



Universidade de Brasília

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica

TESE DE DOUTORADO

**Espectroscopia NIR, CG-EM e Quimiometria para o controle de qualidade
do Óleo de Copaíba (*Copaifera* spp.).**

Alessandro César de Oliveira Moreira

Orientador

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

Brasília, 2018.



Universidade de Brasília

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica

TESE DE DOUTORADO

Espectroscopia NIR, CG-EM e Quimiometria para o controle de qualidade do Óleo de Copaíba (*Copaifera* spp.).

Alessandro César de Oliveira Moreira

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutor em Tecnologias Química e Biológica.

Orientador

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

Brasília, 2018

COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese de Doutorado do aluno Alessandro César de Oliveira Moreira, matrícula nº 14/0106502, intitulada **“Espectroscopia NIR, CG-EM e Quimiometria para o Controle de Qualidade do Óleo de Copaíba (*Copaifera spp.*)”**, apresentada no Auditório Lauro Morhy do Instituto de Química – IQ da Universidade de Brasília – UnB, em 28 de março de 2018.

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof. Dr. Alexandre Florian da Costa

Membro Titular (FT/UnB)

Dr^a. Sandra Regina Afonso

Membro Titular (LPF/SFB)

Prof^a. Dr^a Simone Monteiro e Silva

Membro Titular (IQ/UnB)

Divino Eterno Teixeira

Membro Suplente (LPF/SFB)

Em 28 de março de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à minha amada esposa Andreia Couto Ribeiro, aos meus filhos Jaqueline Couto Moreira e Caio Couto Moreira, pelo companheirismo, amor, incentivo, paciência e compreensão.

Aos meus pais Sebastião (Japy) e Laurecy, meus irmãos, Angela, Célio, Júnior e Paula, pelo amor, força e incentivo.

Ao meu orientador Professor Dr. Jez Willian Batista Braga, pela grande paciência, confiança e ensinamentos oferecidos.

À Professora Dr^a. Carla Jovania Gomes Colares, pela amizade, apoio e contribuição na estruturação da minha proposta inicial do doutorado.

À Professora Dr^a. Fernanda Vasconcelos de Almeida, pelos ensinamentos em cromatografia gasosa.

Ao Professor Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado, pela ajuda e ensinamentos nas reações orgânicas necessárias nesta tese.

Aos demais professores e funcionários do Instituto de Química da UnB, que de alguma maneira contribuíram na minha formação.

Aos meus colegas Angélica, Hadassa, Laiz, Victor, Damiana, Fabiana, Gabriel, Jackeline, Thayna, Milenna, Cynthia, Arthur, Suzana, (se esqueci de citar alguém me desculpe) pelo companheirismo, mesmo nas minhas poucas idas ao Laboratório AQQUA.

Ao Professor Dr. Floriano Pastore pelo apoio e confiança.

Aos amigos da Área de Química do LPF, Lopes, Dhébora, Lúcia, Emanuela, Diego, Filipe, Liz, Tereza Pastore, Marcos Santana, Anne, Paulo Fontes, Pedro

Paulo, Eliete, Ulisses e Pedro pela grande ajuda, sem vocês eu não teria conseguido.

Aos demais amigos do LPF, que não irei nomear para não correr o risco de esquecer alguém, pela grande ajuda e apoio.

Aos meus amigos, João Paulo Sotero, Erismar Novaes (Baiano), João Bosco Monteiro de Souza (Bosco) e José Carlos Matte (Carlinhos), Alain, Alexandre Ilê, Júlia, Cida, Andrea, Luciana, Cristina, Janilce, meus irmãos de vida e de boemia, pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Químicas e Biológicas da UnB e ao Laboratório de automação, Quimiometria e Química Ambiental (AQQUA) pelo apoio e infraestrutura.

Ao Laboratório de Produtos Florestais do Serviço Florestal Brasileiro pelo apoio, infraestrutura e licença para finalização do doutorado.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica (INCTBio) pelo apoio financeiro.

Sobretudo a Deus.

RESUMO

O óleo de copaíba (OC) é um produto florestal não madeireiro muito usado na medicina popular e matéria prima de diversos produtos. Seu uso medicinal implica em um rigoroso controle de qualidade, no conhecimento de suas propriedades e estabilidade. Contudo, devido à sua grande variabilidade natural, os estudos e métodos de análise já descritos na literatura ainda não atendem adequadamente à demanda desse setor. A quimiometria aliada à técnicas analíticas vem sendo muito utilizada no controle de qualidade de diversos produtos, tais como fármacos, alimentos, combustíveis, etc, possibilitando métodos mais eficientes. Neste intuito, essa tese aplicou a quimiometria e diferentes técnicas analíticas para a análise e controle de qualidade do óleo de copaíba. Foi proposto um método utilizando-se de um espectrômetro portátil operando na região do infravermelho próximo (NIR) e PLSR para a determinação da pureza de óleos de *Copaifera langsdorffii* Desf., suspeitos de adulteração com óleo de soja. Foram obtidos erros médios da ordem de 1,5 % (v/v) e $R^2 = 0,991$, além de uma capacidade de detecção de 0,8% (v/v), sugerindo que sua aplicação pode abranger praticamente toda a faixa de concentração do OC. Também foi realizado um estudo de estabilidade de amostras de OC estocadas a diferentes temperaturas por 10 semanas com análise por CG-EM e PCA. Foi possível identificar diferenças entre as amostras estocadas à temperaturas elevadas e mais amenas, além de identificar o óxido de Cariófileno como indicador de degradação do OC. Um último estudo empregou a técnica NIR e modelagem por DD-SIMCA para identificar amostras autênticas de OC. Esse método foi capaz de diferenciar amostras de óleos de copaíbas autênticos de amostras adulteradas com cinco tipos de óleos comestíveis em diversos níveis de adulteração. Os métodos propostos nessa tese se mostraram práticos, rápidos, eficientes e com possibilidade de aplicação “*in situ*” em cooperativas ou por órgãos de fiscalização.

