entre os picos, similarmente ao das amostras adulteradas com óleo de soja. Portanto, essas amostras mesmo sendo autênticas, podem ser classificadas erroneamente como adulteradas pela análise das curvas de ILT.

Através dessa abordagem, para verificar autenticidade, apenas amostras com teor de adulterante acima de 70% conseguiriam ser identificadas com maior facilidade, pois geralmente é onde ocorre uma inversão da intensidade dos picos, passando a ter um perfil mais similar ao do óleo de soja. Já, as amostras ACM26 a ACM32 possuem um perfil diferenciado e um tempo de relaxação mais rápido, e sabendo que essas amostras são provenientes dos municípios de Maués e Humaitá localizados na região sul do estado do Amazonas, limítrofes aos estados do Pará e Roraima, sugere que foram obtidas de outras espécies de copaíba.

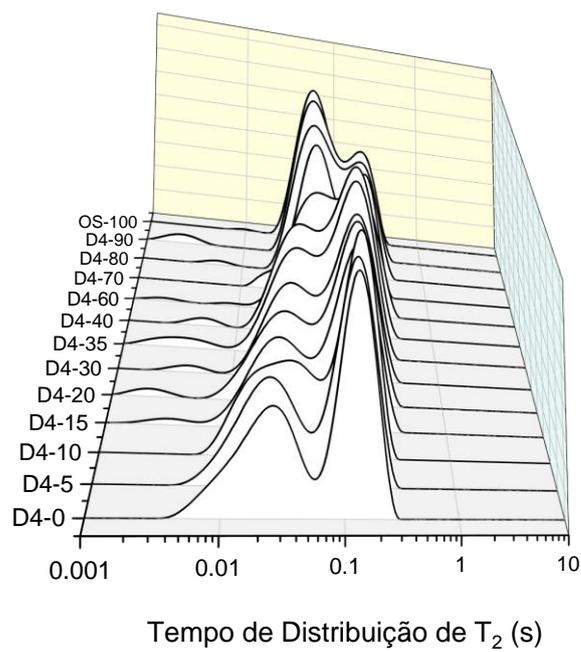
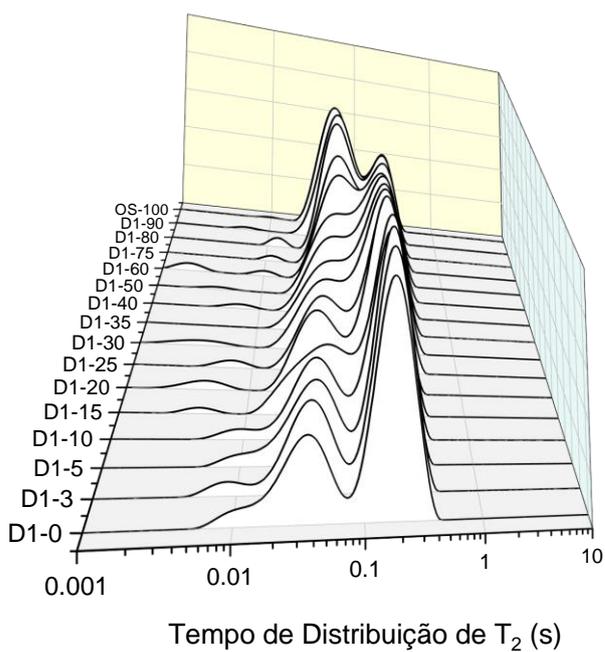
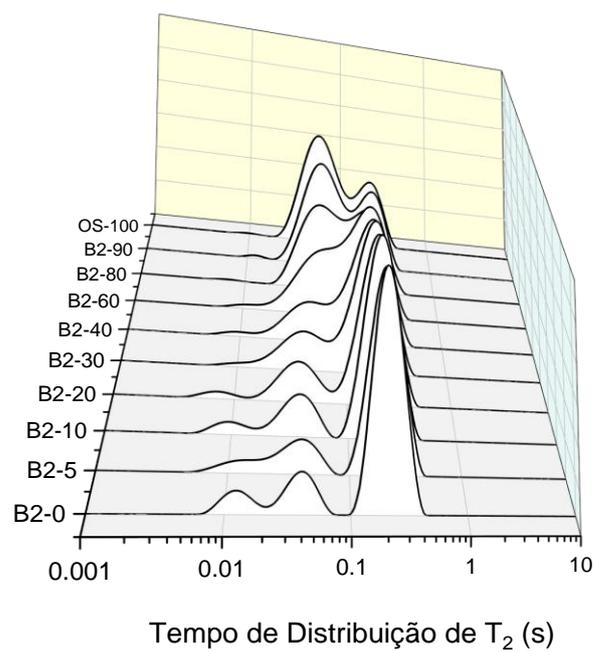
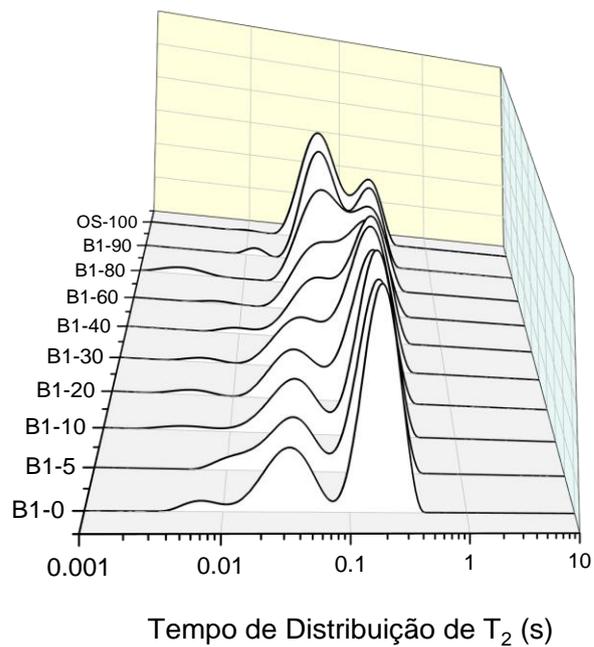


Figura 32 - ILT *blends* binários de copaíba: B1, B2, D1 e D4

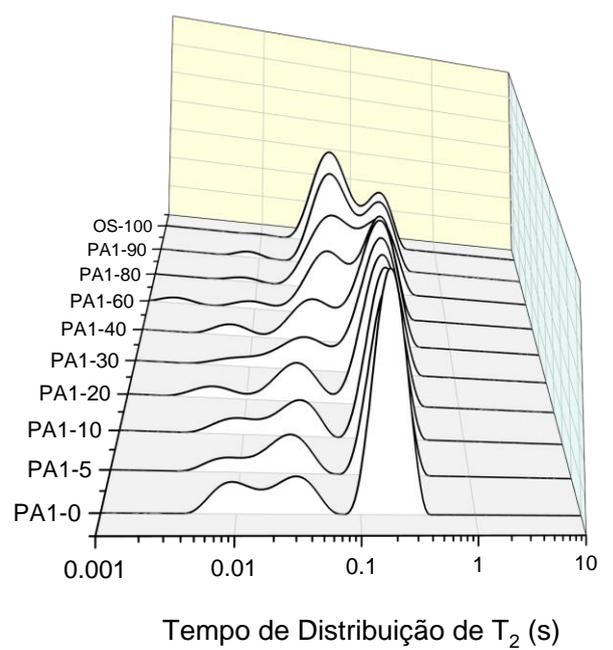
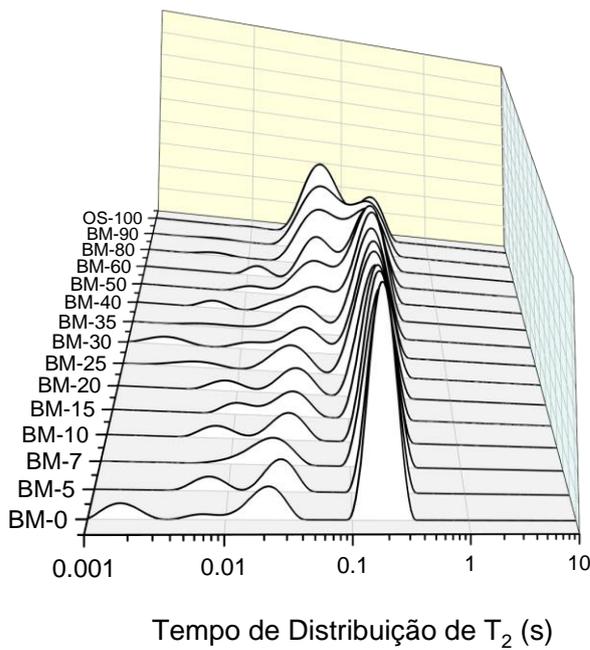
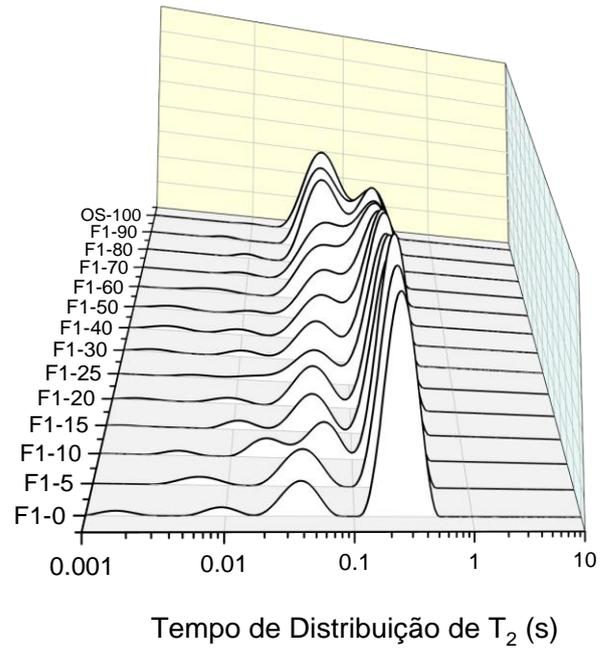
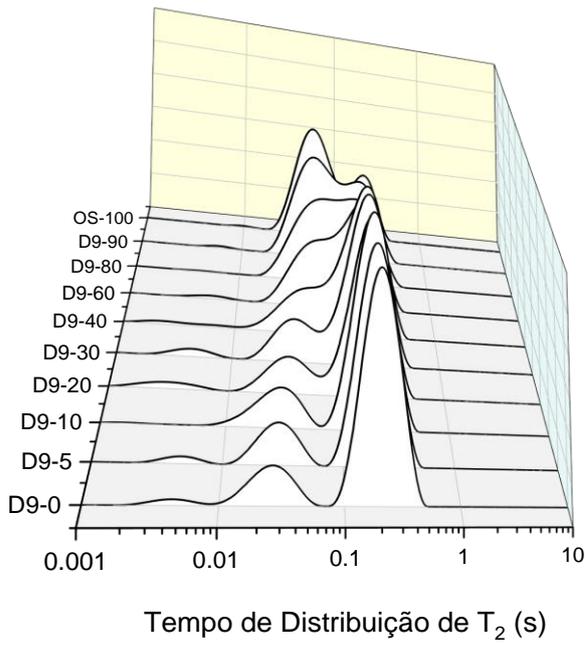


Figura 33 - ILT *blends* binários de copaíba: D9, F1, BM e PA1

Para os dados de RMN-DT o uso da curva completa de decaimento CPMG e SAFF não apresentaram separação satisfatória por PCA. Isto ocorre em devido à grande variabilidade química dos óleos de copaíba em relação ao adulterante (óleo de soja), que apesar do óleo de soja possuir um tempo de relaxação mais rápido que a maioria dos óleos de copaíba, ainda existem amostras autênticas de copaíba que relaxam mais rápido que o óleo de soja, conforme a Figura 34

Assim, não é possível identificar se é uma amostra é autêntica ou adulterada apenas observando a curva de decaimento obtidas por CPMG ou SAFF. Isto na prática, representa um grande empecilho para a construção de um modelo quimiométrico para verificar autenticidade, dificultando a separação das amostras autênticas das adulteradas.

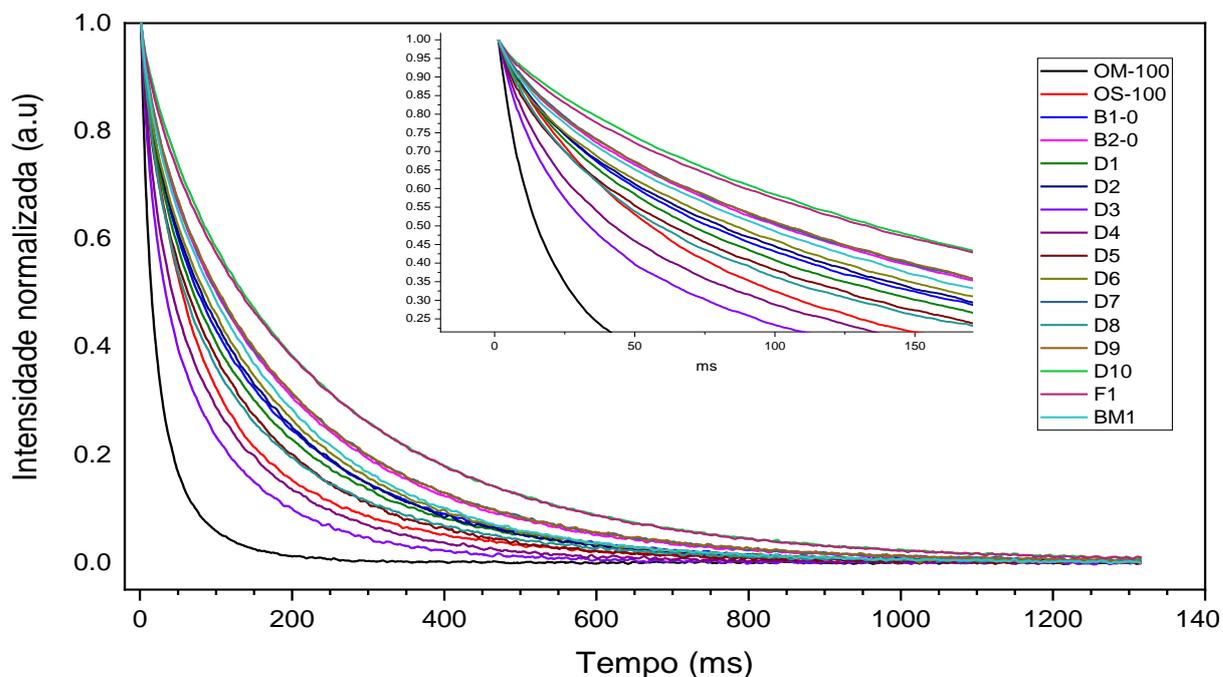


Figura 34 - Curva de decaimento CPMG das amostras autênticas de copaíba, óleo de soja e óleo mineral

Diante desta situação, uma abordagem utilizando ajuste exponencial foi aplicada para as curvas de decaimento de CPMG e SAFF. Através do ajuste exponencial são obtidos valores de relaxação e área, obtendo então as seguintes variáveis de acordo com o tipo de ajuste exponencial:

- $[T_1 \text{ ou } T_2 \text{ e } A_1]$ para ajuste monoexponencial;
- $[T_{x,1}, T_{x,2} \text{ e } A_1, A_2]$ para o ajuste biexponencial;
- $[T_{x,1}, T_{x,2}, T_{x,3} \text{ e } A_1, A_2, A_3]$ para o ajuste triexponencial;

onde o x é 1 para T_1 (SAFF) e 2 para T_2 (CPMG), totalizando 2, 4 ou 6 variáveis, respectivamente.

Já sabendo da dificuldade de separação em decorrência da variabilidade química, analisou-se os gráficos dos valores obtidos (variáveis discretas) a partir dos ajustes mono-, bi- e triexponencial em função do teor de adulterante (%) para todas as amostras, com o objetivo de verificar quais variáveis são mais apropriadas para a melhor diferenciação entre as amostras. As distribuições dessas variáveis podem ser observadas na Figura 35 a 38. As melhores variáveis serão aquelas que apresentarem maior distanciamento, dos valores de relaxação ou área, entre os limites do gráfico (amostras autênticas (em 0%) e do adulterante (100%)), resultando, portanto, numa curva crescente a cada aumento de adulteração, similar a uma curva de calibração.

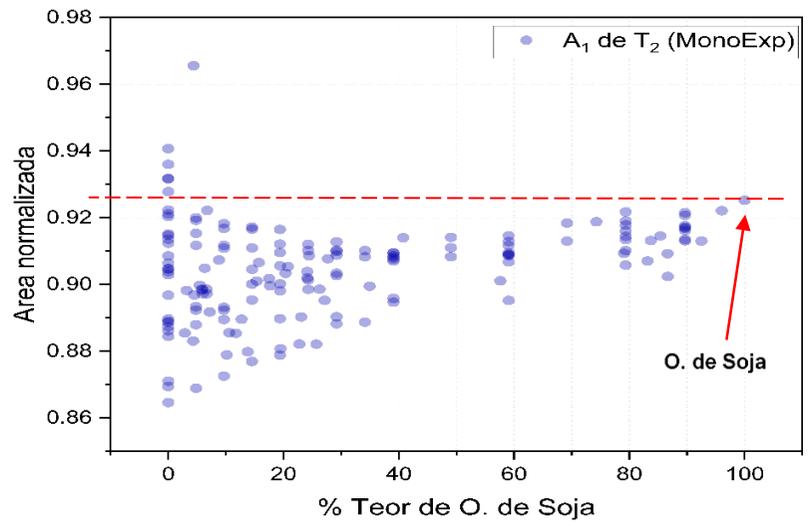
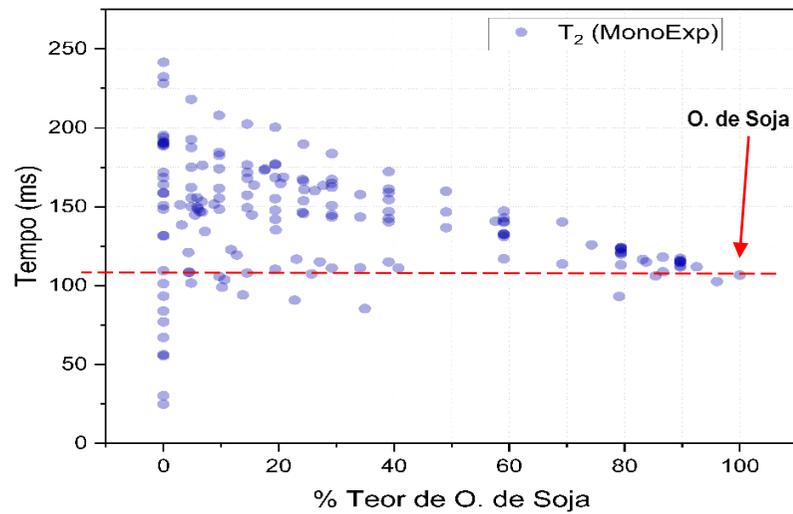
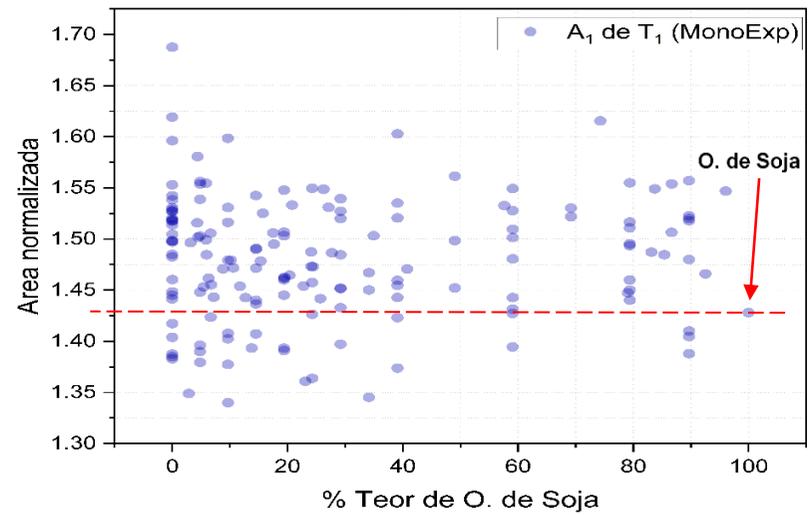
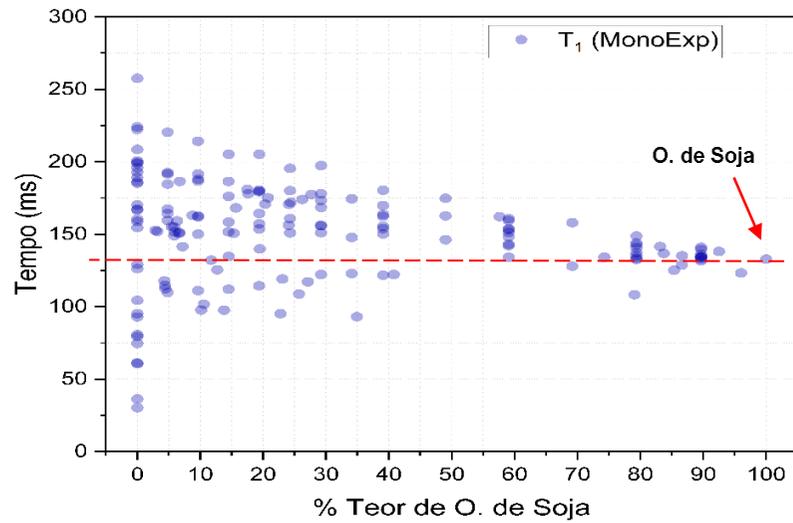


Figura 35 - Variáveis obtidas por ajuste Monoexponencial de SAFF (T_1 e A_1) e CPMG (T_2 e A_1)

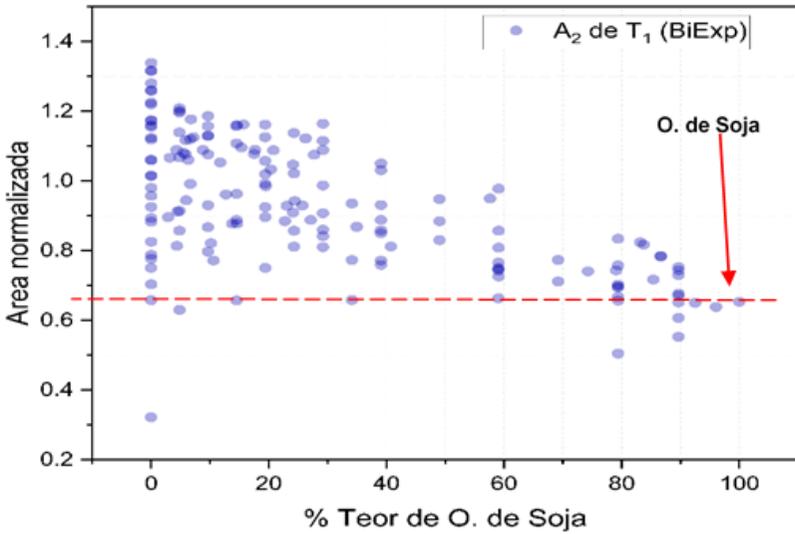
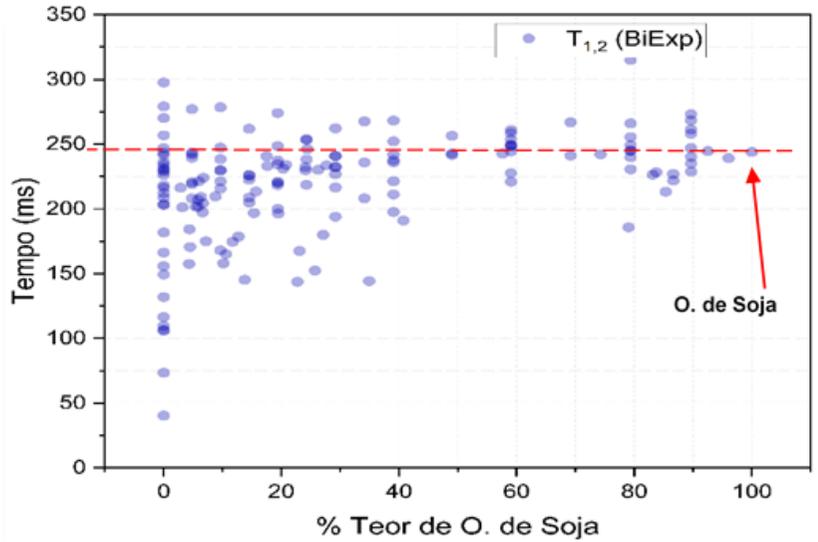
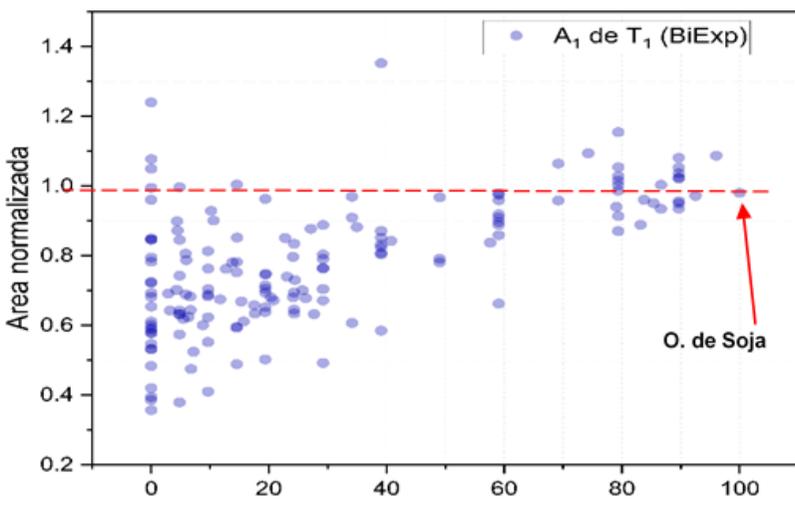
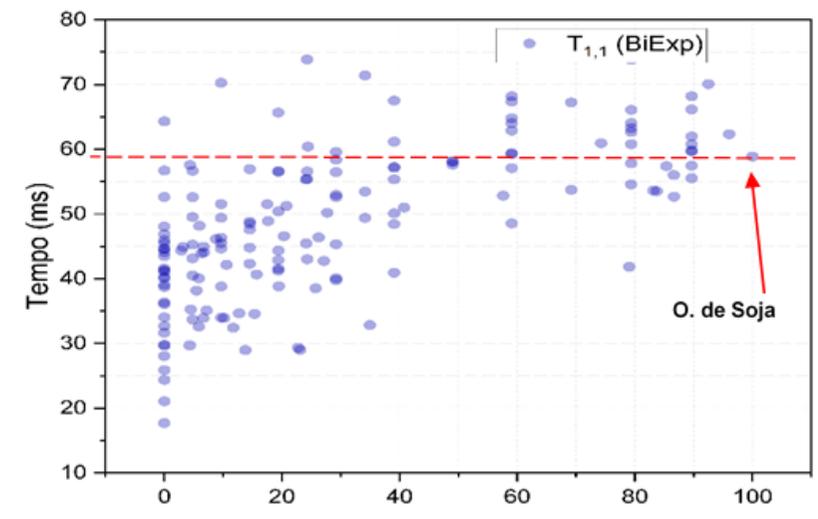


Figura 36 - Variáveis obtidas por ajuste biexponencial de SAFF

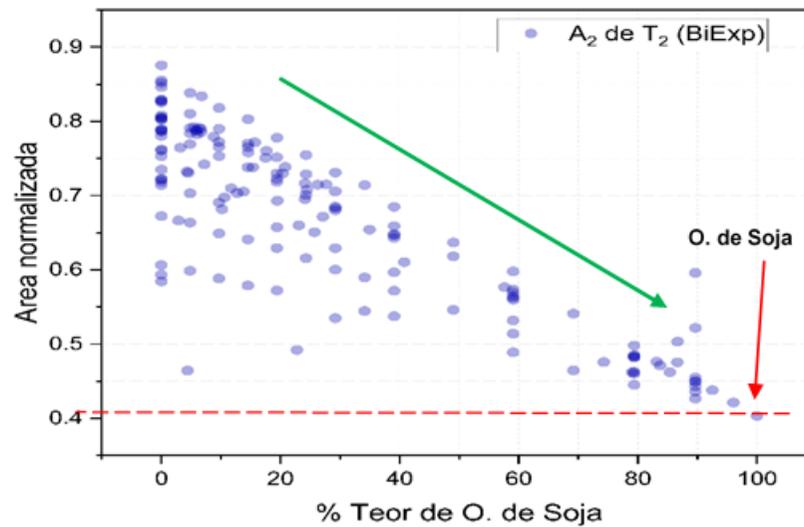
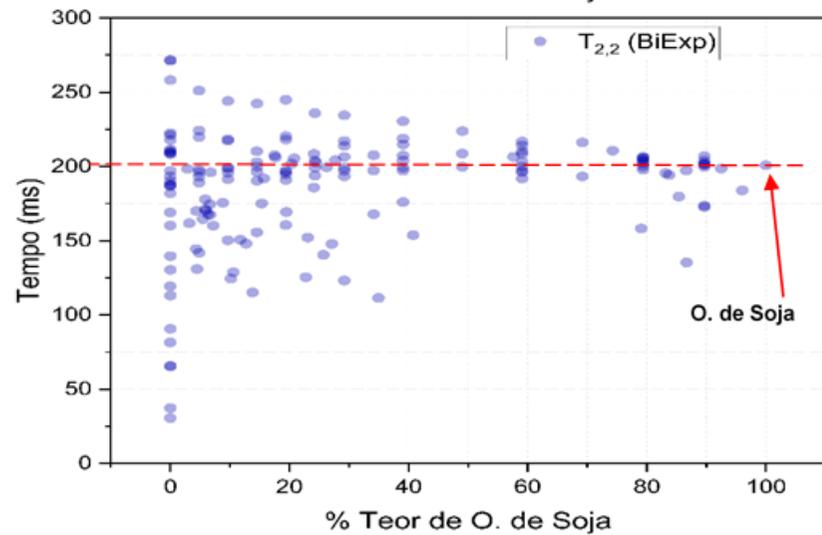
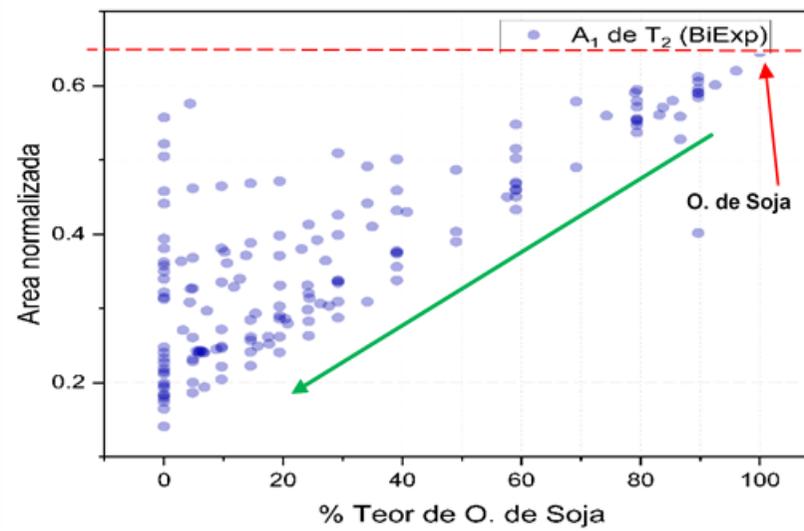
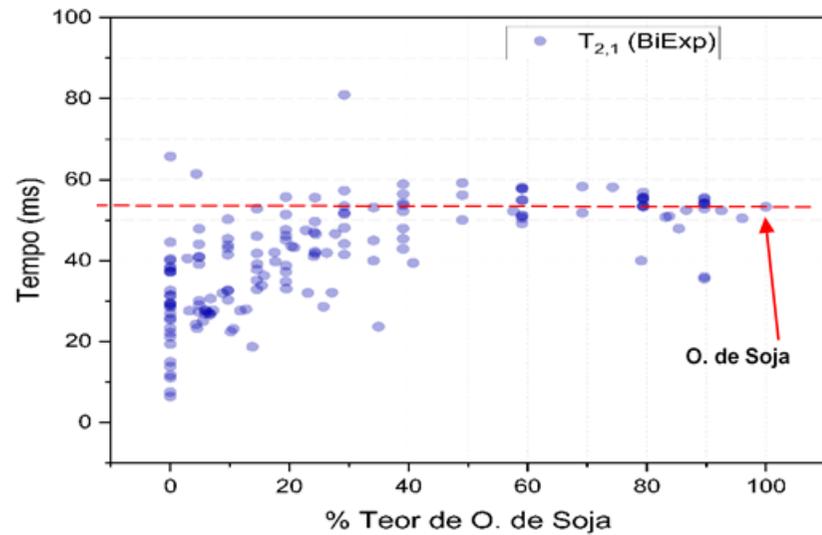


Figura 37 - Variáveis obtidas por ajuste biexponencial de CPMG

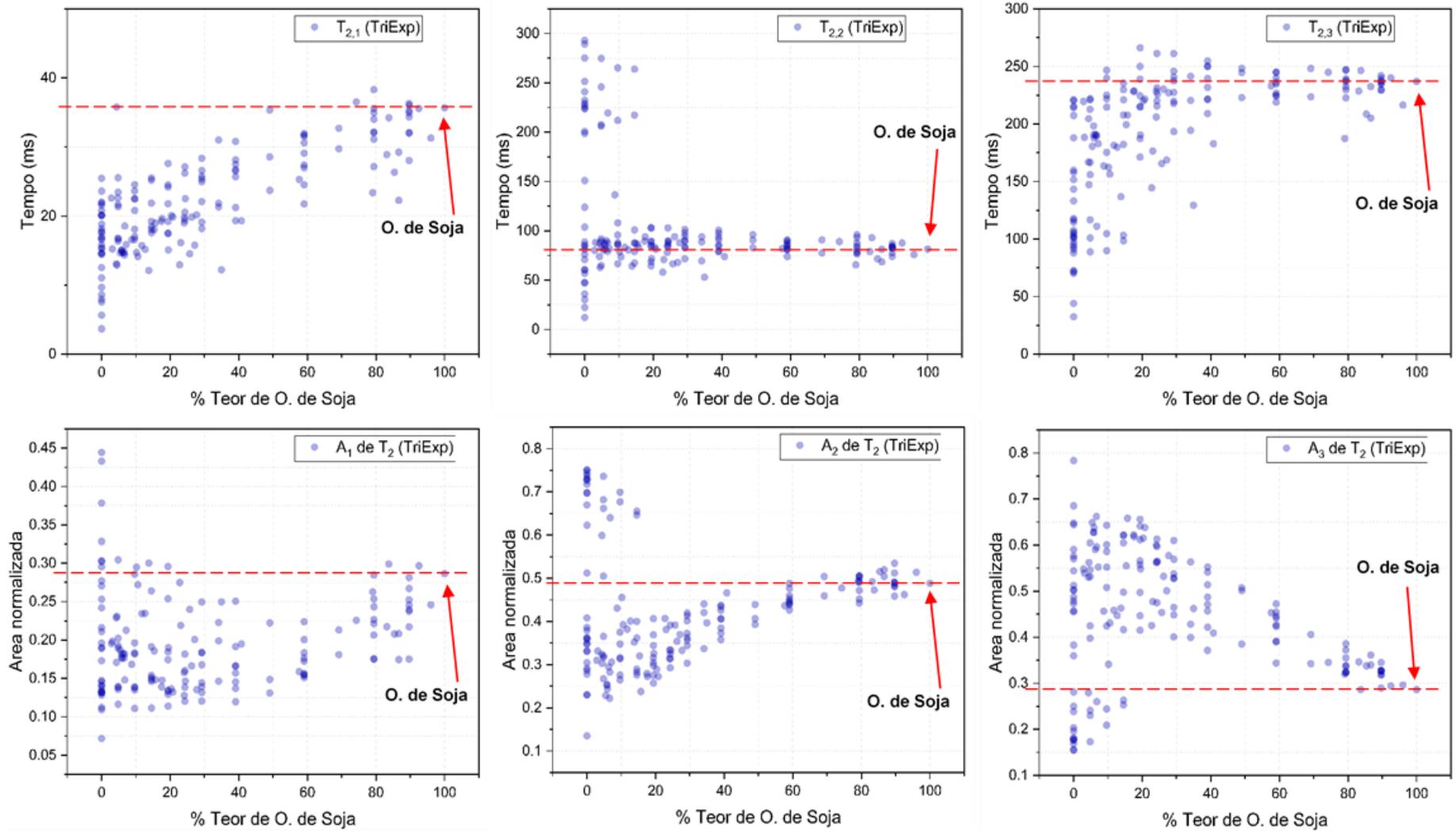


Figura 38 - Variáveis obtidas por ajuste triexponencial de CPMG

Observando no eixo y para o ajuste monoexponencial, os valores de relaxação T_1 , T_2 ou área da amostra de óleo de soja (único ponto em 100%), verifica-se que para a maioria das variáveis, as amostras com teor de adulterante entre 5 e 95 % possuem valores bem próximos entre si e ao do óleo de soja, demonstrando que através dessa variável não é possível distinguir uma amostra autêntica de outra adulterada.

Entre as amostras autênticas (pontos em 0%) verifica-se a grande variabilidade dos valores de relaxação e área, estando diretamente relacionada a variabilidade química, conforme se aumenta a adulteração a variabilidade tende a diminuir, o que explica o “formato de cone” observado na maioria das variáveis.

Assim, as variáveis mais promissoras foram aquelas obtidas a partir das curvas de CPMG com ajuste biexponencial, sendo as variáveis de áreas (A_1 e A_2) as que apresentaram maior diferenciação entre o óleo de soja e as demais amostras autênticas (todos os pontos em 0%), conforme a Figura 37. Essa mesma tendência foi identificada nas curvas de ILT dos *blends* na Figura 32 e Figura 33, onde ocorre a inversão dos valores de área conforme o aumento do teor de adulterante, com a diminuição da área A_2 e acréscimo da área A_1 de T_2 , tornando-se mais similar ao perfil do óleo de soja.

Assim, a PCA foi realizada para os dados de RMN-DT apenas com os valores discretos obtidos a partir do ajuste biexponencial das curvas de CPMG e SAFF, pois esse tratamento foi o que apresentou melhor diferenciação entre amostras autênticas e adulteradas. De tal modo, foram criados modelos de PCA utilizando apenas os valores isolados de tempo de relaxação (T_1 e/ou T_2) ou área ($A_{1,1}$, $A_{1,2}$, e/ou $A_{2,1}$, $A_{2,2}$), e também em conjunto (tempo de relaxação + área) resultando em 9 modelos quimiométricos:

- $T_{1,1}$ e $T_{1,2}$ (SAFF)
- A_1 e A_2 (SAFF)
- $T_{1,1}$ e $T_{1,2} + A_1$ e A_2 (SAFF)
- $T_{2,1}$ e $T_{2,2}$ (CPMG)
- A_1 e A_2 (CPMG)
- $T_{2,1}$ e $T_{2,2} + A_1$ e A_2 (CPMG)
- $T_{1,1}$ e $T_{1,2}$ (SAFF) + $T_{2,1}$ e $T_{2,2}$ (CPMG)
- A_1 e A_2 (SAFF) + A_1 e A_2 (CPMG)
- $T_{1,1}$ e $T_{1,2} + A_1$ e A_2 (SAFF) + $T_{2,1}$ e $T_{2,2} + A_1$ e A_2 (CPMG)

Os gráficos de *scores* e *loadings* das PCA obtidas dos modelos exponenciais citados acima podem ser visualizados na Figura 39 a 46.