ABSTRACT

Copaiba oil (CO) oil is a non-timber forest product widely used in folk medicine and the raw material of various products. Its medicinal use implies a rigorous quality control, in the knowledge of its properties and stability. However, due to its great natural variability, the studies and analysis methods already described in the literature still do not adequately meet the demand of this sector. The use of chemometrics combined with analytical techniques has been widely used in the quality control of several products, such as pharmaceuticals, food, fuels, etc., enabling more efficient methods. In this sense, this thesis applied chemometrics and different analytical techniques for the analysis and quality control of copaiba oil. It was proposed a method using a portable infrared spectrometer (NIR) and PLSR to determine the purity of *Copaifera langsdorffii* Desf. oils suspected of adulteration with soybean oil. Mean errors of approximately 1.5% (v / v) and $R^2 = 0.991$ were obtained, in addition to a detection capacity of 0.8% (v / v), which suggests that its application may cover practically the entire concentration range of the CO. The stability of CO samples stored at different temperatures for 10 weeks with GC-MS and PCA analysis was also studied. It was possible to identify differences between the samples stored at elevated and cooler temperatures, besides the identification of Caryophyllene oxide as an indicator of the degradation of the CO. The final study applied the NIR technique and DD-SIMCA modeling to identify authentic CO samples. This method was able to differentiate samples of authentic copaiba oils from samples adulterated with five types of edible oils at various levels of adulteration. The methods proposed in this thesis were practical, fast, efficient and reliable for “*in situ*” applications in cooperatives or by inspection agencies.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS	xii
INDICE DE TABELAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvi
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	2
1.1 INTRODUÇÃO.....	2
1.2 JUSTIFICATIVA.....	3
1.3 OBJETIVO GERAL.....	4
1.3.1 Objetivos específicos	4
CAPÍTULO 2.....	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 GÊNERO COPAIFERA: Características e distribuição	6
2.1.1 Extração do óleo-resina de copaíba.....	9
2.1.2 Produção oficial de óleo de copaíba no Brasil.....	10
2.1.3 Composição do óleo-resina de copaíba	11
2.1.4 Utilizações do óleo de copaíba.....	15
2.2 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE AUTENTICIDADE / ADULTERAÇÃO DE ÓLEO DE COPAÍBA.....	16
2.2.1 Cromatografia Gasosa	17
2.2.2 Titulometria.....	21
2.2.3 Outras estratégias utilizadas	21
CAPÍTULO 3.....	23
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
3.1 Organização dos dados	25
3.1.1 Matrizes, vetores e escalares: Definições e notações.....	25
3.2 Pré-processamento de dados.....	26
3.2.1 Alinhamento de tempo de retenção em cromatogramas.....	26
3.2.2 Normalização	28
3.2.3 Derivadas	30

3.2.4	Centragem na média.....	30
3.2.5	Autoescalamento.....	31
3.3	Análise de componentes principais – PCA	31
3.4	Calibração multivariada	36
3.4.1	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais - PLSR	38
3.4.2	Figuras de Mérito em Calibração Multivariada	41
3.5	Classificação por Modelagem Independente por Analogia de Classes direcionado pelos dados (DD-SIMCA).	45
CAPÍTULO 4.....		50
4 DETERMINAÇÃO DA PUREZA DO ÓLEO DE COPAÍBA UTILIZANDO UM ESPECTRÔMETRO PORTÁTIL NIR E PLSR EM AMOSTRAS SUSPEITAS DE ADULTERAÇÃO COM ÓLEO DE SOJA.....		51
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
□	Equipamentos, vidrarias, acessórios e insumos.	52
□	Solventes e reagentes	54
□	Reagentes	54
4.1.1	Escolha da espécie de <i>Copaifera</i>	54
4.1.2	Análise de amostras em Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas (CG-EM).....	55
4.1.3	Preparação das amostras com adulterações controladas.....	58
4.1.4	Aquisição dos espectros NIR das amostras de óleo copaíba.....	60
4.1.5	Validação das amostras adulteradas por cromatografia gasosa com espectrometria de massas acoplada (CG-EM)	61
4.1.6	Validação com amostras comerciais e adulterações com óleo de fritura.	62
4.1.7	Desenvolvimento de modelo em PLSR.....	62
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.2.1	Caracterização cromatográfica das amostras de óleo de copaíba...64	
4.2.2	Espectros NIR das amostras de óleo de copaíba	68
4.2.3	Desenvolvimento e validação do modelo PLSR.....	69
4.3	CONCLUSÕES.....	76
CAPÍTULO 5.....		78

5	APLICAÇÃO DE ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) NA IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES EM ÓLEO DE COPAÍBA SUBMETIDO AO ENVELHECIMENTO FORÇADO POR ESTRESSE TÉRMICO	79
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS	81
5.1.1	Equipamentos, vidrarias e acessórios.....	81
5.1.2	Solventes e reagentes.....	82
5.1.3	Escolha e preparo das amostras.....	83
5.1.4	Amostragem.....	85
5.1.5	Ensaio Físico-Químico.....	85
5.1.6	Aquisição dos espectros no infravermelho próximo das amostras...86	
5.1.7	Análise das amostras no Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas - CG-EM	87
5.1.8	Desenvolvimento dos modelos em PCA	89
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
5.2.1	Caracterização físico-química dos óleos submetidos ao estresse térmico	93
5.2.2	Caracterização das amostras por cromatografia gasosa com detecção de espectros de massas – CG-EM.....	96
5.3	CONCLUSÕES.....	109
	CAPÍTULO 6.....	111
6	DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA IDENTIFICAR A AUTENTICIDADE DE ÓLEOS DE COPAÍBA, COM O USO DE ESPECTROSCOPIA NIR E DD-SIMCA	112
6.1	MATERIAIS E MÉTODOS	114
6.1.1	Equipamentos, vidrarias, acessórios e solventes.....	114
6.1.2	Escolha e preparação das amostras para o desenvolvimento do modelo	114
6.1.3	Aquisição dos espectros das amostras no infravermelho próximo (NIR)	117
6.1.4	Desenvolvimento do modelo DD-SIMCA	118
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
6.3	CONCLUSÕES.....	126

7	CONCLUSÕES GERAIS	128
7.1	Perspectivas futuras	128
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
	Anexo I – Dados da obtenção das amostras de óleo de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.....	153
	Anexo II - Protocolo de adulteração de óleo de copaíba com óleo de soja	154
	Anexo III - Protocolo para preparação de curva de calibração de Óleo de Copaíba adulterado com óleo de soja, para uso em cromatógrafo gasoso.	158
	Anexo IV - Resultados das análises em CG-EM das amostras utilizadas na construção do modelo PLSR.....	160
	Anexo V - Ordem de sorteio das amostragens semanais para os ensaios de Estresse térmico.....	163
	Anexo VI - Resultados das análises em CG-EM das amostras submetidas à estresse térmico.	164
	Anexo VII – Planejamento de preparação de Misturas Binárias e Misturas Ternárias	168
	Anexo VIII – Planejamento de adulterações de misturas binárias e ternárias de óleos de copaíba, com, Azeite de Dendê (AD), Azeite de Oliva (AO), Óleo de Girassol (OG) e Óleo de coco Licuri (OL).	170

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ANOVA	Análise de Variância (do inglês, <i>Analysis of Variance</i>)
CC β	Capacidade de detecção
CCD	Cromatografia de camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
cSt	Centistokes (unidade de medida de viscosidade cinemática)
DD-SIMCA	Modelagem Independente por Analogia de Classes direcionado pelos dados (do inglês, <i>data driven – soft independent modeling of class analogy</i>)
IA	Índice de acidez
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Icoshift	(do inglês, <i>Interval Correlation Optimised Shifting</i>)
IE	Índice de éster
NIR	Infravermelho próximo (do inglês, <i>Near Infrared</i>)
NIST	Banco de dados utilizado na identificação de compostos por espectros de massas (do inglês National Institute of Standards and Technologies)
OCC	Classificador de classe única (do inglês, <i>One Class Classification</i>)
PC	Componente principal (do inglês, <i>Principal Component</i>)
PCA	Análise de componentes principais (do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>)