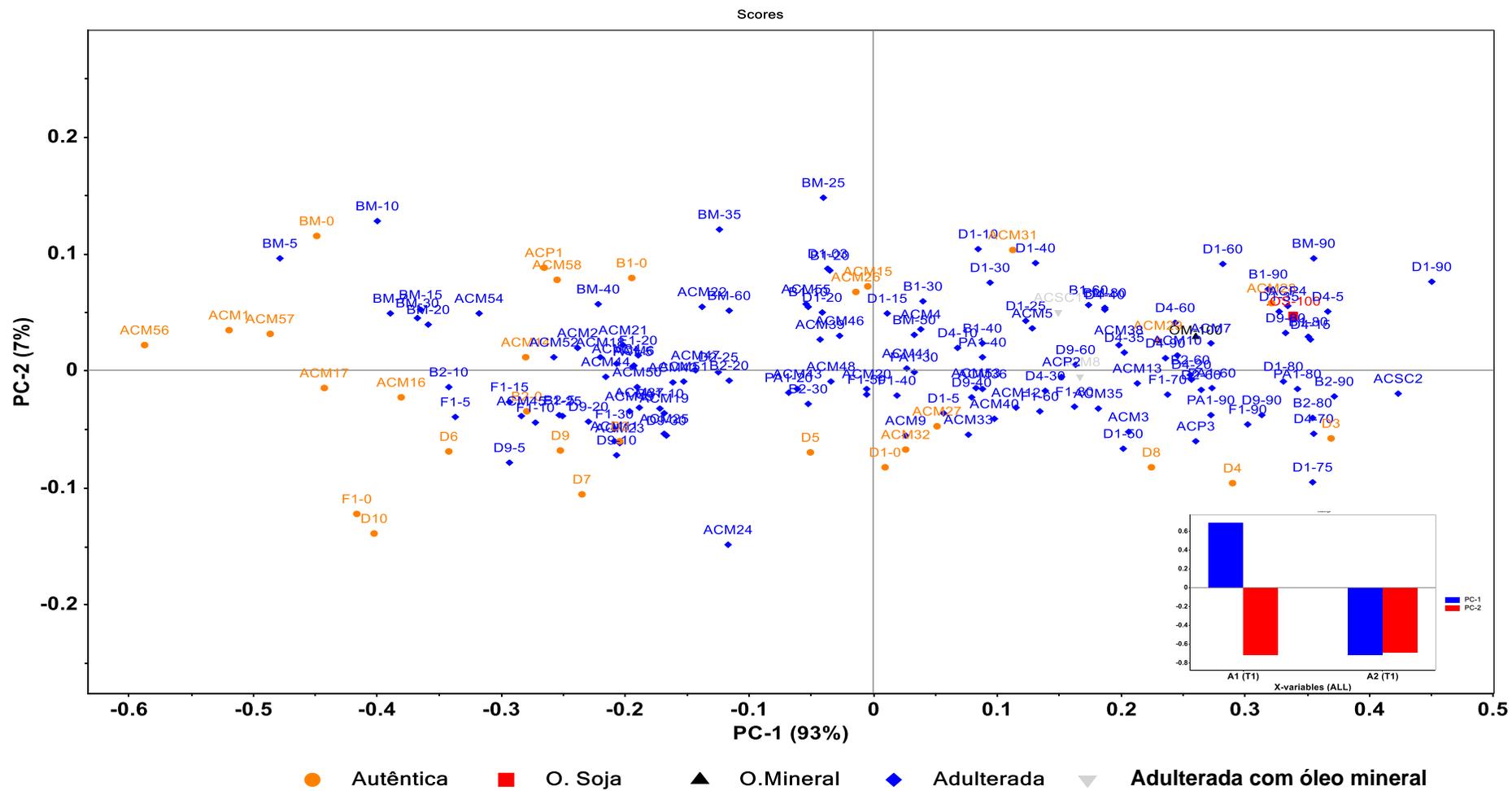


Figura 39 - Gráfico de scores e loadings da PCA dos dados biexponenciais de SAFF: A₁ e A₂

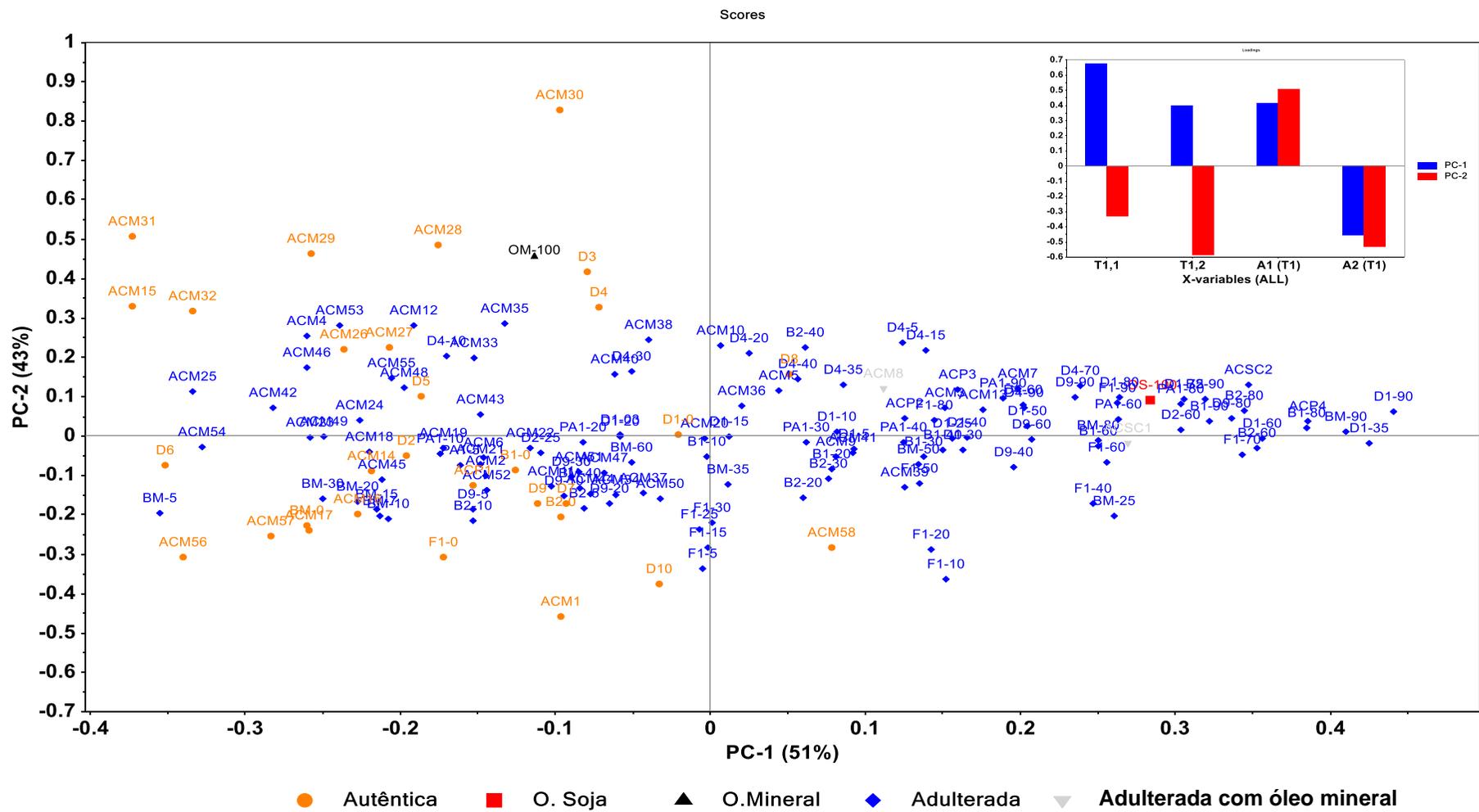


Figura 40 - Gráfico de scores e loadings da PCA dos dados biexponenciais de SAFF: T_{1,1}, T_{1,2} e A₁, A₂

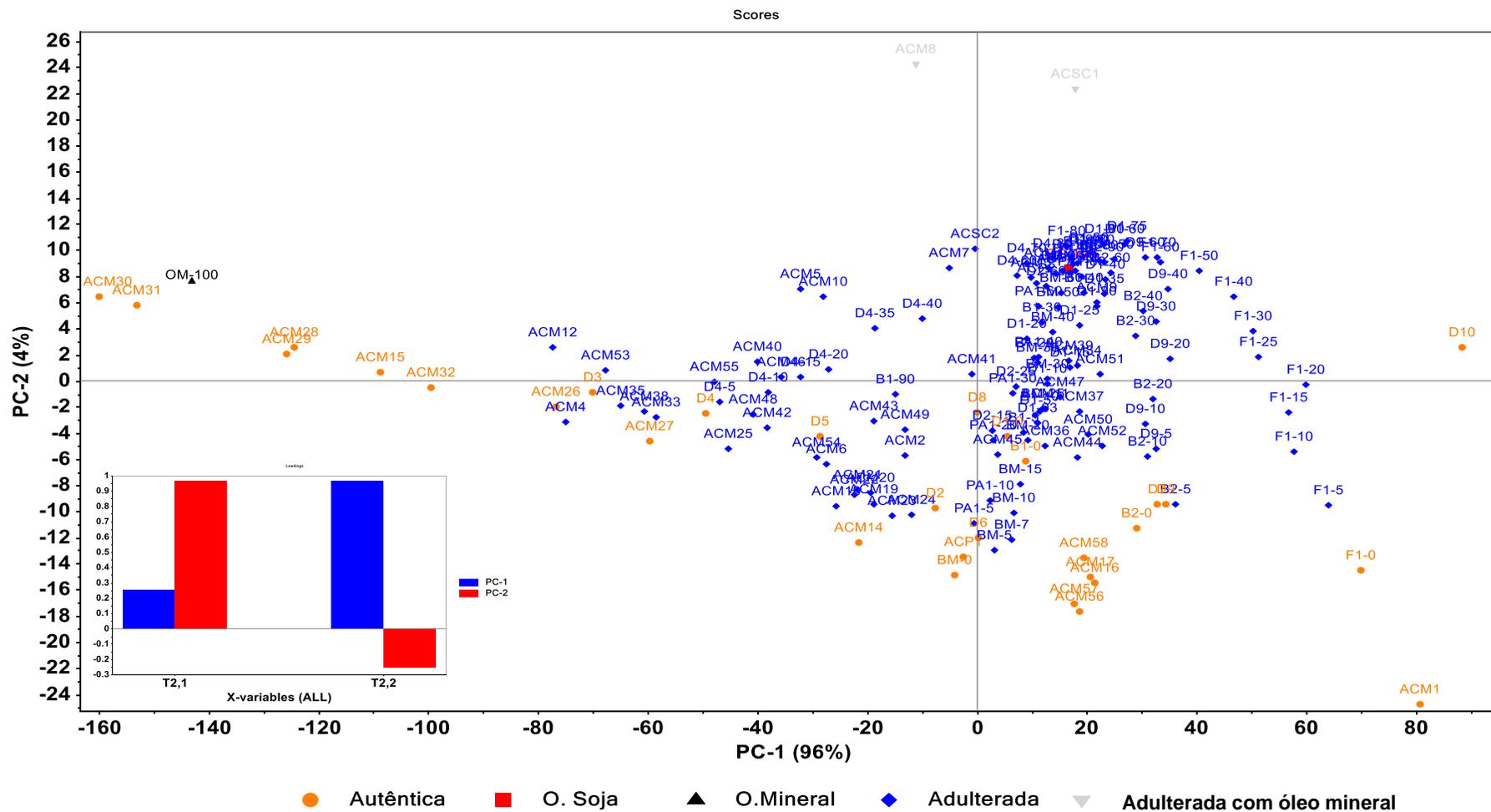


Figura 41 - Gráfico de *scores* e *loadings* da PCA dos dados biexponenciais de CPMG: T_{2,1} e T_{2,2}

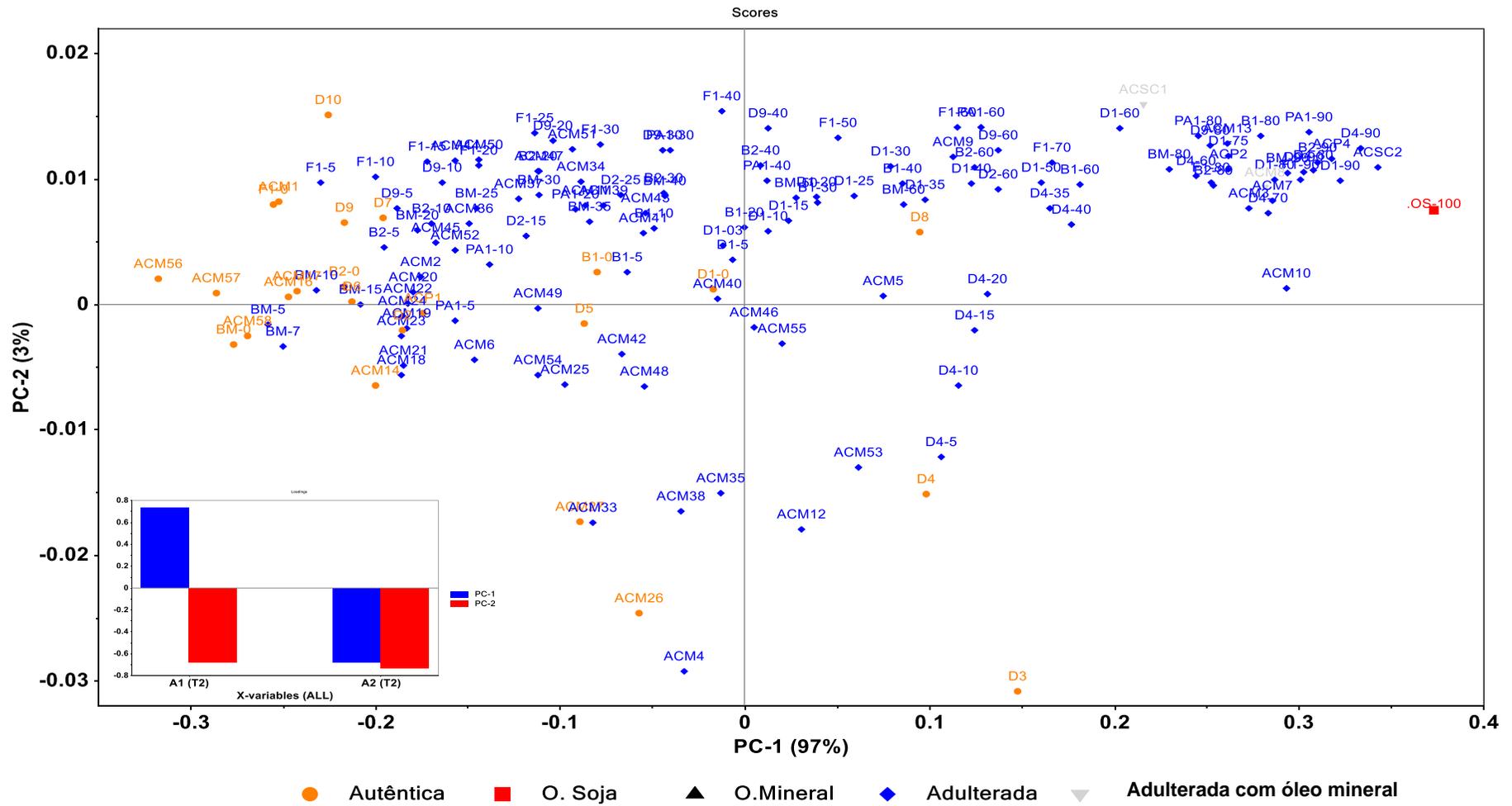


Figura 42 - Gráficos de *scores* e *loadings* da PCA dos dados biexponenciais de CPMG: A1, A2

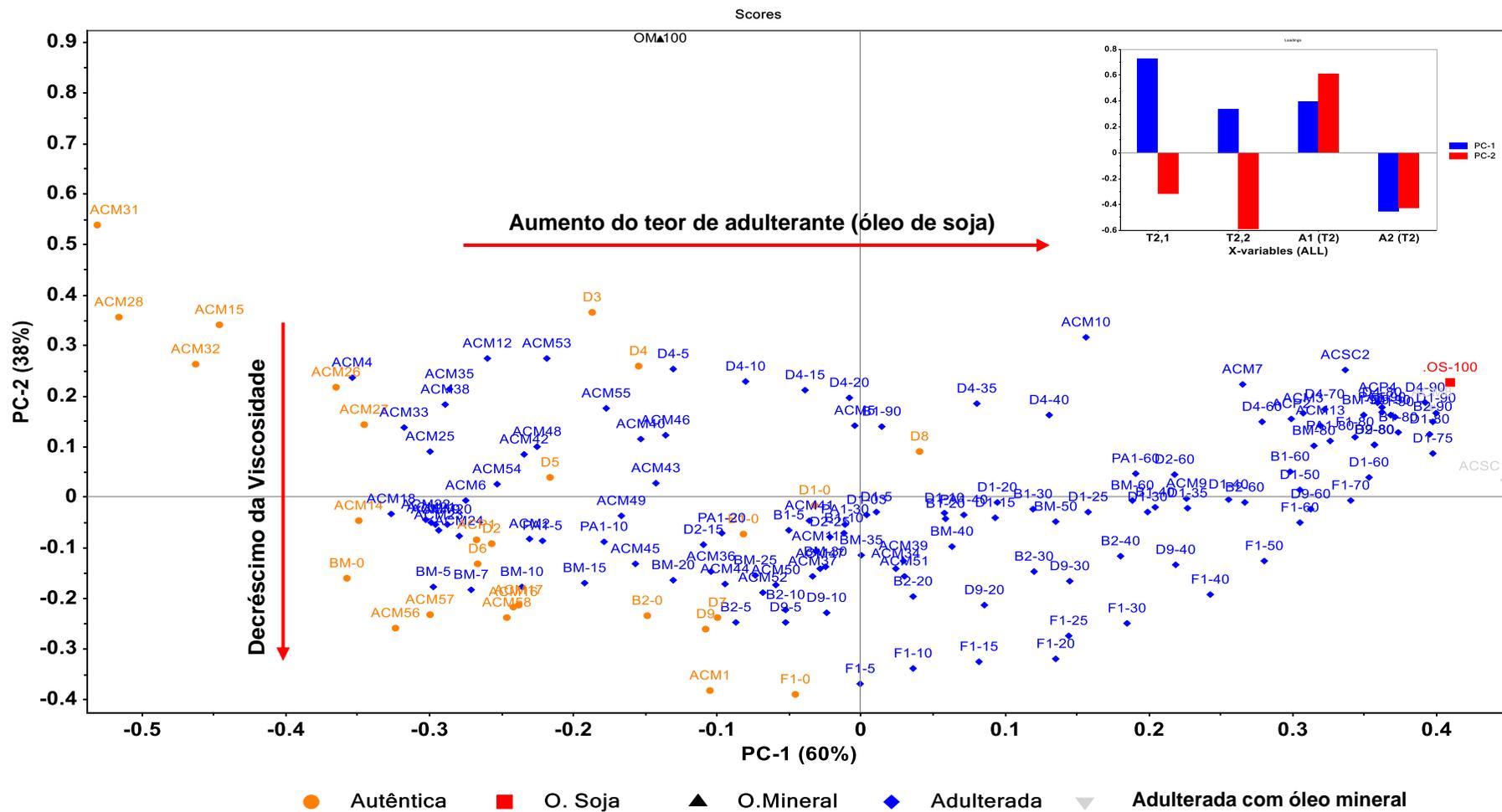


Figura 43 - Gráficos de *scores* e *loadings* da PCA dos dados biexponenciais de CPMG: T_{2,1}, T_{2,2} e A₁, A₂

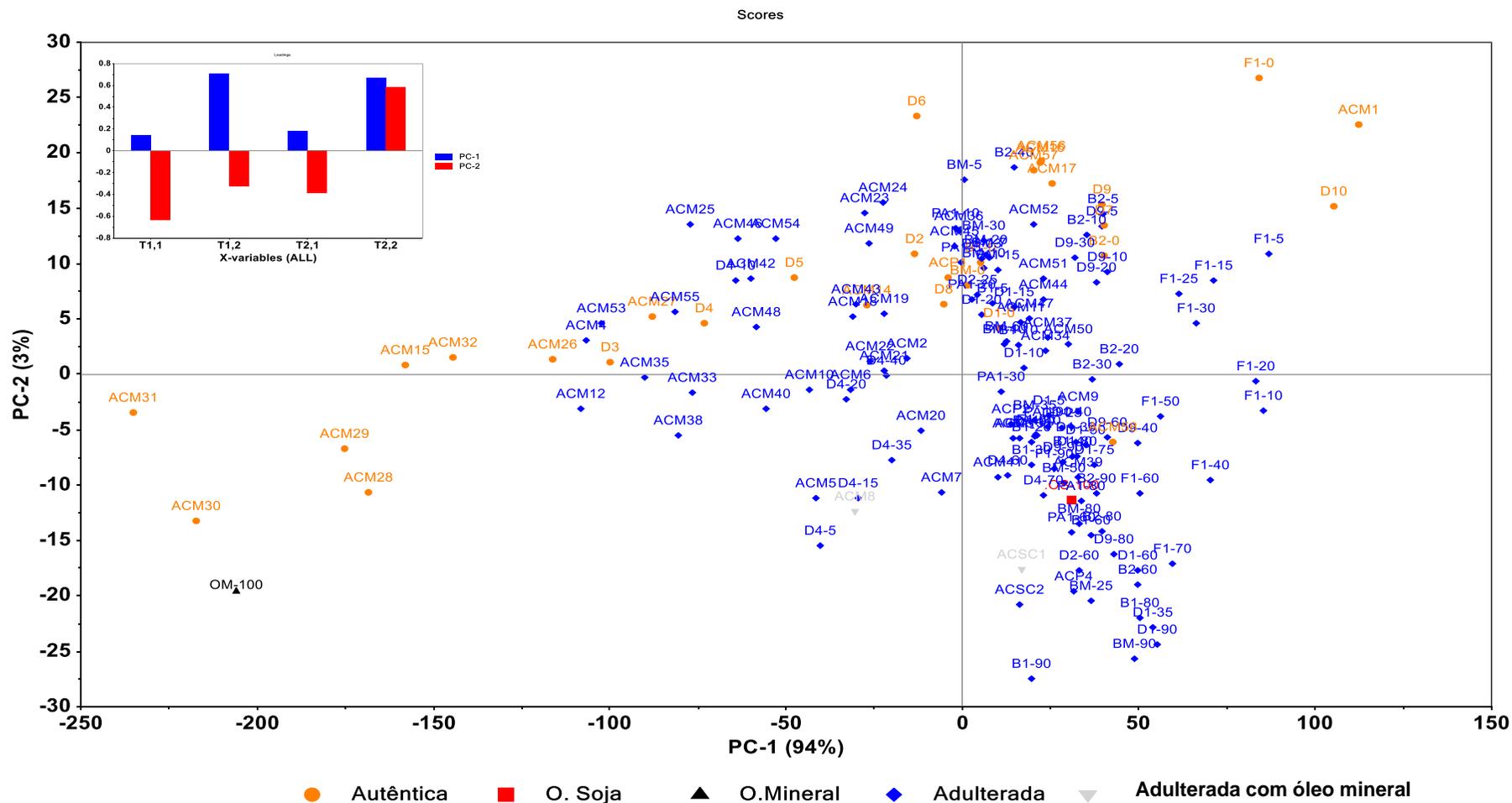


Figura 44 - Gráficos de scores e loadings da PCA dos dados biexponenciais de SAFF e CPMG: T_{1,1}, T_{1,2} e T_{2,1}, T_{2,2}

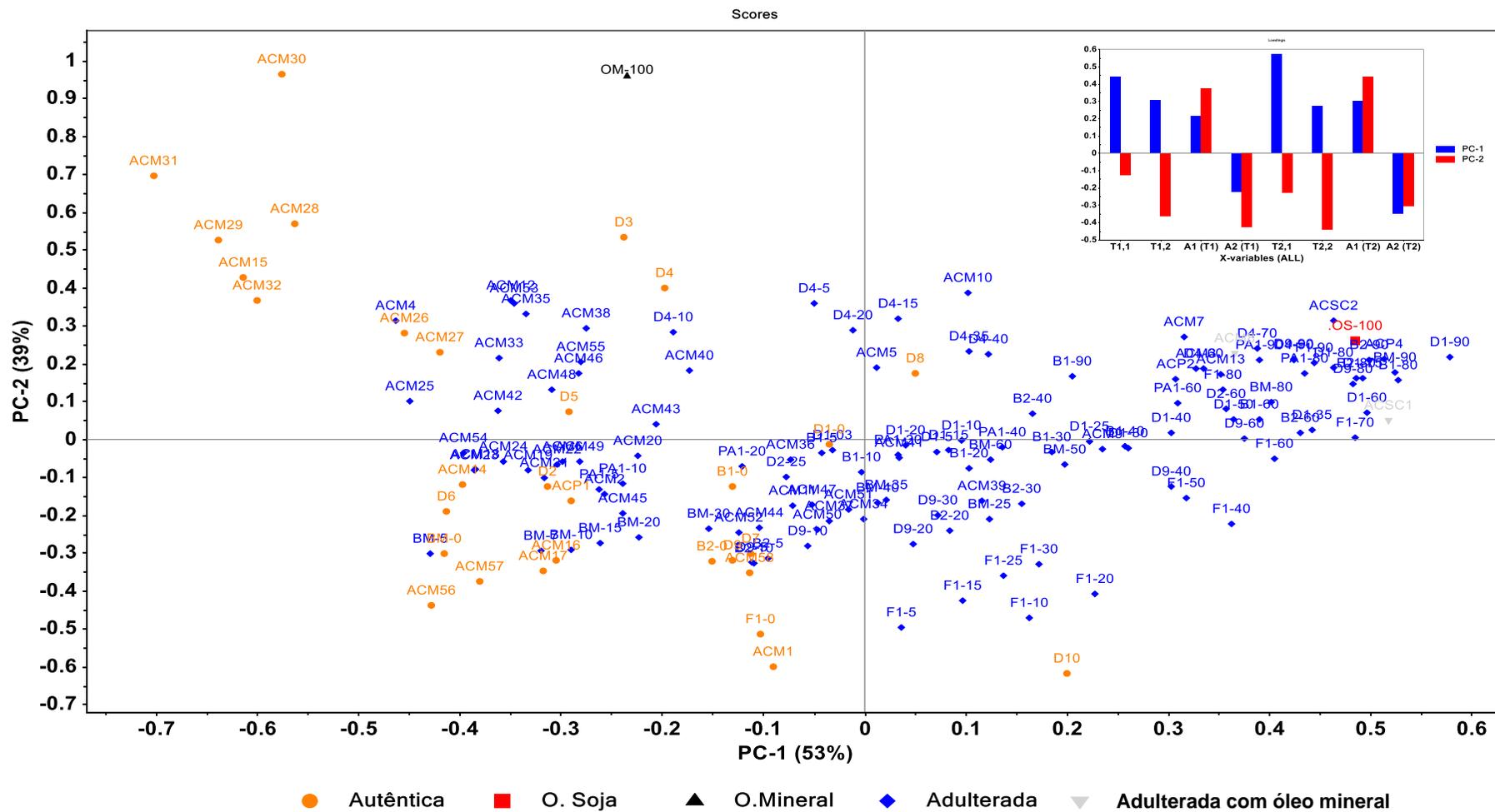


Figura 46 - Gráficos de *scores* e *loadings* da PCA dos dados biexponenciais de SAFF e CPMG: todas as variáveis

O modelo obtido mais satisfatório foi aquele com valores biexponencial da CPMG ($T_{2,1}$ e $T_{2,2} + A_1$ e A_2), Figura 43. Onde há um agrupamento das amostras autênticas em PC1 (-), além disso, é possível observar o gradiente de adulteração dos *blends* binários de B1-X, B2-X, D1-X, D4-X, D9-X, F1-X e BM1-X ao longo de PC1, com as amostras mais adulteradas em valores mais positivos de PC1. Ao longo de PC2 há uma distribuição de viscosidade, para amostras mais viscosas em valores mais positivos de PC2 e as menos viscosas em valores mais negativos de PC2.

Contudo a separação não é totalmente efetiva, levando em consideração a variabilidade química das amostras autênticas, é possível observar que algumas amostras autênticas sem confundem entre amostras com adulteração entre 5 a aproximadamente 40%. Impossibilitando de classificar uma amostra desconhecida com precisão, uma vez que amostras como a D8, por exemplo, poderiam ser classificadas como adulterada contendo cerca de 30 a 40 %, mesmo sendo autêntica.

O segundo melhor modelo obtido foi aquele usando apenas as variáveis de área da CPMG, Figura 42, sendo está variável a que mais contribui na diferenciação das amostras, conforme já foi observado na ILT, com a inversão de área dos picos, e no gráfico das variáveis na Figura 37. Nesta PCA observa-se o agrupamento das amostras autênticas em valores mais negativos de PC1, contudo cerca de 8 amostras poderiam ser classificadas erroneamente, principalmente as mais viscosas que apresentam maior área (A_1), similarmente ao óleo de soja.

No geral, conforme os *loadings* das PCA, nota-se uma certa tendência geral aplicável a maioria das amostras. Onde as amostras autênticas de copaíba apresentam maiores valores de A_2 e menores valores de $T_{2,1}$, $T_{2,2}$ e A_1 e as amostras adulteradas apresentam a relação inversa.

CONCLUSÃO

A análise por CG-EM dos óleos resinas de copaíba demonstrou uma elevada variabilidade química, tanto em relação aos teores e a quantidade de constituintes químicos. Apresentado em média de 28 constituintes para as amostras da RFAD e 48 constituintes para as amostras comerciais autênticas. Os constituintes majoritários identificados em todas as amostras foram o β -cariofileno (22,9 a 68,7%), α -copaeno (1,5 a 24,2%), germacreno D (1,2 a 16,4%) e α -humuleno (3,5 a 15,7%). O Óxido de cariofileno (0,2 a 16,0%) e δ -cadineno (1,6 a 6,1%) foram identificados em cerca 75% das amostras analisadas, e o α -bergamoteno (2,2 a 19,1%) foi apenas nas amostras comerciais e em uma autêntica. A PCA obtida a partir dos dados de CG-EM separou as amostras com elevados teores de sesquiterpenos oxigenados, como o drimenol (5,1 a 20,3%) e juniper camphor (2,0 a 12,1%), que no geral são as mais viscosas. O espectro de RMN de ^1H confirma a presença dos constituintes majoritários identificados por CG-EM, e a análise por *fingerprint* e/ou PCA desses espectros mostrou-se eficaz na identificação de adulterantes (óleo de soja e óleo mineral) em amostras comerciais, permitindo verificar a autenticidade de amostras desconhecidas.

Os dois métodos aplicados para determinar o teor de óleo de soja em amostras de óleo resina de copaíba por RMN de ^1H se mostraram satisfatório. O primeiro método, baseado no método PULCON, foi o ERETIC2, um método univariável. Enquanto, o segundo, foi um método de calibração multivariada (PLSR). Ambos, foram capazes de estimar o teor de adulterante (%) presente nas amostras adulteradas de óleo resina de copaíba apresentando boa concordância entre si. Contudo, o uso do ERETIC2 se mostrou mais vantajoso por ter apresentado menores desvios médios e maior simplicidade analítica, visto que uma amostra pode ser quantificada sem a necessidade da construção de uma curva de calibração.

Por RMN-DT, a verificação de autenticidade do óleo de copaíba mostrou-se mais limitada quando comparada a RMN de alta resolução, sendo afetado principalmente pela elevada variabilidade química entre as amostras autênticas de óleo de copaíba. Essa variabilidade química afeta os valores de relaxação transversal (T_2) e longitudinal (T_1), que para amostras de maior viscosidade tende a ser uma relaxação mais rápida. A presença de sesquiterpenos oxigenados (juniper camphor e drimenol) e/ou de substâncias de maior rigidez molecular, podem ser a explicação

desse comportamento. Conseqüentemente, isso acaba dificultando a diferenciação das amostras autênticas das adulteradas, uma vez que os valores de T_1 e T_2 do óleo de copaíba são próximas ao do óleo de soja.

A abordagem mais satisfatória para o RMN-DT foi o uso dos valores de relaxação e áreas obtidos a partir do ajuste biexponencial da curva CPMG, uma vez que foi observado um comportamento biexponencial através da ILT, onde conforme se aumenta a quantidade de adulterante, ocorre uma inversão da área dos picos observados, tornando-se mais similar ao perfil do óleo de soja.

De maneira mais simples, foi verificado que é possível ter uma rápida previsão da autenticidade de uma amostra de óleo de copaíba a partir do teste de congelamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, pois conforme foi observado nas amostras analisadas, as amostras autênticas não congelam nessa temperatura.

Portanto, o uso da RMN de alta resolução permitiu identificar e quantificar corretamente a adulteração com óleo de soja em amostras comerciais de copaíba independente da sua variabilidade química. Assim sendo, a metodologia proposta apresentou-se bastante satisfatória para a autenticação mais precisa de amostras de óleo resina de copaíba.

REFERÊNCIAS

ANVISA. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC N° 26, 13 de maio de 2014, Ministério da Saúde**, 2014.

ARRUDA, C. et al. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus - A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n. July 2018, p. 1–20, jan. 2019.

BAKHMUTOV, V. I. Practical NMR relaxation for chemists. **Choice Reviews Online**, v. 43, n. 01, p. 43- 0323-43–0323, 1 set. 2004.

BARBOSA, K. D. S.; YOSHIDA, M.; SCUDELLER, V. V. Detection of adulterated copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil-resins by refractive index and thin layer chromatography. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1 A, p. 57–60, 2009.

BARBOSA, L. L. et al. Application of low-field NMR for the determination of physical properties of petroleum fractions. **Energy and Fuels**, v. 27, n. 2, p. 673–679, 2013a.

BARBOSA, P. C. S. et al. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* hayne): Soil composition, seasonality and diameter at breast height. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1823–1833, 2012.

BARBOSA, P. C. S. et al. Phytochemical fingerprints of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne) determined by multivariate analysis. **Chemistry and Biodiversity**, v. 10, n. 7, p. 1350–1360, 2013b.

BARISON, A. et al. A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ¹H NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 642–650, 2010.

BIAVATTI, M. W. et al. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 230–235, jun. 2006.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. In: 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. v. 1.

BUENO MORAES, T.; MONARETTO, T.; COLNAGO, L. Applications of Continuous Wave Free Precession Sequences in Low-Field, Time-Domain NMR. **Applied Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1312, 2019.

CARR, H. Y.; PURCELL, E. M. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. **Physical Review**, v. 94, n. 3, p. 630–638, 1954.

CISTOLA, D. P.; ROBINSON, M. D. Compact NMR relaxometry of human blood and blood components. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 83, n. 5, p. 53–64, out. 2016.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7a. ed. Campinas, SP: Unicamp, 1997.

COLNAGO, L. A. et al. Rapid Determination of Food Quality Using Steady State Free

Precession Sequences in TD-MNR Spectroscopy. **Magnetic Resonance in Food Science : Defining Food by Magnetic Resonance**, p. 1–16, 2015.

COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D. DE. RMN no domínio do tempo fundamentos e aplicações offline e inline. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, p. 439–470, jan. 2010.

CUCINELLI NETO, R. P.; RODRIGUES, E. J. DA R.; TAVARES, M. I. B. Single-shot measurement of solids and liquids T1 values by a small-angle flip-flop pulse sequence. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 395–403, 2019.

DAY, I. J. On the inversion of diffusion NMR data: Tikhonov regularization and optimal choice of the regularization parameter. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 211, n. 2, p. 178–185, 2011.

DE GALÚCIO, C. S. et al. Recuperação de sesquiterpenos do óleo-resina de copaíba a partir da destilação molecular. **Química Nova**, v. 39, n. 7, p. 795–800, 2016.

FERRÃO, M. F. et al. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 333–340, 2004.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações**. São Paulo: Editora Unicamp, 2015.

GÜNTHER, H. **NMR spectroscopy : basic principles, concepts, and applications in chemistry**. Weinheim, German: Wiley, 2013.

HECK, M. C.; VIANA, L. Á.; VICENTINI, V. E. P. Importância do óleo de Copaifera sp. (copaíba). **Revista Saúde e Biologia**, v. 7, n. 1, p. 82–90, 2012.

KANTZAS, A.; JONATHAN BRYAN; TAHERI, S. **Fundamentals of Fluid Flow in Porous Media**. [s.l.] PERM, 2018.

KEELER, J. **Understanding NMR Spectroscopy**. 1ª ed. Inglaterra: Wiley–Blackwell, 2005.

KUMAR, N. et al. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**, v. 123, p. 186–199, 2014.

KUMARAVELU, C.; GOPAL, A. A review on the applications of Near-Infrared spectrometer and Chemometrics for the agro-food processing industries. **Technological Innovation in ICT for Agriculture and Rural Development**, p. 8–12, jul. 2015.

LACERDA JR., V. **Fundamentos de Espectrometria e Aplicações**. [s.l.] Atheneu, 2018.

LARIONOV, O. V.; COREY, E. J. An unconventional approach to the enantioselective synthesis of caryophylloids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 10, p. 2954–2955, 2008.

LIMA, A. F. et al. Utilização Medicinal do óleo de copaíba: aspectos históricos e estudos atuais. p. 332–336, 2012.

LÓPEZ-OSORIO, F.; MIRANDA-ESQUIVEL, D. R. A phylogenetic approach to conserving amazonian biodiversity. **Conservation Biology**, v. 24, n. 5, p. 1359–1366,

2010.

LUCCA, L. G. et al. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 104, p. 144–148, 2015.

MAZZOLA, A. A. Magnetic resonance : principles of image formation and applications in funcional imaging. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 3, n. 1, p. 117–129, 2009.

MEIBOOM, S.; GILL, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. **Review of Scientific Instruments**, v. 29, n. 8, p. 688–691, 1958.

MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba - *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 577–581, jun. 2009.

MONARETTO, T. et al. On resonance phase alternated CWFP sequences for rapid and simultaneous measurement of relaxation times. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 259, p. 174–178, out. 2015.

MORAES, T. B.; COLNAGO, L. A. Simulação de sinais de RMN através das equações de bloch. **Química Nova**, v. 37, n. 8, p. 1410–1416, 2014.

MORAES, T. B.; MONARETTO, T.; COLNAGO, L. A. Rapid and simple determination of T1relaxation times in time-domain NMR by Continuous Wave Free Precession sequence. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 270, p. 1–6, 2016.

MOREIRA, A. C. DE O. et al. Rapid Purity Determination of Copaiba Oils by a Portable NIR Spectrometer and PLSR. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 1867–1877, 2018.

MORELLI, C. L. et al. Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 134–141, 2015.

NAKAMURA, M. T. et al. Copaiba oil and its constituent copalic acid as chemotherapeutic agents against dermatophytes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 8, p. 1377–1383, 2017.

NOGUEIRA, E. DE O. et al. Avaliação do efeito do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* sp.) na proliferação celular in vitro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 293, 2015.

NOGUEIRA, M. S.; FURTADO, R. A.; BASTOS, J. K. Flavonoids and Methoxy-galloylquinic Acid Derivatives from the Leaf Extract of *Copaifera langsdorffii* Desf. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 31, p. 6939–6945, 2015.

NUNES, T. C. L.; SILVEIRA, J. B. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR : A Física Envolvida no Diagnóstico por Imagens. **Revista Conexão Eletrônica**, v. 14, n. 1, p. 439–451, 2017.

PASCOAL, D. R. C. et al. Copaiba oil-loaded commercial wound dressings using supercritical CO₂: A potential alternative topical antileishmanial treatment. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 129, p. 106–115, 2017.

PLOWDEN, C. Production ecology of copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresin in the eastern Brazilian Amazon. **Economic Botany**, 2003.

RANDRIAMIHARISOA, R. et al. Carbon-13 NMR spectra of five sesquiterpenes isolated from Ylang Ylang essential oil. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 275–276, 1 mar. 1986.