PLSR	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, <i>Partial Least Squares Regression</i>)
R ²	Coeficiente de determinação
REP	Erro relativo da predição (do inglês, <i>Relative Error of Prediction</i>)
RMSEC	Raiz quadrada do erro médio quadrado da calibração (do inglês, <i>Root Mean Squared Error of Calibration</i>)
RMSECV	– Raiz quadrada do erro quadrado da validação cruzada (do inglês, <i>Root Mean Squared Error of Cross Validation</i>)
RMSEP	– Raiz quadrada do erro médio quadrado da predição (do inglês, <i>Root Mean Squared Error of Prediction</i>)
SNV	Padronização normal de sinal (do inglês, <i>Standard Normal Variate</i>)
VL	Variável Latente

INDICE DE TABELAS

Tabela 2-1 – Relação de espécies arbóreas do gênero Copaifera de ocorrência no Brasil [7].....	8
Tabela 4-1 – Planejamento experimental para a composição das amostras de calibração e validação.....	59
Tabela 4-2 - Figuras de mérito dos modelos de PLSR para a determinação da pureza de OC no modo de calibração.....	70
Tabela 4-3 - Figuras de mérito obtidas para os modelos de PLSR para a determinação da pureza de OC no conjunto de validação.....	72
Tabela 4-4 – Resultados das estimativas de pureza, por amostras externas de óleos de copaíba adulterados e testados no 1º modelo.....	76
Tabela 5-1 - Relação dos 53 compostos mais abundantes detectados nas amostras de óleo de copaíba submetidas à estresse térmico.....	90
Tabela 5-2 – Análise de variância (ANOVA) do Índice de Refração a 99% de nível de confiança.	93
Tabela 5-3 - Análise de variância (ANOVA) da Densidade.....	94
Tabela 5-4 - Resumo dos valores da Densidade com comparação de médias (teste de Tukey)	94
Tabela 5-5 - Análise de variância (ANOVA) do Índice de Acidez.....	95
Tabela 5-6- Resumo dos resultados obtidos para índices de acidez.....	95
Tabela 5-7 - Análise de variância (ANOVA) dos resultados de Viscosidade. ...	96
Tabela 5-8 - Resumo dos valores da Viscosidade com comparação de médias pelo teste de Tukey.....	96

Tabela 5-9 - Parâmetros auxiliares de escolha de modelo PCA por pré-processamento.....	106
Tabela 6-1 – Conjuntos de amostras de óleo de copaíba utilizadas no desenvolvimento do método DD-SIMCA.....	115
Tabela 6-2 – Definição das siglas empregadas nos subconjuntos de treinamento e validação utilizados na Tabela 6-1.	116
Tabela 6-3 - Figuras de mérito do método desenvolvido para a classificação de óleos de copaíba autênticos.....	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1 – Distribuição da ocorrência de espécies do Gênero <i>Copaifera</i> pelo mundo (destacado em vermelho no mapa) (baseada na referência [6]).	6
Figura 2-2 – Cortes longitudinais de órgãos vegetativos do tronco de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (A: Cavidades arredondadas no cortex; B: canais alongados no caule) [8].	7
Figura 2-3 - Coleta de óleo-resina de copaíba, (A) perfuração do tronco com trado; (B) dreno e coletor instalados na incisão; (C) orifício ainda aberto*; (D) orifício já lacrado e cicatrizado*. * Circundado em vermelho (Fotos do autor).	10
Figura 2-4 - Produção brasileira e preço do Óleo de copaíba de 1986 à 2016 (IBGE) [19].	11
Figura 2-5 - Cromatograma de óleo-resina de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (Figura produzida com dados desta tese).	12
Figura 2-6 - Estruturas dos sesquiterpenos predominantes no óleo de copaíba identificados nas referências [1, 2, 20, 25, 26].	13
Figura 2-7 - Estruturas dos diterpenos predominantes no óleo de copaíba identificados nas referências [3, 5, 9, 25, 26].	14
Figura 3-1 - Fragmento de um grupo de 120 cromatogramas de óleo de copaíba desalinhados (Dados reais, referentes a ensaios realizados no capítulo 5 desta tese).	27
Figura 3-2 - Fragmento de um grupo de 120 cromatogramas de óleo de copaíba alinhados após tratamento dos dados pelo algoritmo Icoshift (Dados reais, referentes a ensaios realizados no capítulo 5 desta tese).	28

Figura 3-3 - Exemplo didático com uma distribuição em três dimensões das variâncias. (a) PC1 X PC2 e (b) PC2 x PC3 (adaptação: Ferreira (2015)) [41].	33
Figura 3-4 - Montagem da Matriz (X) com dados de espectros.	33
Figura 3-5 - Representação esquemática da construção de um modelo matemático de previsão de informações químicas. (adaptado de Ferreira (2015)) [41].	36
Figura 3-6 – (a) Esquema que ilustra a rotação que é realizada em uma PC para maximizar a correlação com o vetor <i>y</i> . (b) Representação esquemática da variável latente (VL) com sua direção otimizada.	39
Figura 4-1 - Área de coleta de amostras <i>in situ</i> , indicada com a seta azul (imagem obtida no Google Earth).	55
Figura 4-2 - Esquema simplificado da transesterificação total de um triacilglicerídeo em ésteres metílicos por catálise básica com hidróxido de sódio (a: Triacilglicerídeo, b: Metanoato de sódio, c: Ésteres metílicos, d: Glicerol).	57
Figura 4-3 - Esquema geral de preparação das amostras de calibração e validação.	58
Figura 4-4 - Aparato desenvolvido no laboratório para leitura de líquidos no espectrômetro MicroNir 1700®.	60
Figura 4-5 - (A) Óleos de copaíba autênticos; (B) Amostras de calibração adulteradas; (C) Amostras de validação adulteradas; (D) Aparato de aquisição de espectros em amostras líquidas.	61
Figura 4-6 – Foto das amostras puras de óleo de copaíba.	64
Figura 4-7 - Cromatograma obtido para a amostra CO-17 após processo de transesterificação.	65