RIBEIRO, P. H. S. **Óleos essenciais de espécies de Eugenia do Cerrado: composições químicas sazonais, modificações químicas no β -cariofileno e avaliação da atividade acaricida**. [s.l.] UNIVERSIDADE NACIONAL DE BRASÍLIA, 2015.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C. et al. Variabilidade química e física do óleo-resina de copaifera spp. no sudoeste da Amazônia brasileira. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 8, n. 2–3, p. 851–861, 2004.

ROBERT M. SILVERSTEIN FRANCIS X. WEBSTER; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7a. ed. [s.l.] JOHN WILEY & SONS, INC., 2005.

ROGGO, Y. et al. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 3 SPEC. ISS., p. 683–700, 2007.

ROMERO, A. L. **Contribuição ao conhecimento químico do Óleo-Resina de Copaíba: Configuração absoluta de terpenos (Dissertação de Mestrado)**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2007.

SANTOS, P. M. et al. Non-invasive detection of adulterated olive oil in full bottles using time-domain NMR relaxometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 2, p. 385–390, 2017.

SAVORANI, F.; TOMASI, G.; ENGELSEN, S. B. icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 202, n. 2, p. 190–202, 2010.

SAVORANI, F.; TOMASI, G.; ENGELSEN, S. B. Alignment of 1D NMR Data using the iCoshift Tool: A Tutorial. **Magnetic Resonance in Food Science**, p. 14–24, 2013.

SHANLEY, P.; SERRA, M.; MEDINA, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. 2. ed. [s.l.] CIFOR, 2010.

SILVA, E. S. et al. Análise físico-química do óleo-resina e variabilidade genética de copaíba na Floresta Nacional do Tapajós. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 11, p. 1621–1628, 2012.

SILVA, M. T. et al. Viscosity of the Oil-resins and Chemical Composition of the Essential Oils from Oils-resins of *Copaifera multijuga* Hayne Growing in the National Forest Saracá-Taquera Brazil. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 20, n. 5, p. 1226–1234, 2017.

SKOOG, D. A. **FUNDAMENTOS DA QUÍMICA ANALÍTICA - Tradução da 8a. edição norte-americana**. [s.l.] Cengage, 2008.

TAPPIN, M. R. R. et al. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27,

n. 2, p. 236–240, 2005.

TELKKI, V. V. Hyperpolarized Laplace NMR. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 56, n. 7, p. 619–632, 2018.

TEYE, E.; HUANG, X.; AFOAKWA, N. Review on the Potential Use of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for the Measurement of Chemical Residues in Food. **American Journal of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2013.

TRINDADE, F. T. T. et al. Copaifera multijuga ethanolic extracts, oil-resin, and its derivatives display larvicidal activity against Anopheles darlingi and Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 3, p. 464–470, 2013.

TYBURN, J.; COUTANT, J. **User Manual TopSpin ERETIC 2: Electronic to Access In-Vivo Concentration**. Bruker ed. [s.l.] Bruker, 2016.

VASCONCELOS, A. F. F. DE; GODINHO, O. E. S. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1057–1060, dez. 2002.

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C. Selective Ion Monitoring as a Tool for Detecting Adulterated Copaiba Oil. **Revista Fitos**, v. 1, n. 1, p. 52–56, 2005.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero Copaifera L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–286, 2002.

VENÂNCIO, T. et al. Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continuous wave free precession experiment. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 173, n. 1, p. 34–39, 2005.

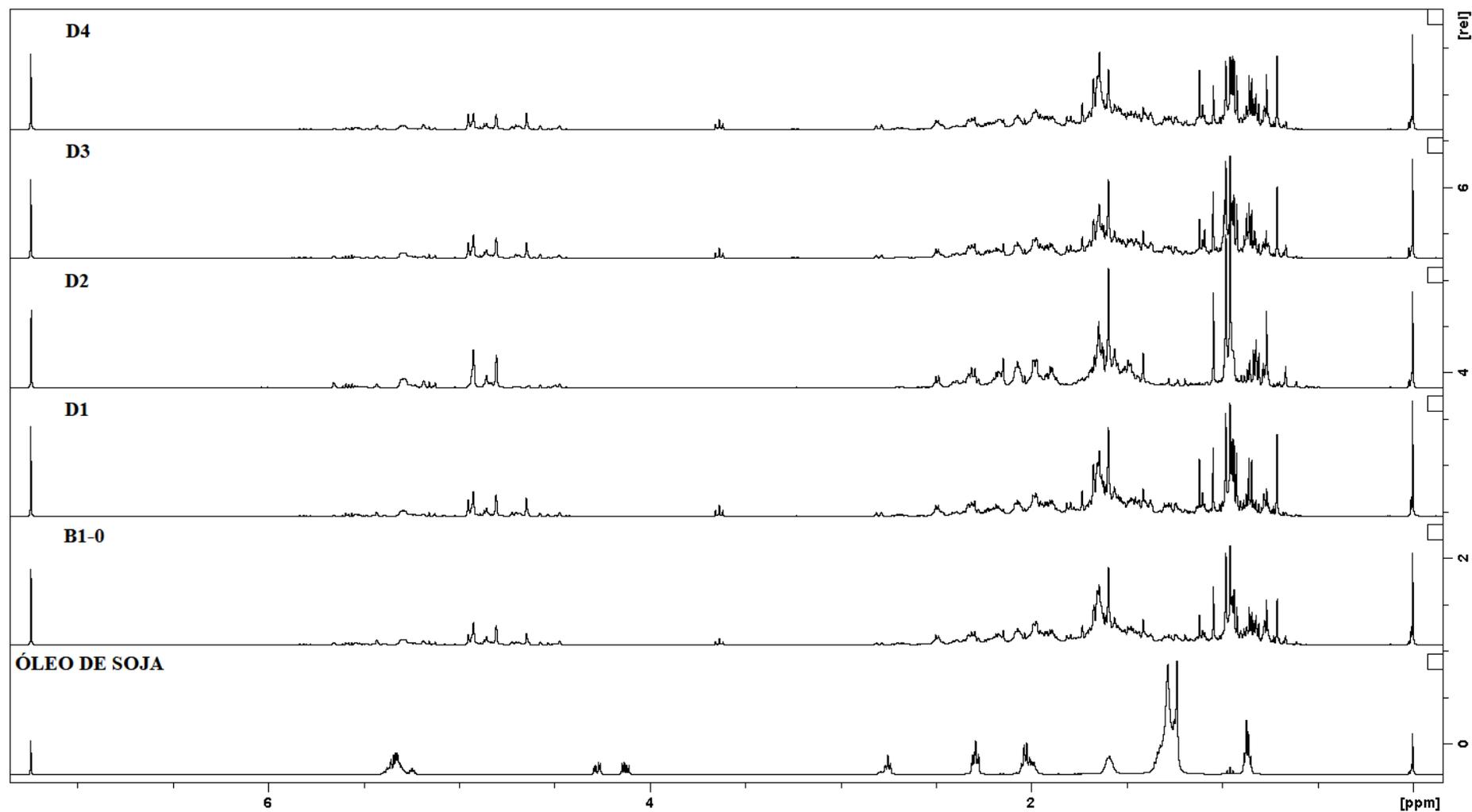
WIDER, G.; DREIER, L. Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 8, p. 2571–2576, 2006.

WU, J.; LI, Y.; GAO, X. Simultaneous determination of oil and water in soybean by LF-NMR relaxometry and chemometrics. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 32, n. 5, p. 731–735, 2016.

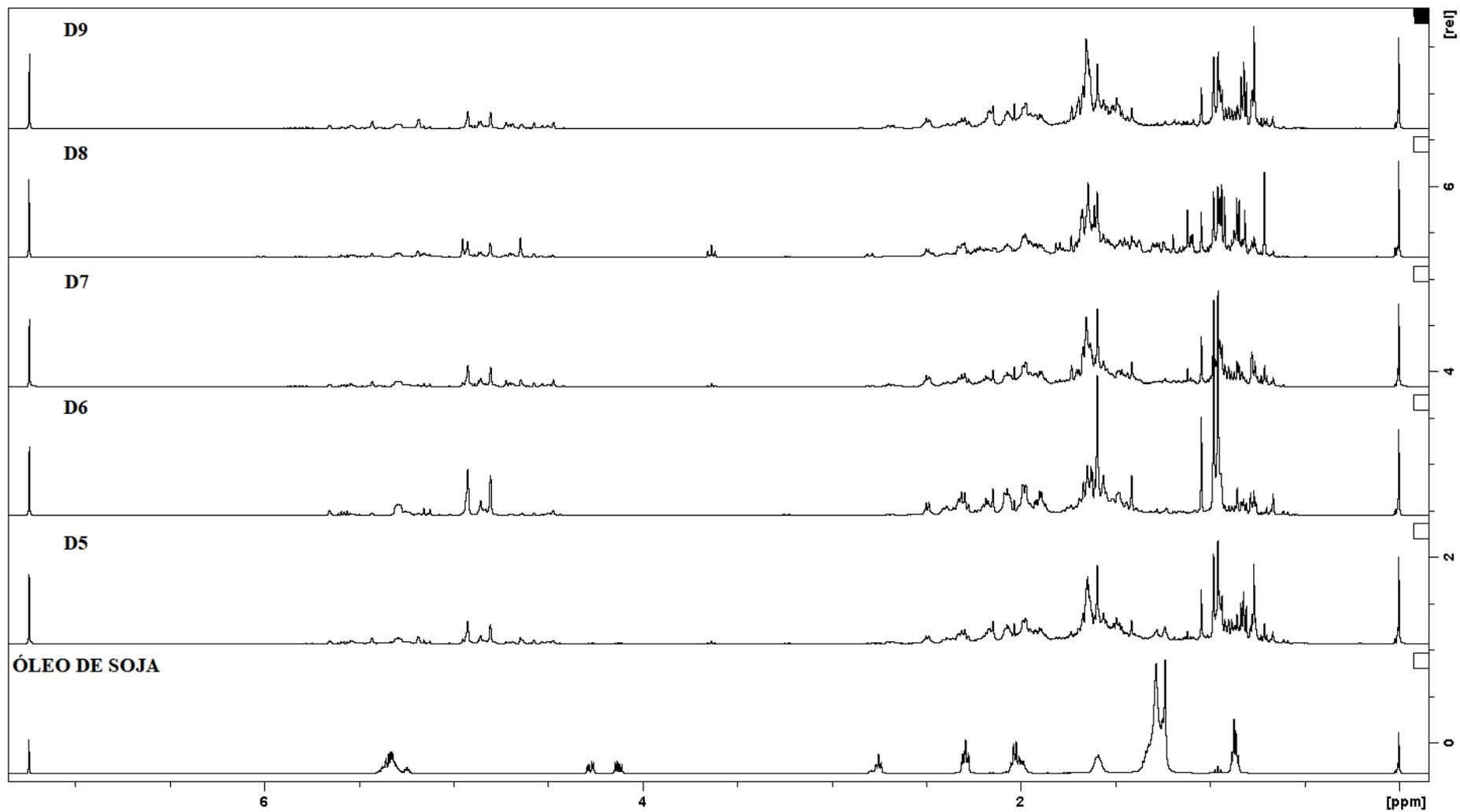
YAMAGUCHI, M. H.; GARCIA, R. F. Copaiba Oil and Its Medicinal Properties: a Bibliographical Review. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, p. 137–146, 2012.

ZERBE, O.; JURT, S. **Applied NMR Spectroscopy for Chemists and Life Scientists**. Weinheim, Germany: WILEY-VCH, 2014.

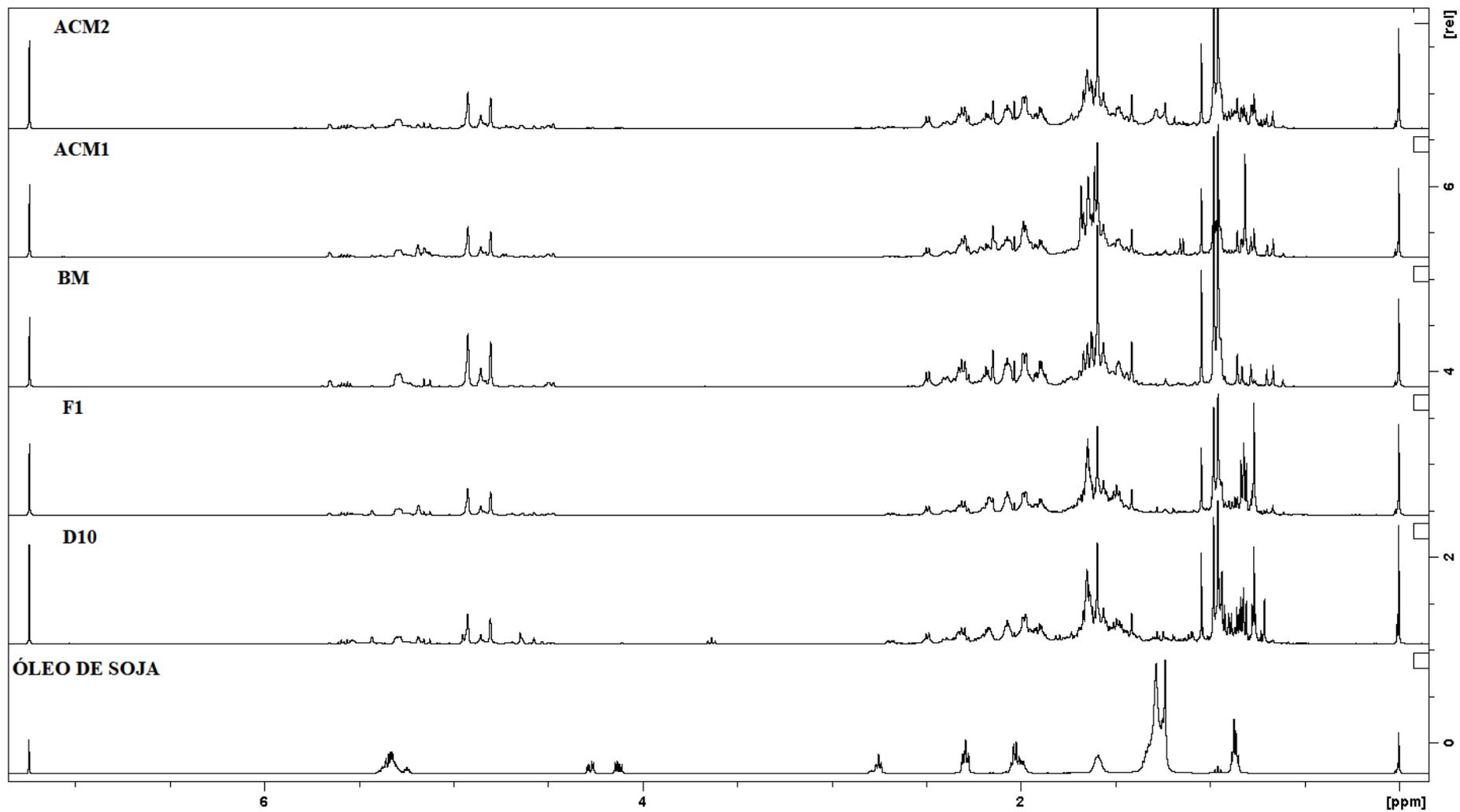
APÊNDICE



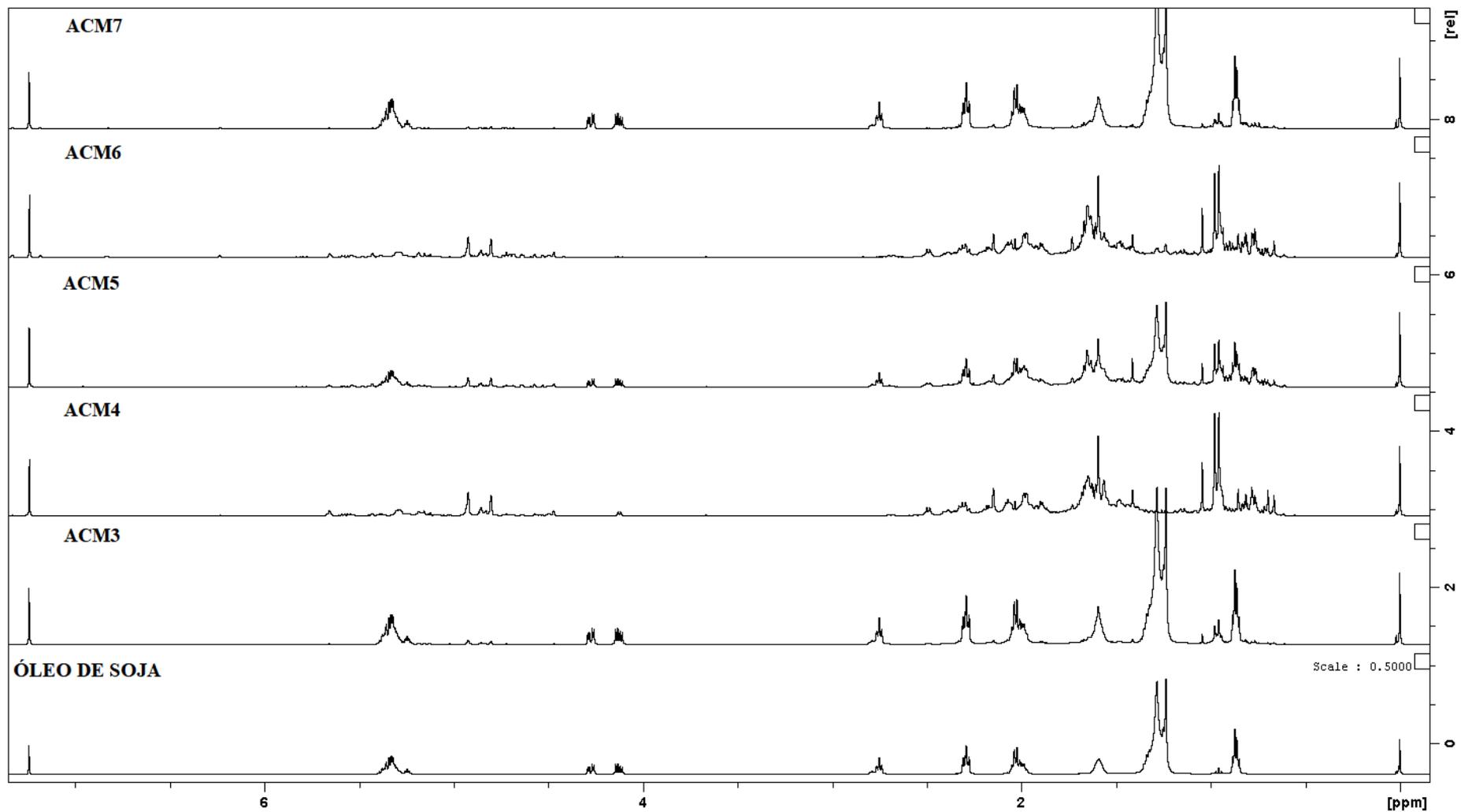
Apêndice 1 - Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