Figura 4-8 - Análise de componentes principais das amostras CO-01 a CO-17 (PC1 x PC2).	66
Figura 4-9 – Gráfico de pesos das amostras CO-01 a CO-17 (PC1 x PC2)	67
Figura 4-10 - Espectros NIR de amostras de OC (Óleo de copaíba puro), OCOS (Óleo de copaíba adulterado com óleo de soja) e OS (Óleo de soja puro). Para facilitar a visualização dos três grupos de amostras, um deslocamento na linha de base foi adicionado a cada grupo.....	68
Figura 4-11 – Gráficos de T^2 de Hotelling <i>versus</i> resíduos Q, para os quatro modelos testados, (•) amostras de calibração, (▼) amostras de validação.	71
Figura 4-13 - regiões de confiança conjunta elíptica (EJCR) para os modelos PLSR desenvolvidos: (—) 1º modelo, (—) 2º modelo, (—) 3º modelo, (—) 4º modelo.	73
Figura 4-14 – Valores de referência <i>versus</i> valores estimados para as amostras de (•) calibração e (▼) validação.	74
Figura 4-15 – Dispersão de resíduos (erros absolutos) <i>versus</i> valores estimados de teores de pureza, das amostras de (•) calibração e (▼) validação.	75
Figura 5-1 - Envase das amostras de óleo de copaíba para teste de envelhecimento acelerado. A : envase de amostras, B : Lacração dos frascos em atmosfera inerte.	83
Figura 5-2 - Esquema de organização das amostras de óleo de copaíba submetidas a estresse térmico, (A) Grupo 2, (B) Grupo 3 e (C) Grupo 4.....	84
Figura 5-3 - Representação gráfica das áreas médias normalizadas dos picos dos 53 compostos mais abundantes das amostras semanais de óleo de copaíba submetidas à estresse térmico. As áreas normalizadas maiores que 1 % exibem, complementarmente, barras de erros referentes aos respectivos desvios padrão. ..	89

Figura 5-4 – Cromatogramas das médias das amostras semanais de óleo de copaíba por ambiente.....	91
Figura 5-5 - Espectros NIR das médias das amostras semanais de óleo de copaíba por ambiente.....	92
Figura 5-6 - Cromatogramas das amostras submetidas à estresse térmico. com a identificação de alguns picos. A Identificação dos picos começados pela letra “S” equivalem aos sesquiterpenos, Picos começados pela letra “D” equivalem aos diterpenos.....	97
Figura 5-7 - Compostos diterpênicos detectados nas amostras de óleo de copaíba submetidas à estresse térmico.* Ácidos detectados como ésteres metílicos.	97
Figura 5-8 - Compostos sesquiterpênicos detectados nas amostras de óleo de copaíba submetidas à estresse térmico.	98
Figura 5-9 - (A) Gráfico de escores PC1 x PC2 de escores, (B) Gráfico de pesos PC1 x PC2 do modelo NIR	99
Figura 5-10 - Gráfico de escores de PC1xPC2 para as amostras de óleo de copaíba pré-processadas com centragem na média. (♦) Estufa, (▲) Geladeira e (●) Câmara Climatizada.....	101
Figura 5-11 - Influência dos pesos dos compostos no agrupamento de amostras em PC1 x PC2	102
Figura 5-12 - Variação dos valores normalizados das áreas relativas dos compostos S1 - δ -Elemeno, S19 - β -Bisaboleno, S36 – Óxido de Cariofileno e D10 – Ácido Caurênico* (* detectado como um éster metílico) em ambiente estufa ao longo das 10 semanas do estudo.** amostras de óleo de copaíba em atmosfera de nitrogênio.....	103

Figura 5-13 - Cromatogramas médios das amostras de óleo de copaíba submetidas à estresse térmico. a – cromatogramas sem alinhamento; b - cromatogramas alinhados pelo icoshift.	105
Figura 5-14 - Comparação dos gráficos de distribuição de escores entre duas PC's ortogonais na discriminação das amostras submetidas à estresse térmico. ..	107
Figura 5-15 - Pesos do PC 4 x tempo de retenção do modelo 3. S1: δ -Elemeno, S2: α -Cubebeno, S19: β -Bisaboleno, S29: Ledol, S36: Óxido de Cariofileno, D10: éster metílico do Ácido Caurênico, D12: N.I., D13: N.I., D15: éster metílico do Ácido Hardwickiico.	109
Figura 6-1 - Espectros brutos médios NIR dos conjuntos de amostras de óleo de copaíba de treinamento (a), e validação (b).	117
Figura 6-2 - Espectros NIR das amostras de treinamento e validação. Foi adicionado um deslocamento positivo na linha de base das amostras de treinamento para facilitar a visualização e comparação dos espectros.	119
Figura 6-3 - Valores da Raiz da Média Quadrática dos Erros de Validação Cruzada (RMSECV) <i>versus</i> nº de Componentes Principais.....	120
Figura 6-4 - Comparação entre os limites de aceitação do modelo para um nível de aceitação de 99 % (alfa = 0,01) e 99,6 % (alfa = 0,004).	121
Figura 6-5 - Modelo classificador de classe única para óleos de copaíba autênticos.....	122
Figura 6-6 – Distribuição das amostras do conjunto de validação e suas relações com o modelo de classificação de óleos de copaíba autênticos desenvolvido.	123
Figura 6-7 - Identificação de tendência no posicionamento espacial das amostras adulteradas em laboratório, indicado pela seta na cor preta.	126



CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

O uso do óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) no Brasil é relatado desde a época dos primeiros exploradores, que observaram a sua utilização pelos indígenas para diversas finalidades curativas, principalmente na cicatrização de feridas. Devido à carência de medicamentos vindos da Europa, o uso do óleo de copaíba foi incorporado nos tratamentos médicos dos colonizadores. Ainda hoje este óleo é utilizado na medicina popular brasileira, em especial pela população do norte do país.

A utilização desse recurso florestal não madeireiro pelas indústrias de tintas, de cosméticos e farmacêutica na composição de alguns de seus produtos, seu valor agregado, assim como sua demanda gerando a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos para o controle desse insumo, como já relatado em diversos estudos científicos [1, 2, 3, 4, 5].

A complexidade e a variabilidade de composição encontrada nos óleos de copaíba é um fator que dificulta o desenvolvimento de um método químico convencional, que possa abarcar e resolver eficientemente, os aspectos relacionados com a qualidade desses óleos, como a identificação e quantificação de adulterações, assim como identificar alterações de composição devido às condições ambientais.

O uso de técnicas analíticas instrumentais como a espectroscopia no infravermelho, espectroscopia Raman, fluorescência molecular, ressonância magnética nuclear, cromatografia, dentre outras, têm em comum a geração de dados multivariados para uma mesma amostra. Com análise desses dados aliados à quimiometria pode-se obter informações que muitas vezes resolvem limitações impostas pelos métodos analíticos mais convencionais.

Diante desse desafio, esta tese tenta propor uma abordagem quimiométrica para as análises de qualidade dos óleos de copaíba. A tese foi dividida em oito

capítulos, onde o primeiro capítulo é composto por esta introdução, justificativas e objetivos.

No segundo capítulo é apresentada uma revisão bibliográfica sobre o gênero *Copaifera* e sua distribuição pelo mundo, espécies, forma de obtenção dos óleos de copaíba, composição química, utilizações do óleo, técnicas e métodos utilizados na identificação da sua autenticidade.

O terceiro capítulo aborda a fundamentação teórica da quimiometria, seus aspectos históricos, divisões, organização e análise dos dados, além dos modelos quimiométricos utilizados nesta tese.

O quarto capítulo descreve a proposta da utilização de um espectrômetro NIR portátil aliado à técnica quimiométrica Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLSR – do inglês, *Partial Least Squares Regression*), na quantificação da pureza de óleos de copaíba da espécie *Copaifera langsdorffii* Desf., suspeitos de estarem adulterados com óleo de soja.

No Quinto capítulo é abordado a utilização da cromatografia gasosa e espectroscopia NIR aliada a Análise de Componentes Principais (PCA – do inglês, *Principal Component Analysis*), no estudo das amostras que sofreram alterações devido a exposição a estresse térmico.

O sexto capítulo apresenta a proposta de um método baseado em um classificador de classe única (OCC), com a utilização de espectroscopia NIR e DD-SIMCA, como instrumento de controle de qualidade, para a identificação da autenticidade de óleos de copaíba.

O sétimo e o oitavo capítulos finalizam esta tese apresentando respectivamente as conclusões gerais e as referências bibliográficas.

1.2 JUSTIFICATIVA

Considerando que a utilização do óleo de copaíba como insumo básico na manipulação de cosméticos e fármacos, tem se intensificado, notadamente em

razão do aumento do uso de produtos naturais com propriedades comprovadamente curativas. Desta forma, o desenvolvimento de métodos de análise que permitam a redução de custo de análise, obtenção de menores erros, maior frequência analítica e que possam ser aplicados em campo são necessários para a maior segurança quanto à utilização desse produto.

1.3 OBJETIVO GERAL

No intuito de contribuir para o controle de qualidade deste recurso natural de origem florestal, cujo Brasil é um grande produtor, esta tese se propõe a desenvolver métodos eficientes e que facilitem a análise de óleo de copaíba por produtores deste insumo, além de órgãos de fiscalização e controle, através da utilização de métodos instrumentais de análise aliados à quimiometria.

1.3.1 Objetivos específicos

- Desenvolver um método para determinação da pureza de óleo da espécie *Copaifera langsdorffii* Desf. empregando espectrofotômetro portátil na região do NIR e calibração multivariada por regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR);
- Estudar as alterações nas propriedades físico-químicas, assim como da composição de óleo de copaíba submetido a processo de envelhecimento forçado por estresse térmico;
- Desenvolver método para a identificação da autenticidade do óleo de copaíba baseado em um método classificador de classe única.

CAPÍTULO 2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GÊNERO *Copaifera*: Características e distribuição

O gênero *Copaifera* é composto por formas arbustivas e arbóreas, com mais de 70 espécies, cujo crescimento é lento e podem alcançar nas formas arbóreas os 40 metros de altura e os 400 anos de idade, estando distribuídas entre a África Ocidental e as Américas, desde o México até o norte da Argentina [6, 7], Figura 2-1.

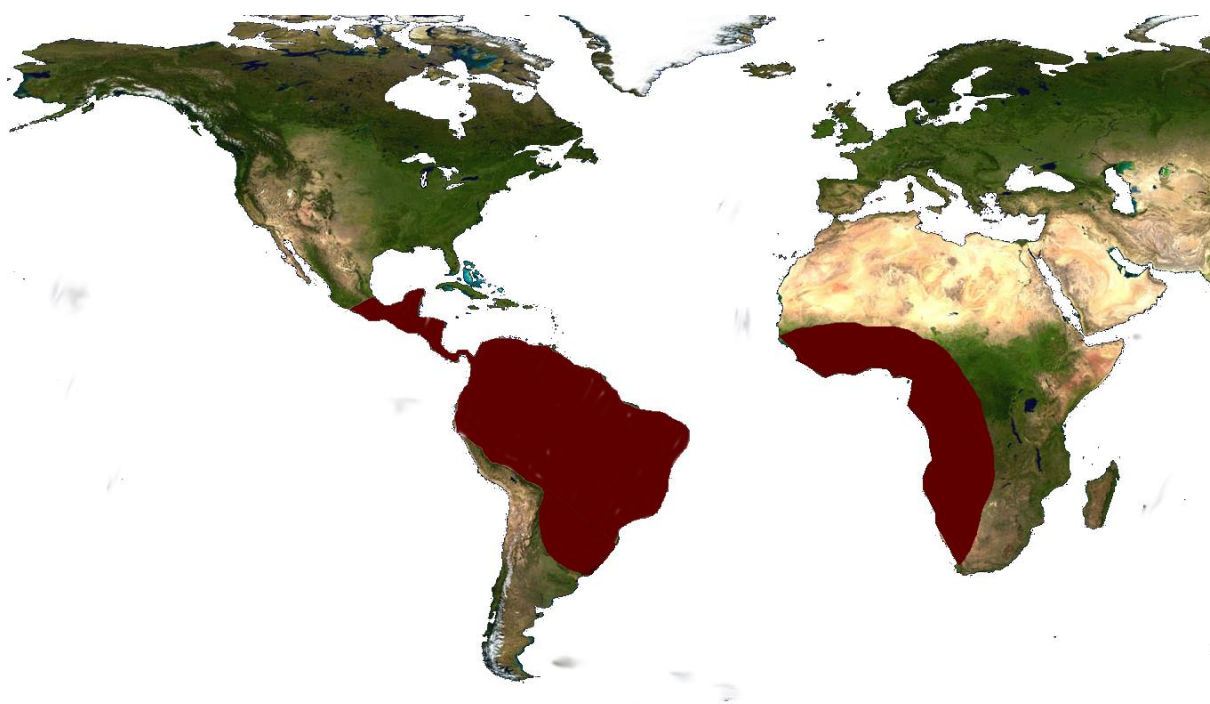


Figura 2-1 – Distribuição da ocorrência de espécies do Gênero *Copaifera* pelo mundo (destacado em vermelho no mapa) (baseada na referência [6]).

Este gênero pertence à família das *Fabaceae*, subfamília *Caesalpinioideae* e tem como característica a presença de cavidades e canais secretores (Figura 2-2), responsáveis pela síntese e acúmulo de óleo-resina, que tem a função de proteção da planta, o que pode ser responsável pelo sucesso na sua propagação em diversos ambientes [8].