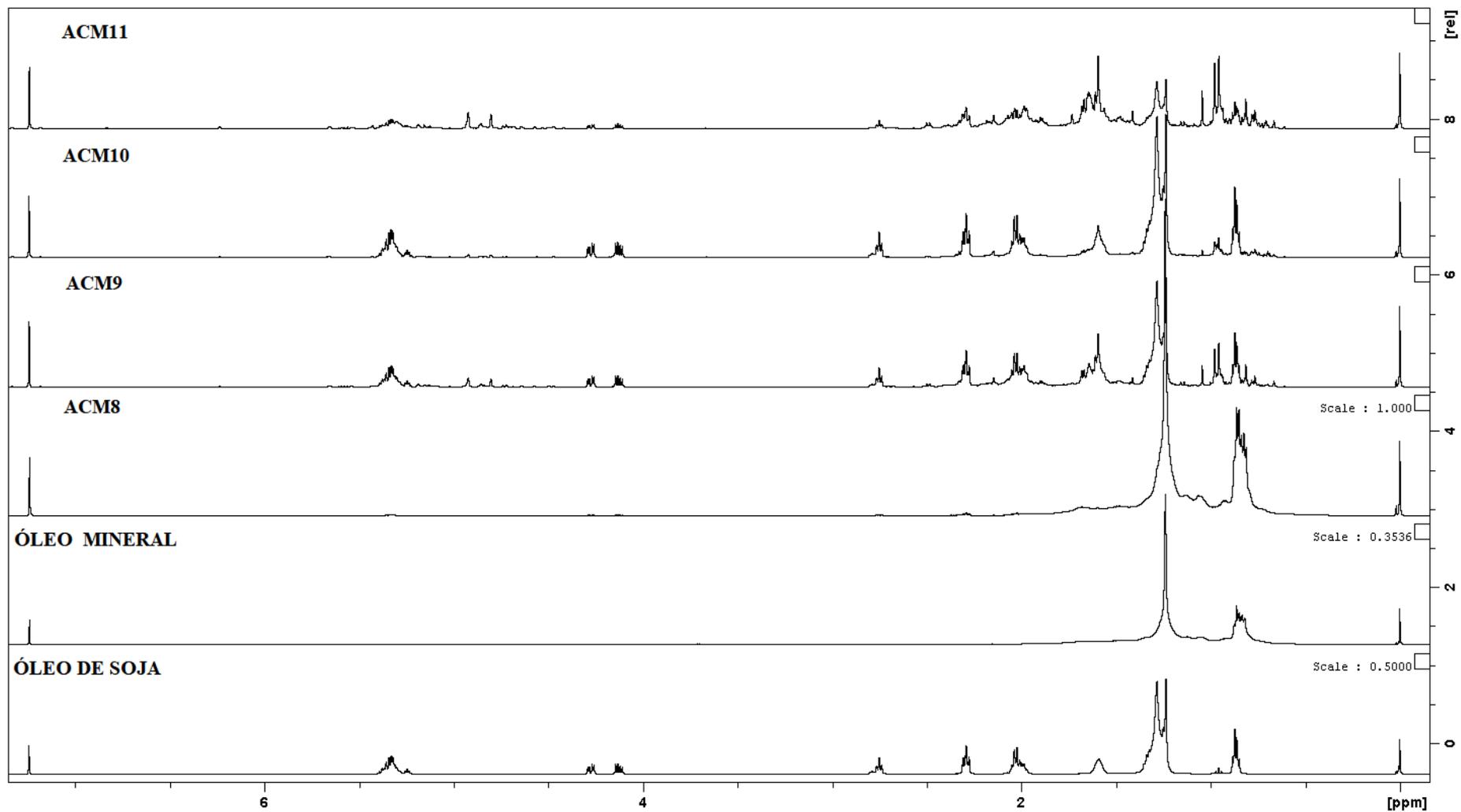
(Continuação do Apêndice 1) Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



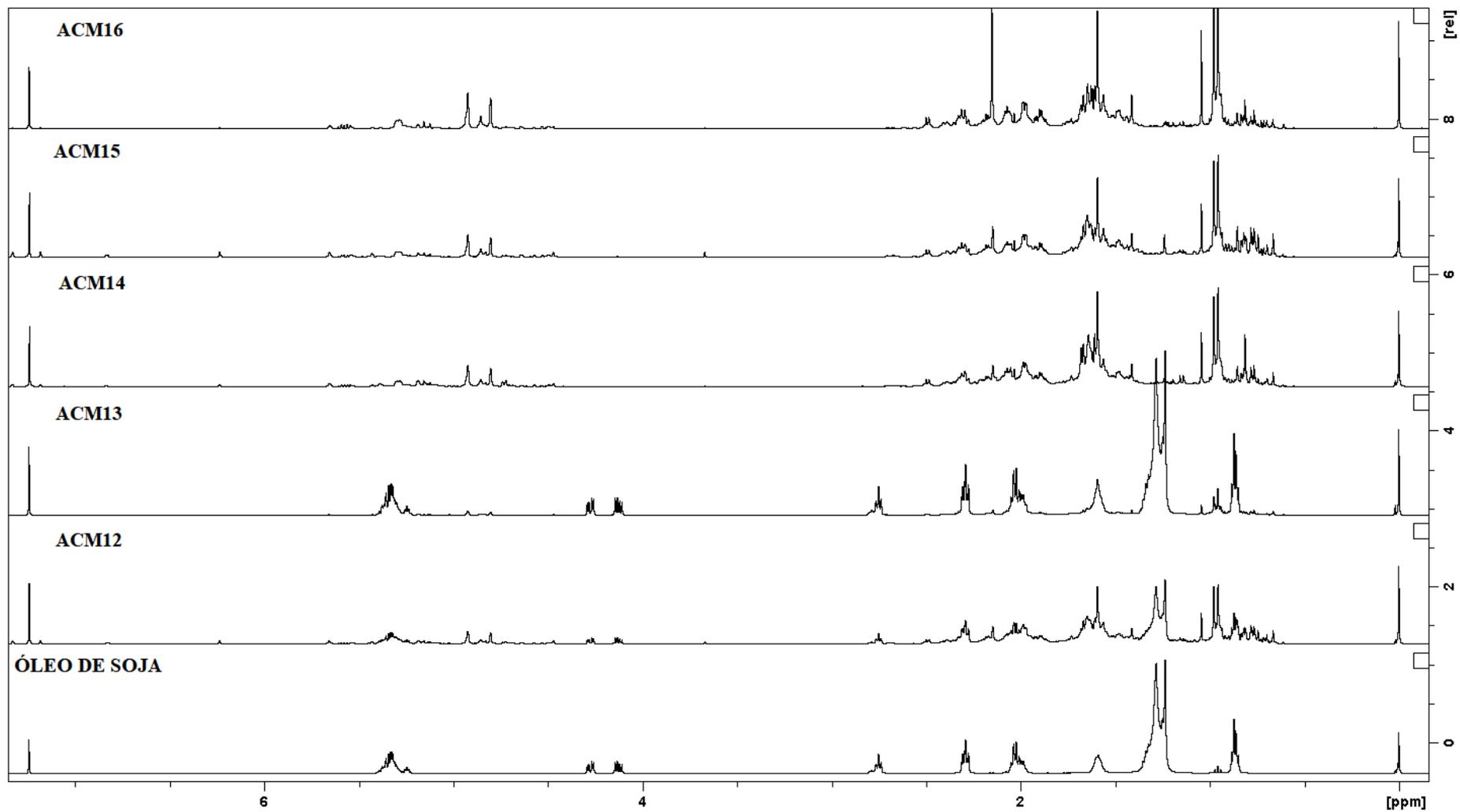
(Continuação do Apêndice 1) Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



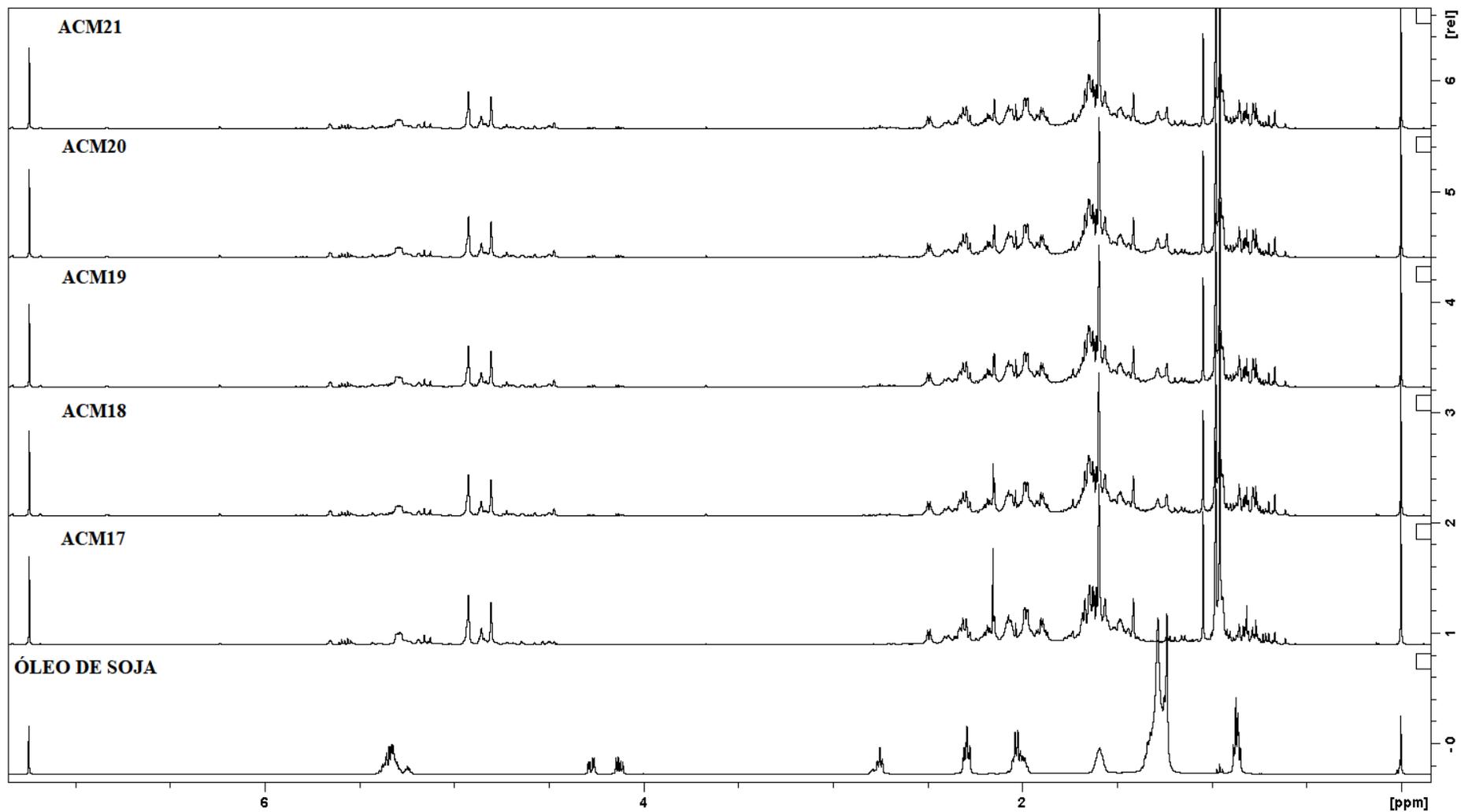
(Continuação do Apêndice 1) Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



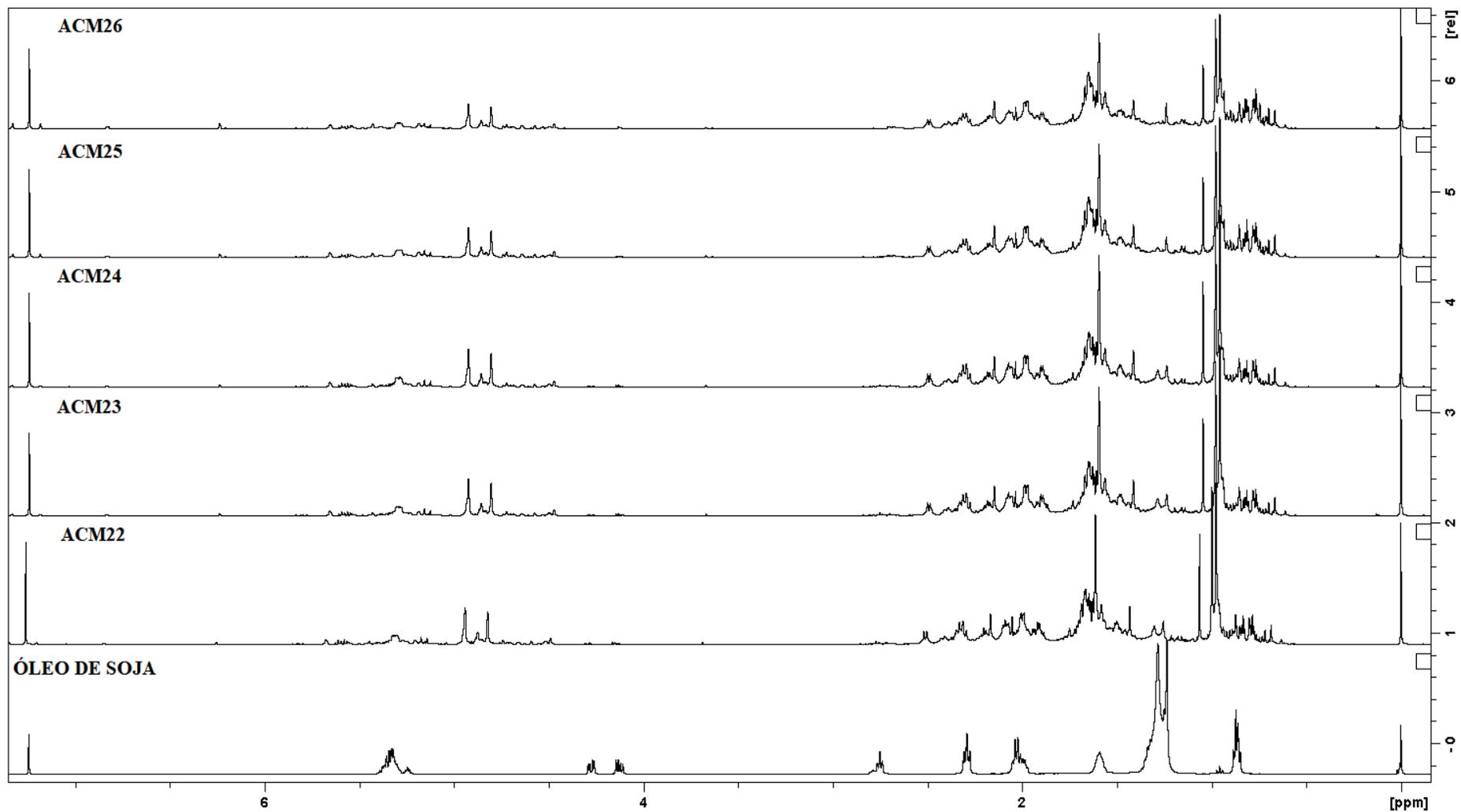
(Continuação do Apêndice 1) Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



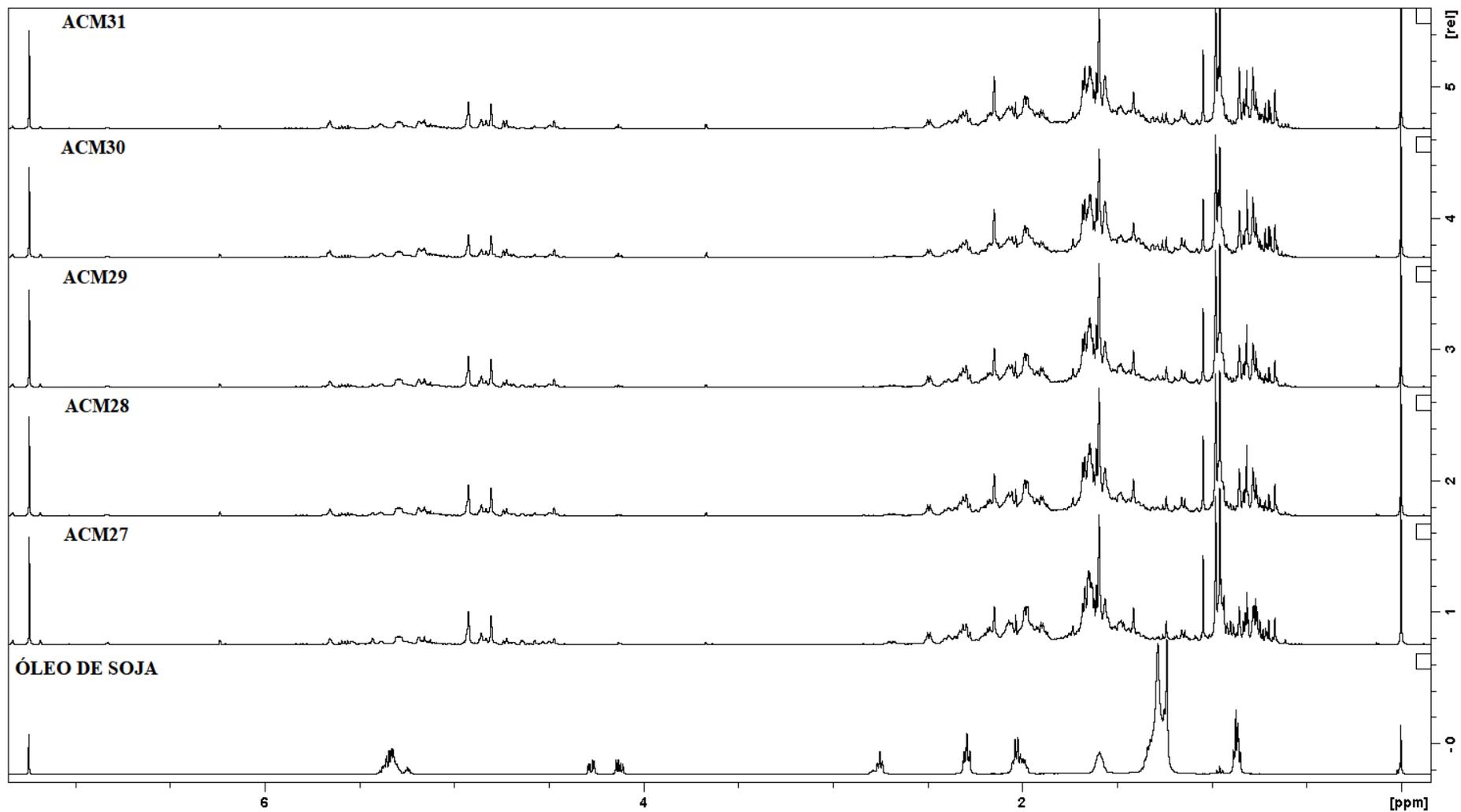
(Continuação do Apêndice 1) Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



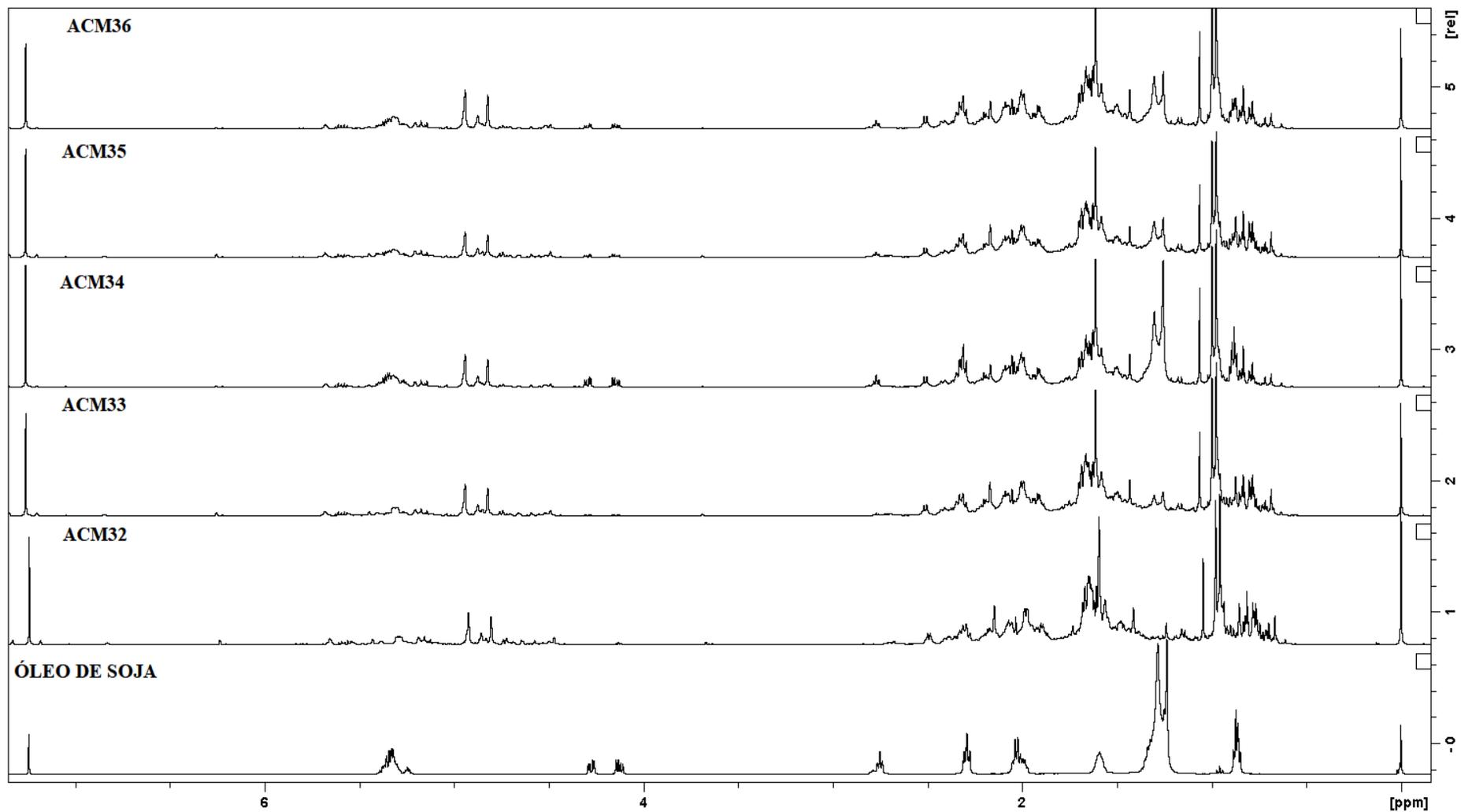
(Continuação do Apêndice 1) Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