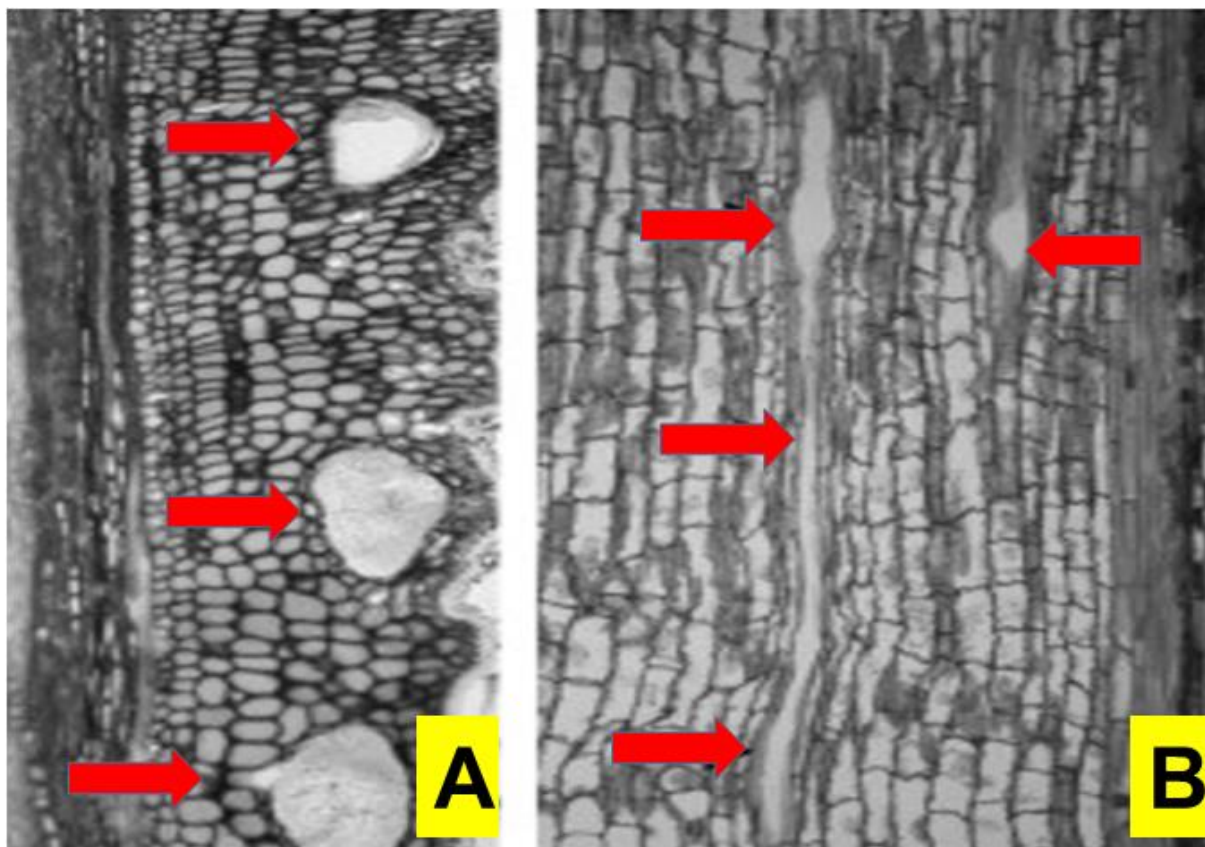


Figura 2-2 – Cortes longitudinais de órgãos vegetativos do tronco de *Copaifera langsdorffii* Desf. (A: Cavidades arredondadas no cortex; B: canais alongados no caule) [8].

Segundo Biavatti *et al.*, o nome copaíba deriva da palavra de origem tupi “cupayba”, árvore que tem depósito ou filão, em referência ao óleo que fica estocado no seu tronco [9]. Os nomes pelos quais as *Copaiferas* são conhecidas popularmente no Brasil são: copaibeira, pau-d’óleo, copaíba, podói, cupaúba, cupiúva, copaíba branca, copaíba vermelha, copaíba-mari-mari, copaíba angelim, copaíba-roxa, copaíba-preta, óleo-de-copaíba, copaúva, pau-de-óleo, copai, copaibo, copal, bálsamo dos jesuítas, maram, copaibarana, óleo-pardo, bálsamo, caobi, capíba, copaibeira-de-minas, copaíba-de-várzea, óleo-amarelo, óleo-capaíba, oleiro, páu-óleo, pau-de-óleo-de-copaíba, pau-óleo-do-sertão [6, 10, 1, 9, 11, 12]. Segundo a base de dados do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (REFLORA) [7], existem 35 espécies de ocorrência natural no Brasil, incluindo as variações, e estão distribuídas entre as formas de vida: subarbusto, arbusto, arbusto-árvore e árvore, dessas, estando distribuídas por todos os estados brasileiros, com exceção de

Alagoas e o Sergipe. As espécies essencialmente arbóreas de *Copaifera* do Brasil estão listadas na Tabela 2-1.

Tabela 2-1 – Relação de espécies arbóreas do gênero *Copaifera* de ocorrência no Brasil [7].

Espécie	Biomás	Estados de ocorrência
<i>Copaifera arenicola</i> (Ducke) J.Costa & L.P.Queiroz	Caatinga	(BA, CE, PE e RN) ¹
<i>Copaifera cearenses</i> Huber ex. Ducke	Caatinga	(BA, CE, PI, RJ) ¹
<i>Copaifera duckei</i> Dwyer	Amazônico, Cerrado e Mata Atlântica	(PA, TO, BA, CE, MA, PB, PI e RJ) ¹
<i>Copaifera glycyarpa</i> Ducke	Amazônico	(AM, PA, RO e MT) ¹
<i>Copaifera guyanensis</i> Desf.	Amazônico	(AM) ¹
<i>Copaifera lucens</i> Dwyer	Mata Atlântica	(ES, MG, RJ e SP) ¹
<i>Copaifera krukovii</i> (Dwyer) J.A.S. Costa	Amazônico	(AC, AM) ¹
<i>Copaifera majorina</i> Dwyer	Mata Atlântica	(BA) ¹
<i>Copaifera martii</i> Hayne var. <i>rigida</i> (Benth.) Ducke	Caatinga e Cerrado	(PA, TO, CE, MA e PI) ¹
<i>Copaifera multijuga</i> Hayne	Amazônico	(AM, PA, RO e MT) ¹
<i>Copaifera oblongifolia</i> var. <i>dawsonii</i> Cowan	Amazônico e Cerrado	(PA, MA, PI) ¹
<i>Copaifera paupera</i> (Herzog) Dwyer	Amazônico	(AC) ¹
<i>Copaifera pubiflora</i> Benth.	Amazônico	(RR) ¹
<i>Copaifera reticulata</i> Ducke	Amazônico	(AP, PA, RR e MT) ¹
<i>Copaifera trapezifolia</i> Hayne	Mata Atlântica	(BA, PE, MG, RJ, SP, PR e SC) ¹
<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. ²	Amazônico, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica	(todos os estados exceto AL, SE, RR, AP e PA) ¹

¹ Estados: AC – Acre; AL – Alagoas; AM – Amazonas; AP – Amapá; BA – Bahia; CE – Ceará; ES – Espírito Santo; MA – Maranhão; MG – Minas Gerais; MT – Mato Grosso; PA – Pará; PB – Paraíba; PE – Pernambuco; PI – Piauí; PR – Paraná; RJ – Rio de Janeiro; RN – Rio Grande do Norte; RO – Rondônia; RR – Roraima; SC – Santa Catarina; SE – Sergipe; SP – São Paulo; TO – Tocantins.

² A espécie *Copaifera langsdorffii* Desf. possui quatro variedades.

A espécie *Copaifera officinalis* (Jacq.) L. está citada no banco de dados REFLORA como de não ocorrência no Brasil [7], todavia, na Base de dados Tropicos[®] do Missouri Botanical Garden, esta espécie está relacionada como de ocorrência no Brasil e outros países da América do Sul e Central [13]. Diversos estudos envolvendo as espécies do gênero *Copaifera*, relacionam tal espécie, como de ocorrência no território brasileiro [6, 10, 11, 14, 15].

2.1.1 Extração do óleo-resina de copaíba

No gênero *Copaifera* o óleo-resina, está estocado no seu tronco e galhos em células tubulares, interconectados, contudo sua localização espacial no que se refere ao tronco é imprecisa, podendo-se encontrar o óleo-resina, em algum ou mais pontos, desde o centro até as extremidades do mesmo, quando estes são talhados e/ou perfurados [14, 16].

Diversos métodos podem ser utilizados para a retirada de óleo-resina de copaíba, Veiga Jr. & Pinto (2002) em revisão sobre o gênero *Copaifera*, levantaram os métodos utilizados para a retirada deste produto, que consistem na sua grande maioria em meio inadequados e muito prejudicial às árvores submetidas à tais práticas, que iam desde cortes com machados no tronco, incisões em “V” (como na retirada de látex das seringueiras), retirada do óleo por meio de bombeamento mecânico e estrangulamento da árvore com cipós, todas estas práticas descritas são altamente prejudiciais à sanidade da árvore, podendo levar à morte da planta [6].

O método que atualmente está cada vez mais difundido e é indicado como o menos danoso à planta, consiste na perfuração do tronco através de uma broca manual, também conhecida como trado, onde uma incisão é realizada a aproximadamente 1 metro de altura do tronco com uma broca de aproximadamente 3/4 de polegada (~2cm) de diâmetro, onde a perfuração deve ser realizada em indivíduos com um diâmetro de tronco de pelo menos 40 cm, a retirada do óleo por esse orifício, pode ser feita com a incisão de um dreno tubular onde o óleo-resina é coletado em um recipiente. Após a retirada do óleo que pode levar alguns dias, o orifício é fechado, conforme ilustrado na Figura 2-3, [3, 6, 10, 14, 16, 17, 18]

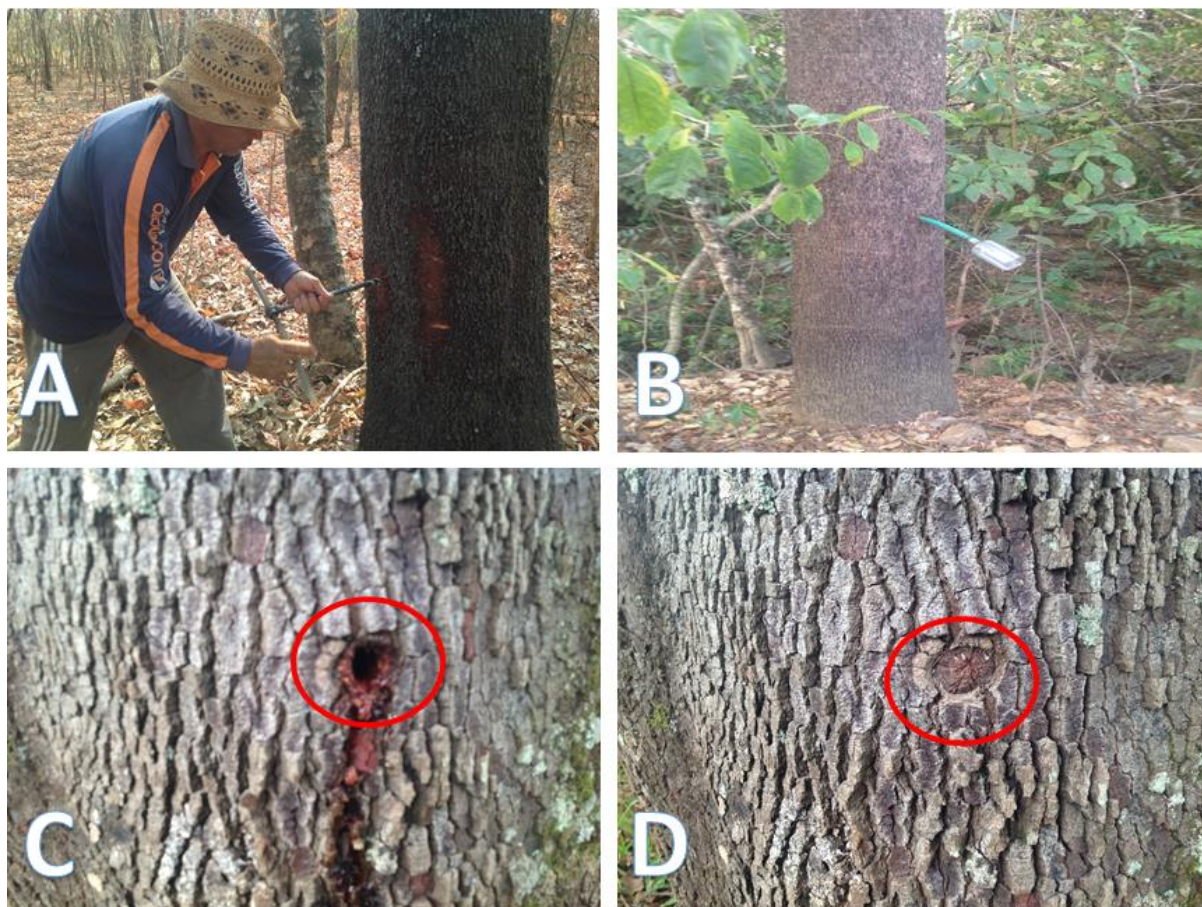


Figura 2-3 - Coleta de óleo-resina de copaíba, (A) perfuração do tronco com trado; (B) dreno e coletor instalados na incisão; (C) orifício ainda aberto*; (D) orifício já lacrado e cicatrizado*. * Circundado em vermelho (Fotos do autor).

2.1.2 Produção oficial de óleo de copaíba no Brasil

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE apresentados na Figura 2-4, a produção de óleo-resina de copaíba no Brasil para o período de 1986 a 2010, mostrou um aumento de mais de 1240%, embora a valorização do quilograma do produto em dólares americanos (US\$) no mesmo período tenha sido um pouco acima de 500%. No entanto, a produção de 2010 a 2016 apresentou uma queda de mais de 70%, contrastando com a valorização do produto que foi superior a 35% para o mesmo período [19], indicando um aumento na procura deste óleo.