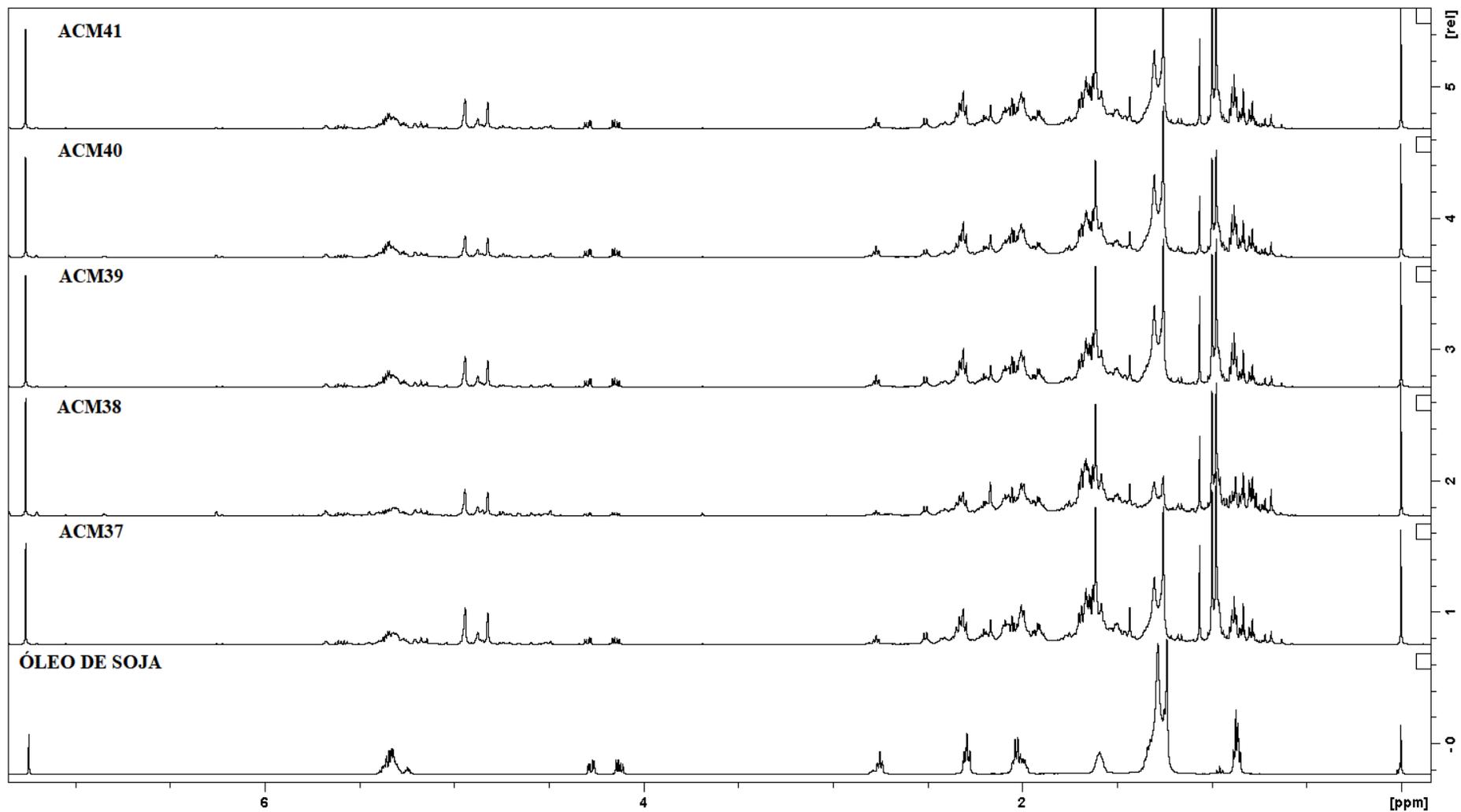
(Continuação do Apêndice 1) Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



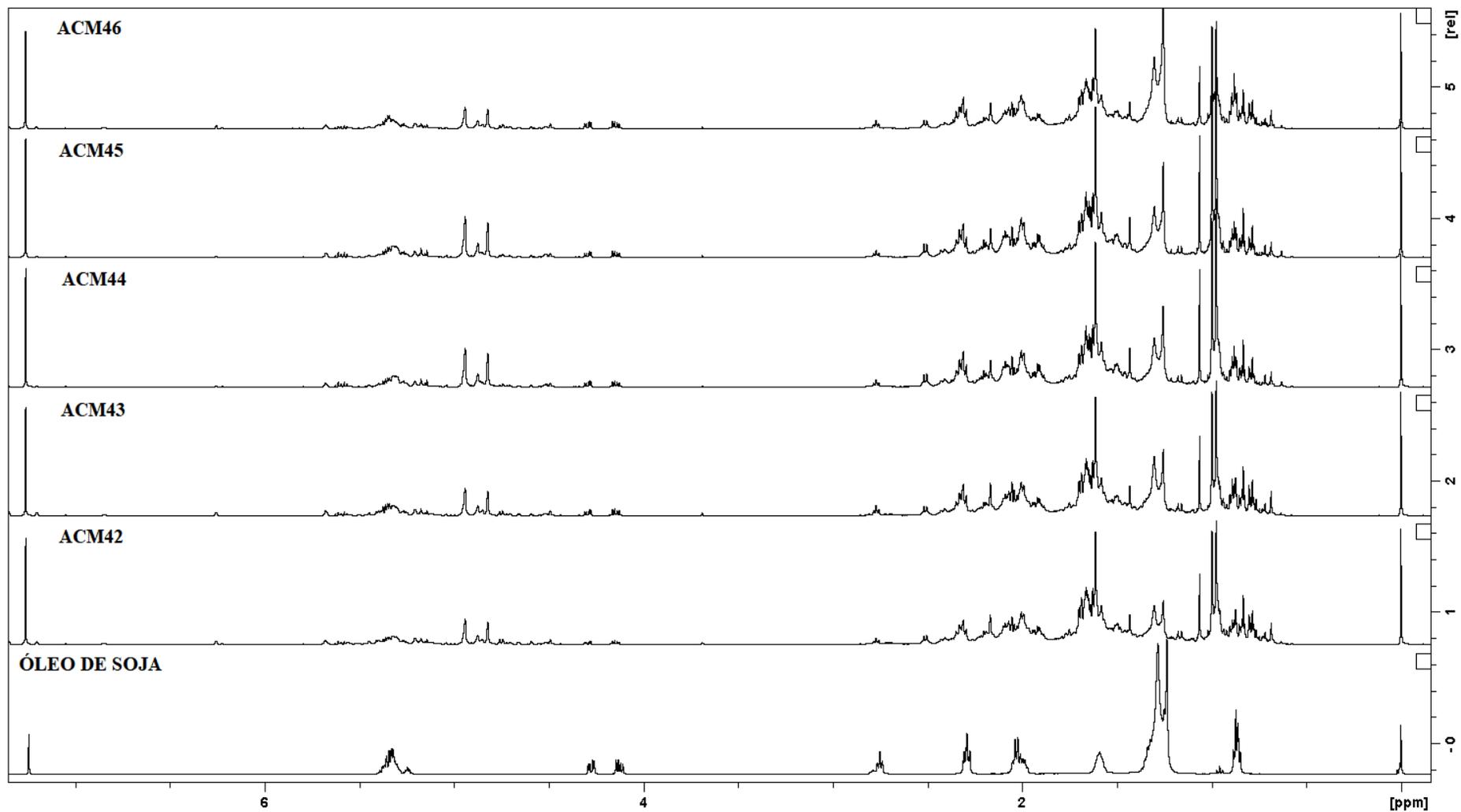
(Continuação do Apêndice 1) Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



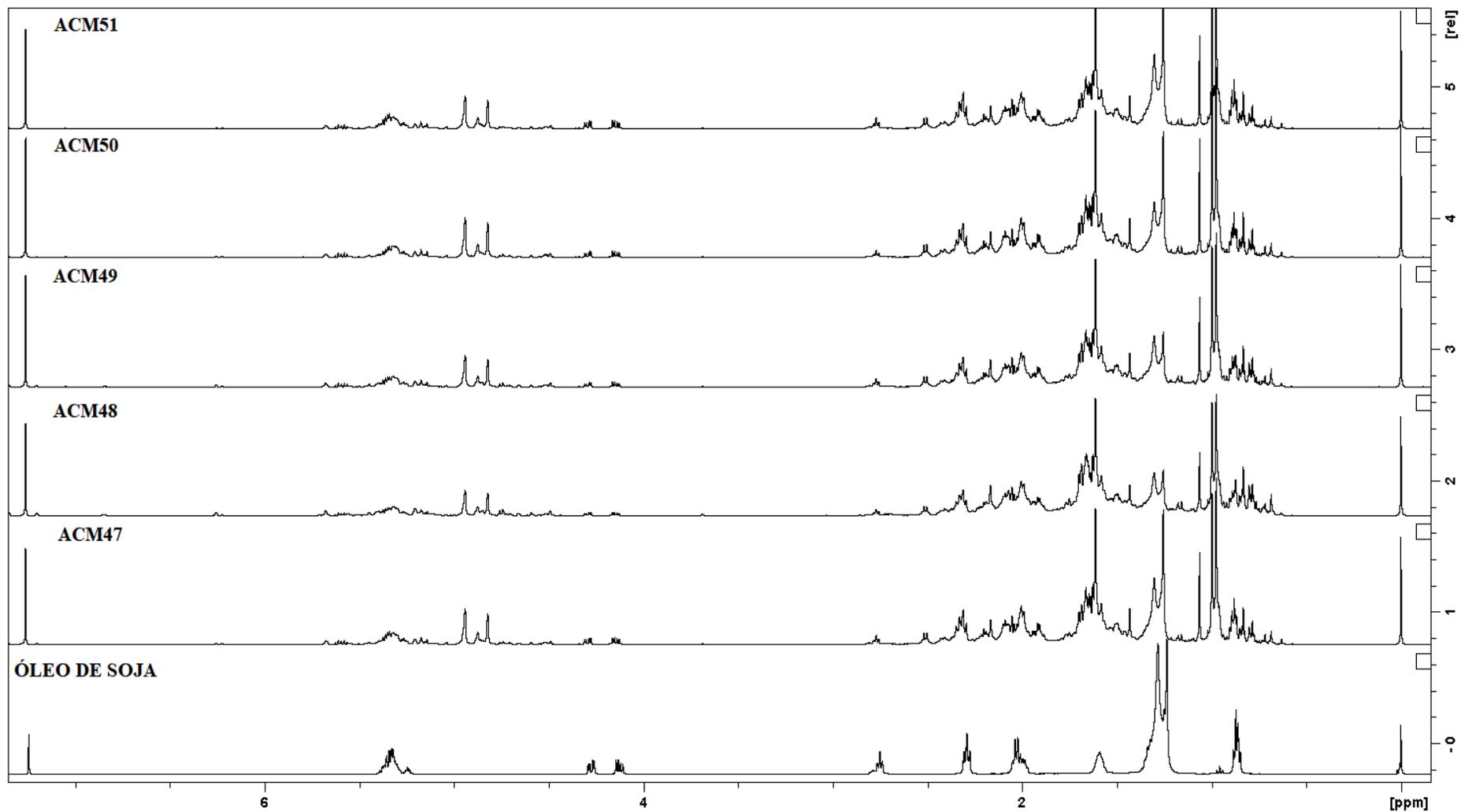
(Continuação do Apêndice 1) Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



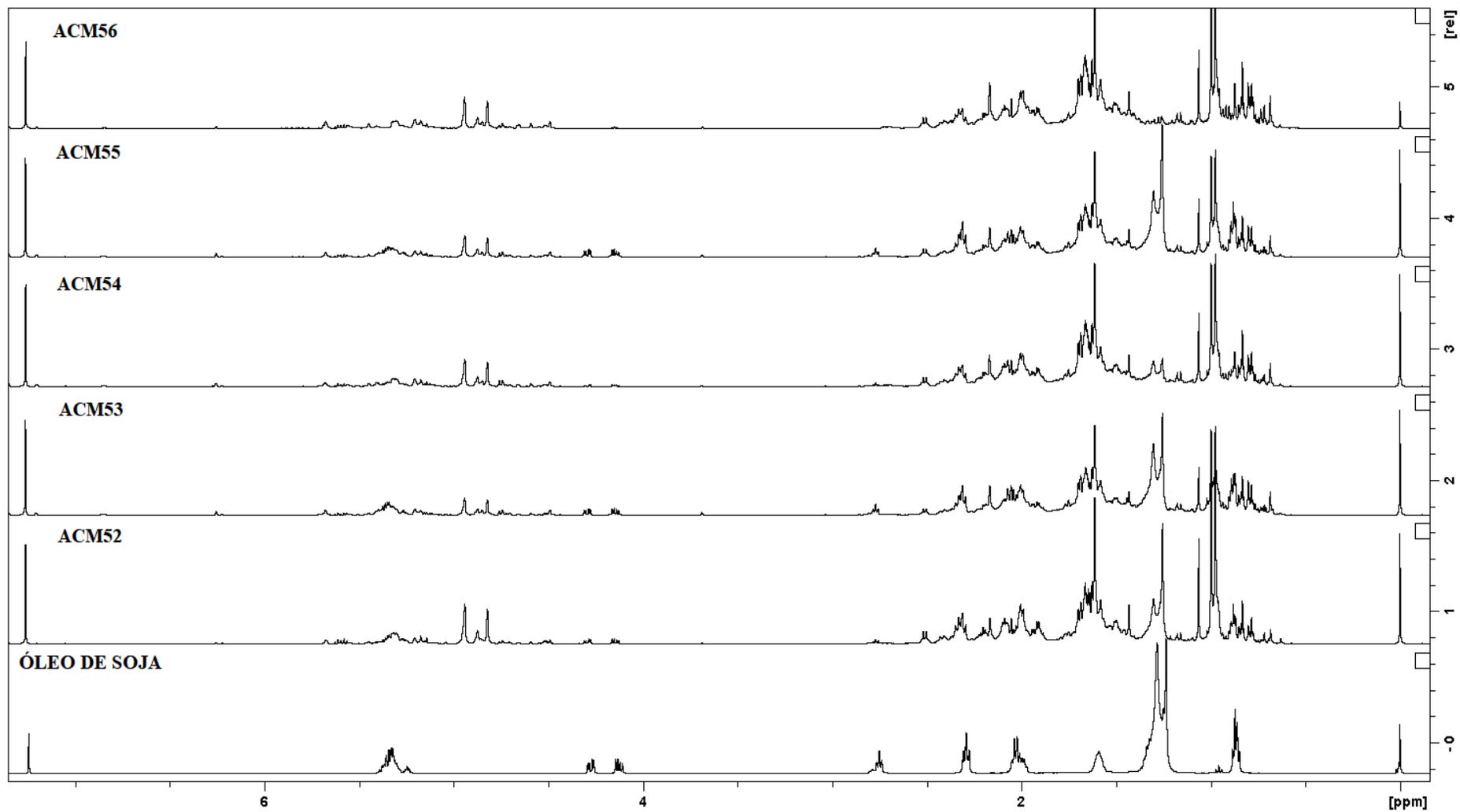
(Continuação do Apêndice 1) Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



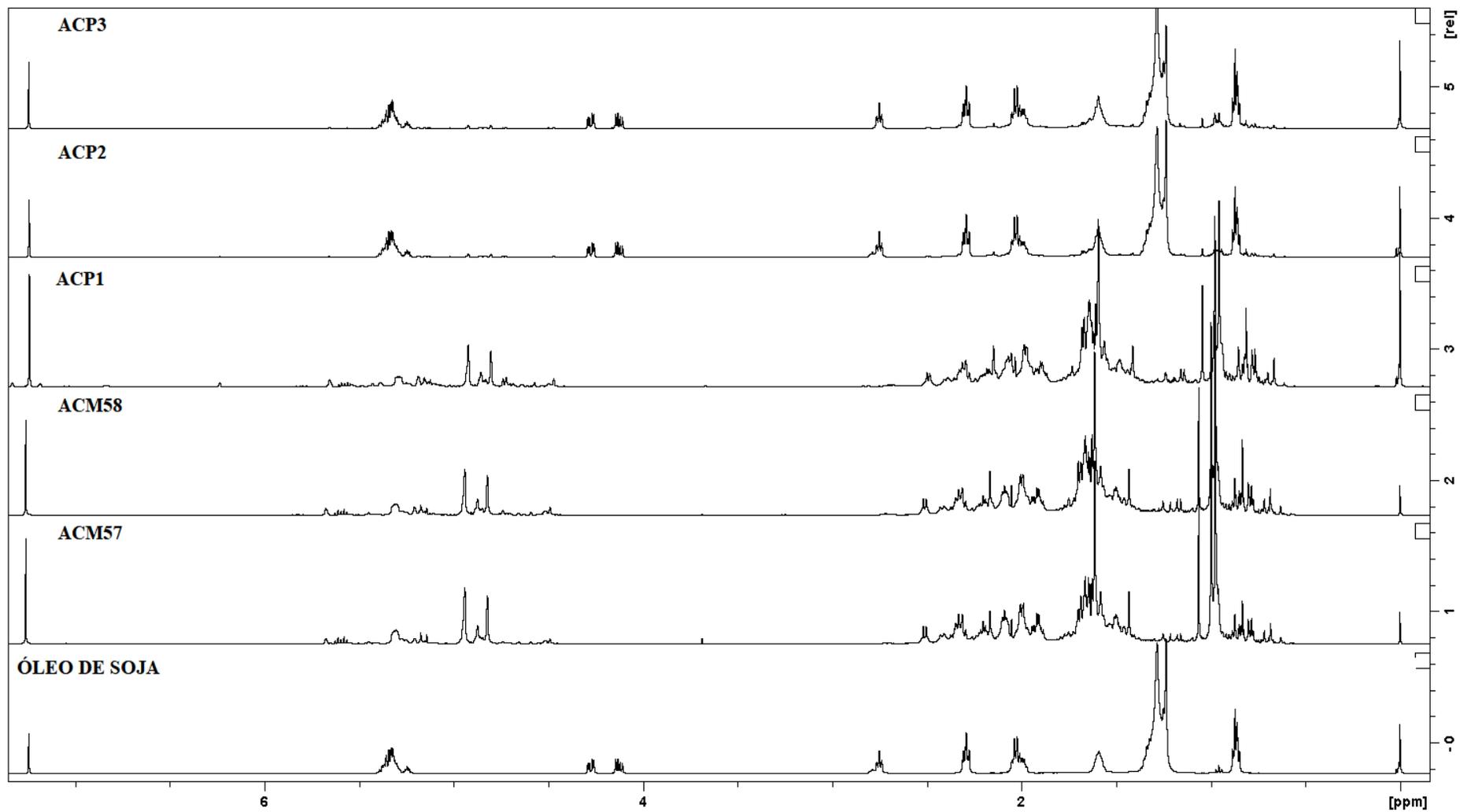
(Continuação do Apêndice 1) Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



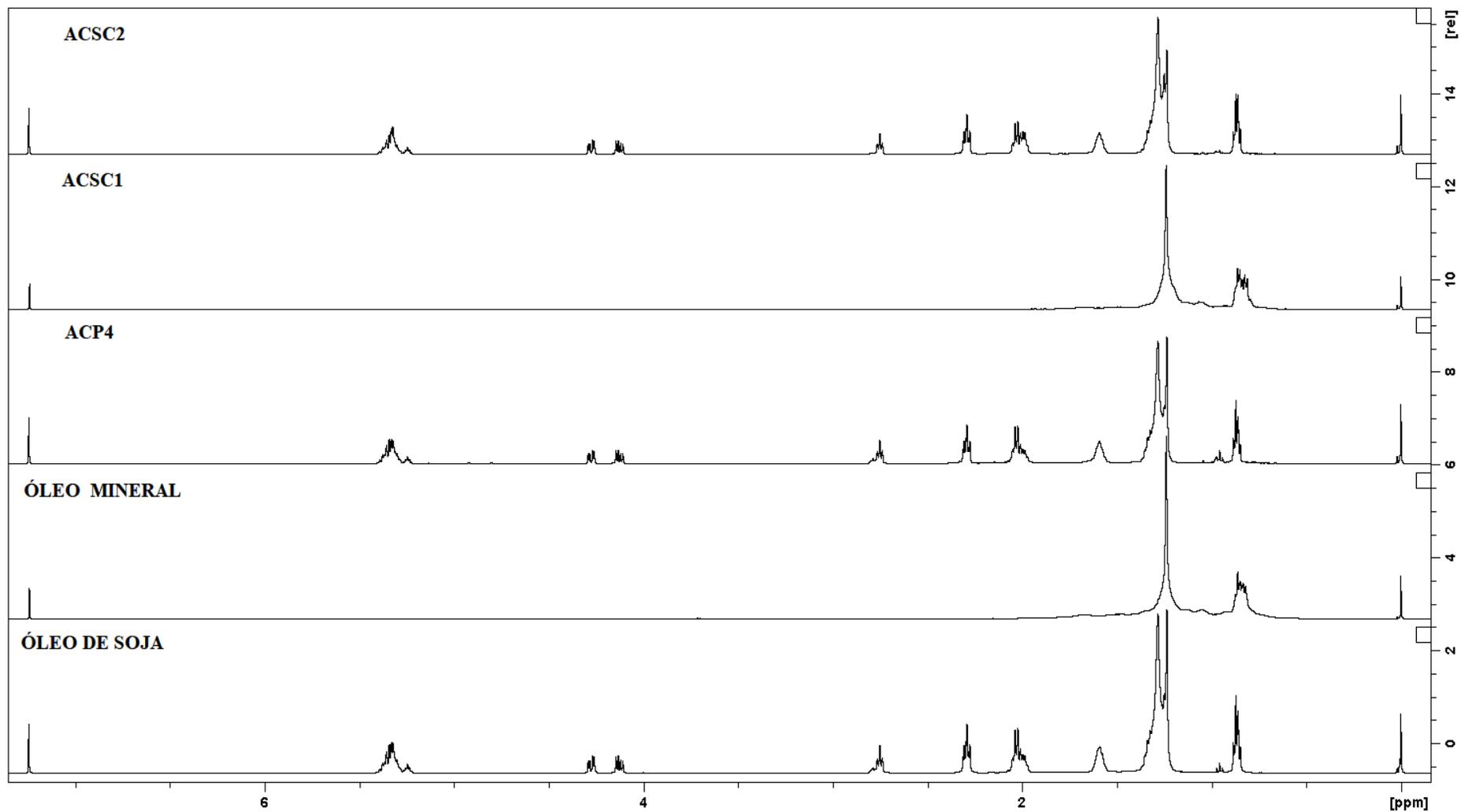
(Continuação do Apêndice 1) Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



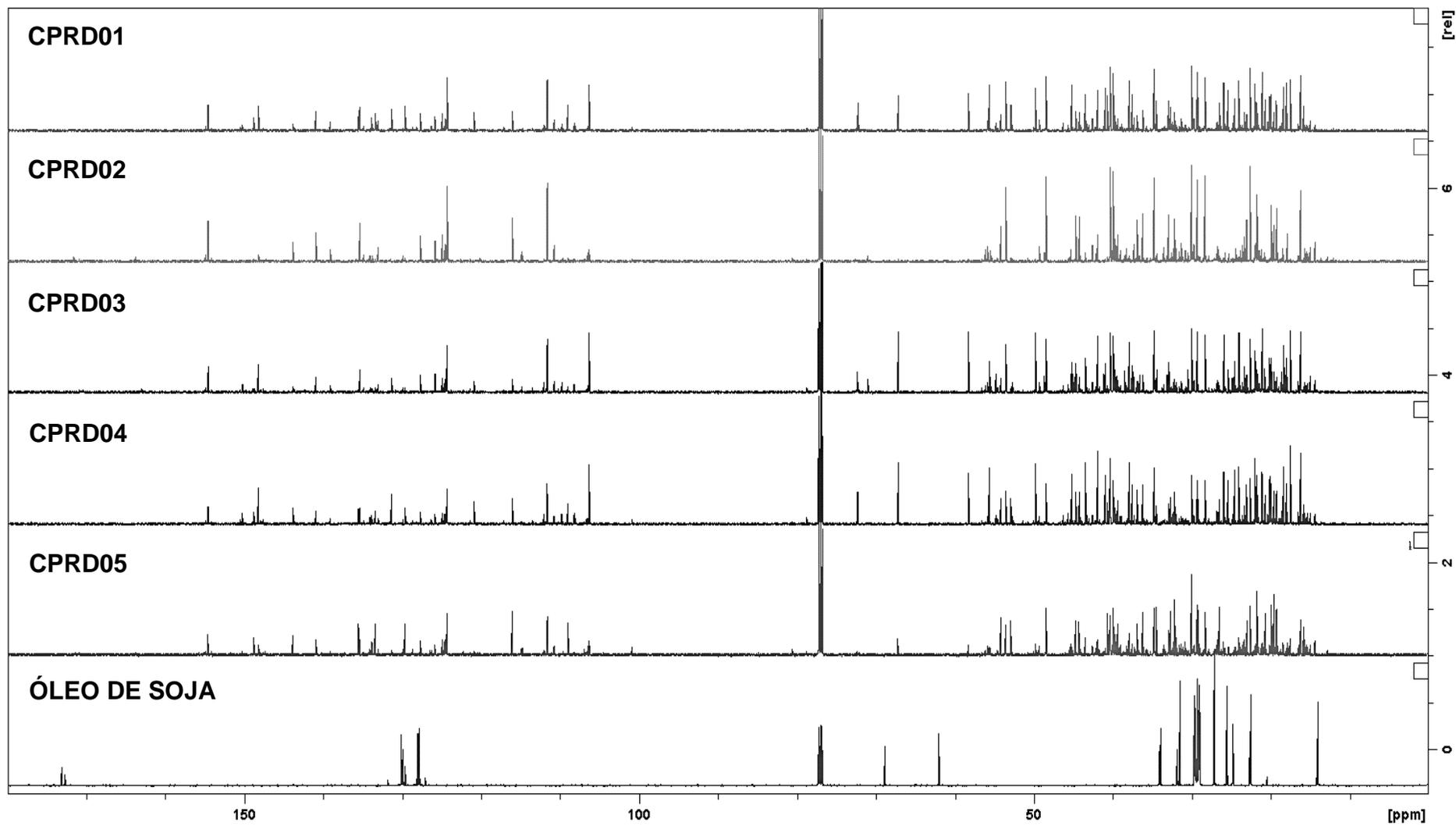
(Continuação do Apêndice 1) Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



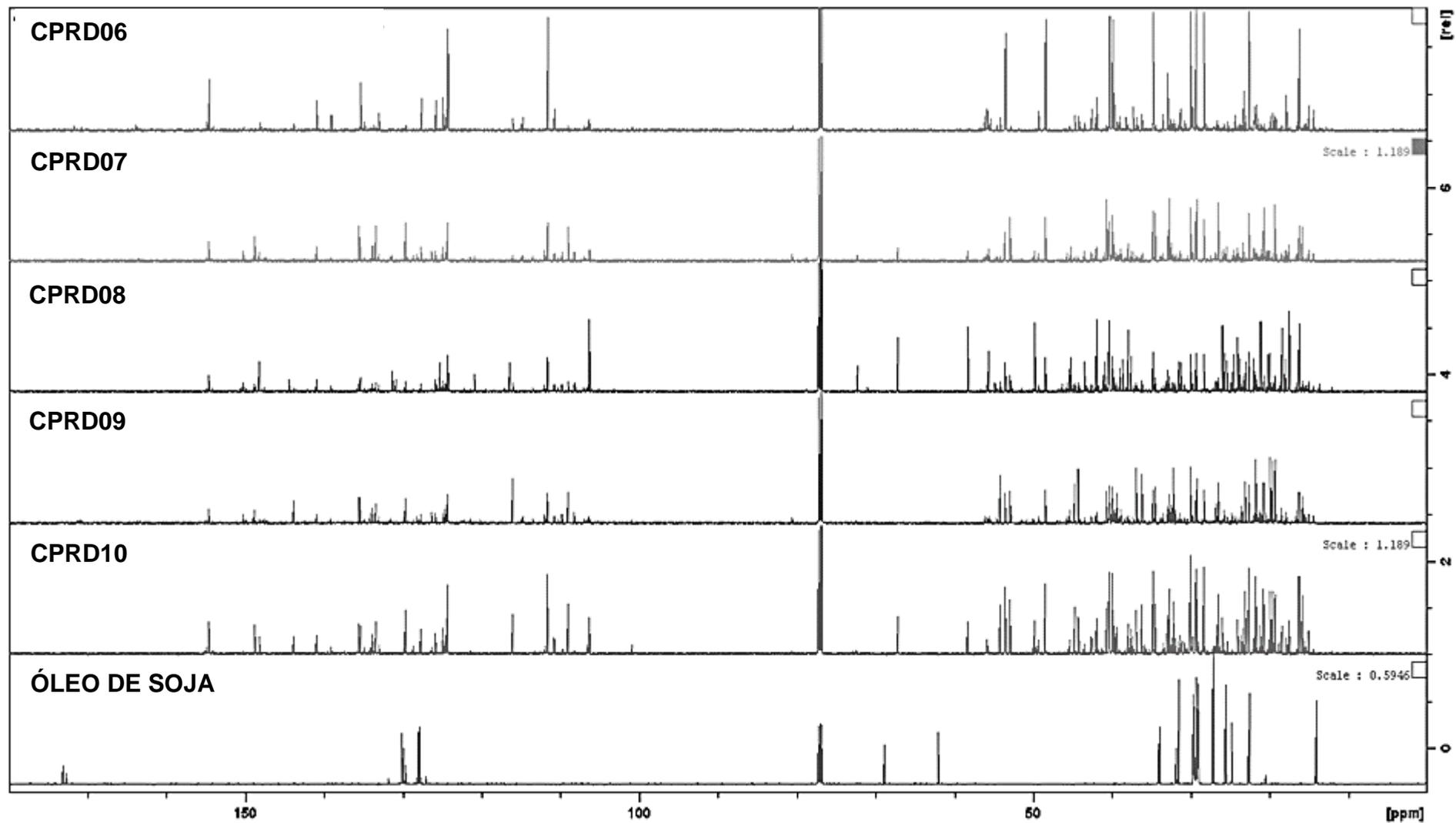
(Continuação do Apêndice 1) Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



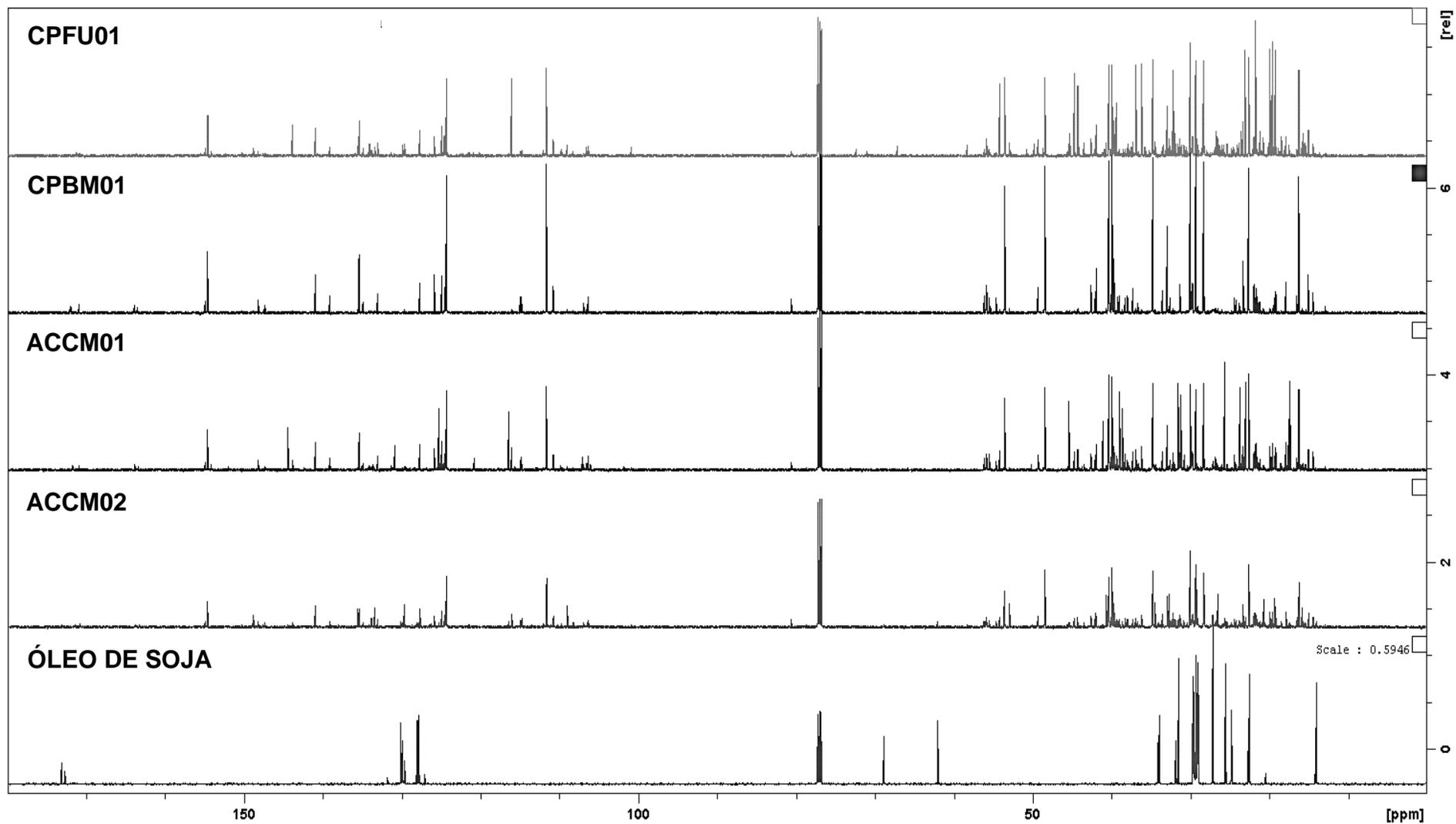
(Continuação do Apêndice 1) Espectros de RMN de ¹H das amostras autênticas e comerciais de copaíba (500 MHz, CDCl₃)



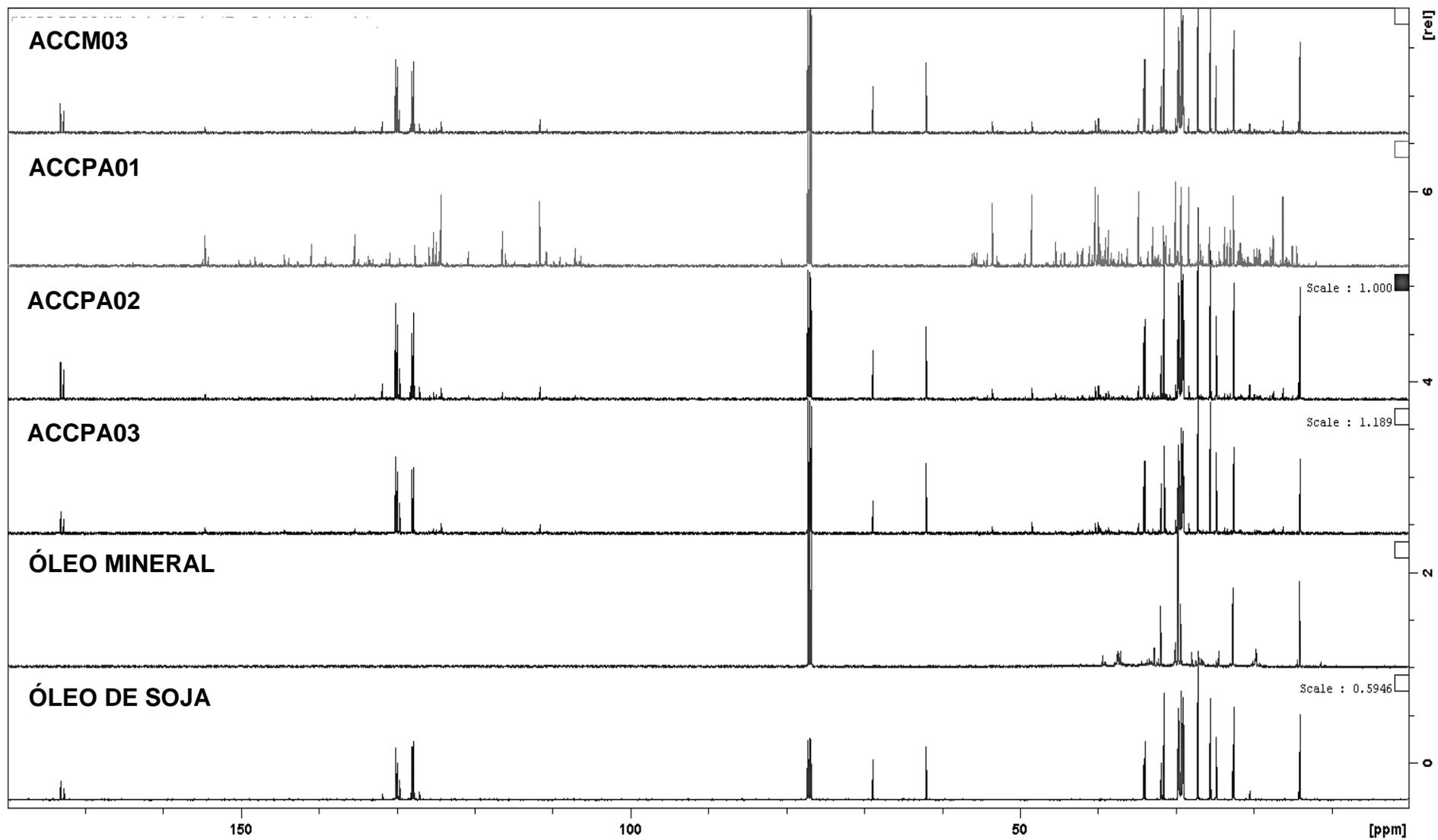
Apêndice 2 - Espectros de RMN de ¹³C das amostras autênticas e comerciais de copaíba (600 MHz, CDCl₃)



(continuação do apêndice 2) Espectros de RMN de ¹³C das amostras autênticas e comerciais de copaíba (600 MHz, CDCl₃)



(continuação do apêndice 2) Espectros de RMN de ^{13}C das amostras autênticas e comerciais de copaíba (600 MHz, CDCl_3)



(continuação do apêndice 2) Espectros de RMN de ¹³C das amostras autênticas e comerciais de copaíba (600 MHz, CDCl₃)