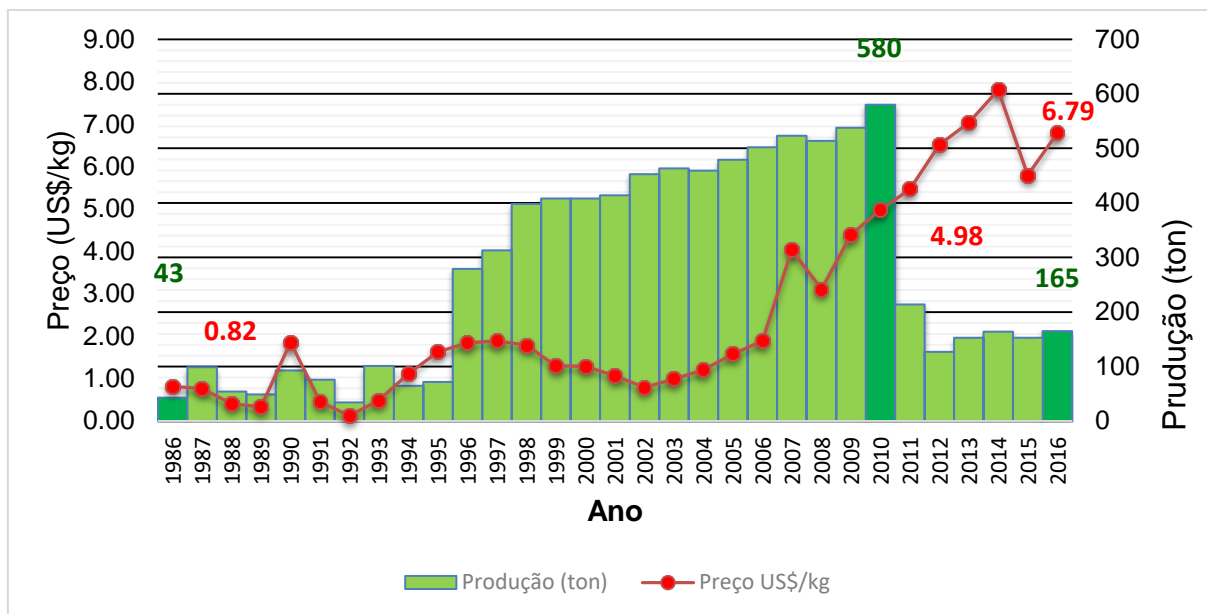


Figura 2-4 - Produção brasileira e preço do Óleo de copaíba de 1986 à 2016 (IBGE) [19].

Há registros de exportação de óleo de copaíba para o continente europeu desde o final do século XVIII, nas últimas décadas do século XX, a Alemanha, França, Inglaterra e Estados Unidos, foram os principais importadores desta matéria prima do Brasil [6].

2.1.3 Composição do óleo-resina de copaíba

Existem no Brasil, várias espécies de *Copaiferas* produtoras de óleo-resina, tais como: *C. officinalis* L., *C. multijuga* Hayne, *C. reticulata* Ducke, *C. langsdorffii* Desf., dentre outras [6], onde a composição do óleo varia entre espécies e entre indivíduos da mesma espécie [1, 4, 6, 20].

Este óleo-resina é composto basicamente de uma parte resinosa que corresponde aos diterpenos, estando estes dissolvidos em óleos com predominância de compostos sesquiterpênicos [1, 6, 21, 22, 23, 24]. Veiga Jr. *et al.*(1997) em estudo envolvendo amostras autênticas e comerciais de óleo-resina de copaíba por meio de cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas, identificou duas regiões de eluição distintas nos cromatogramas analisados, uma com menor tempo de retenção onde foram detectados os sesquiterpenos e na

de maior tempo de retenção localizavam-se os diterpenos [1], conforme ilustra a Figura 2-5.

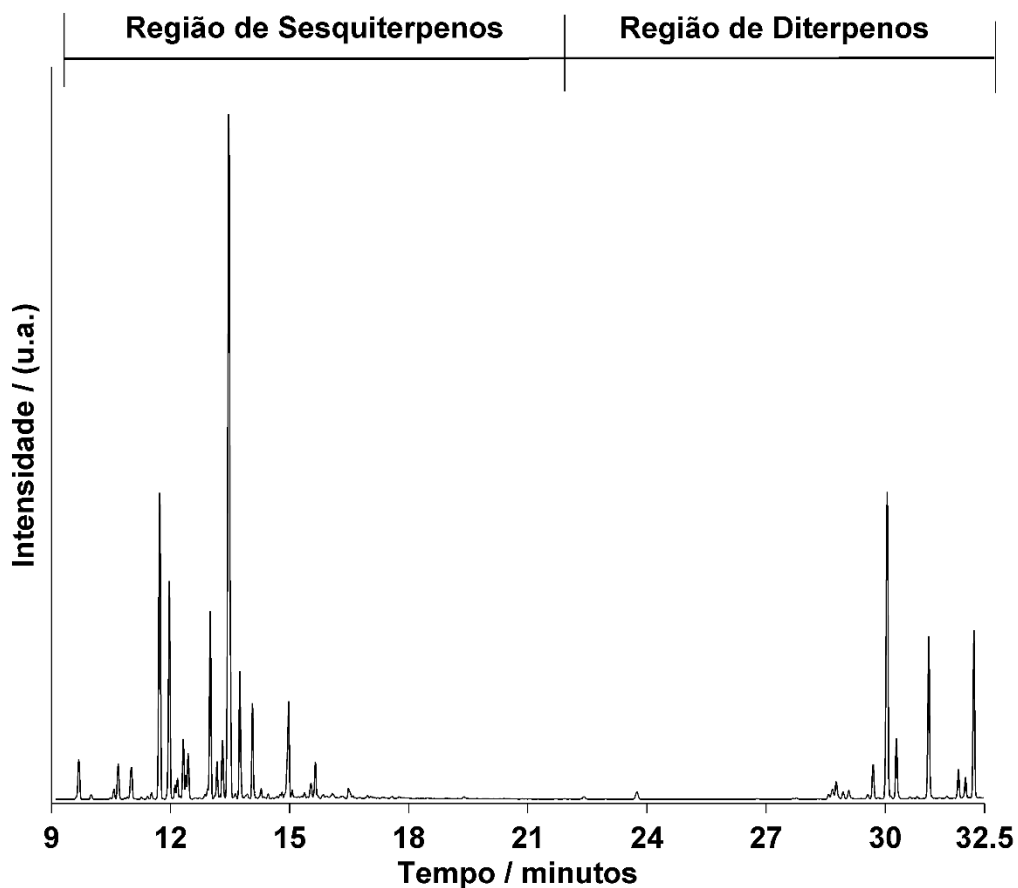


Figura 2-5 - Cromatograma de óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Figura produzida com dados desta tese).

Vários autores identificaram diversos compostos sesquiterpênicos e diterpênicos em diferentes tipos de óleo de copaíba [1, 2, 20, 25, 26], cujas estruturas dos sesquiterpenos podem ser observadas na Figura 2-6 e dos diterpenos na Figura 2-7.

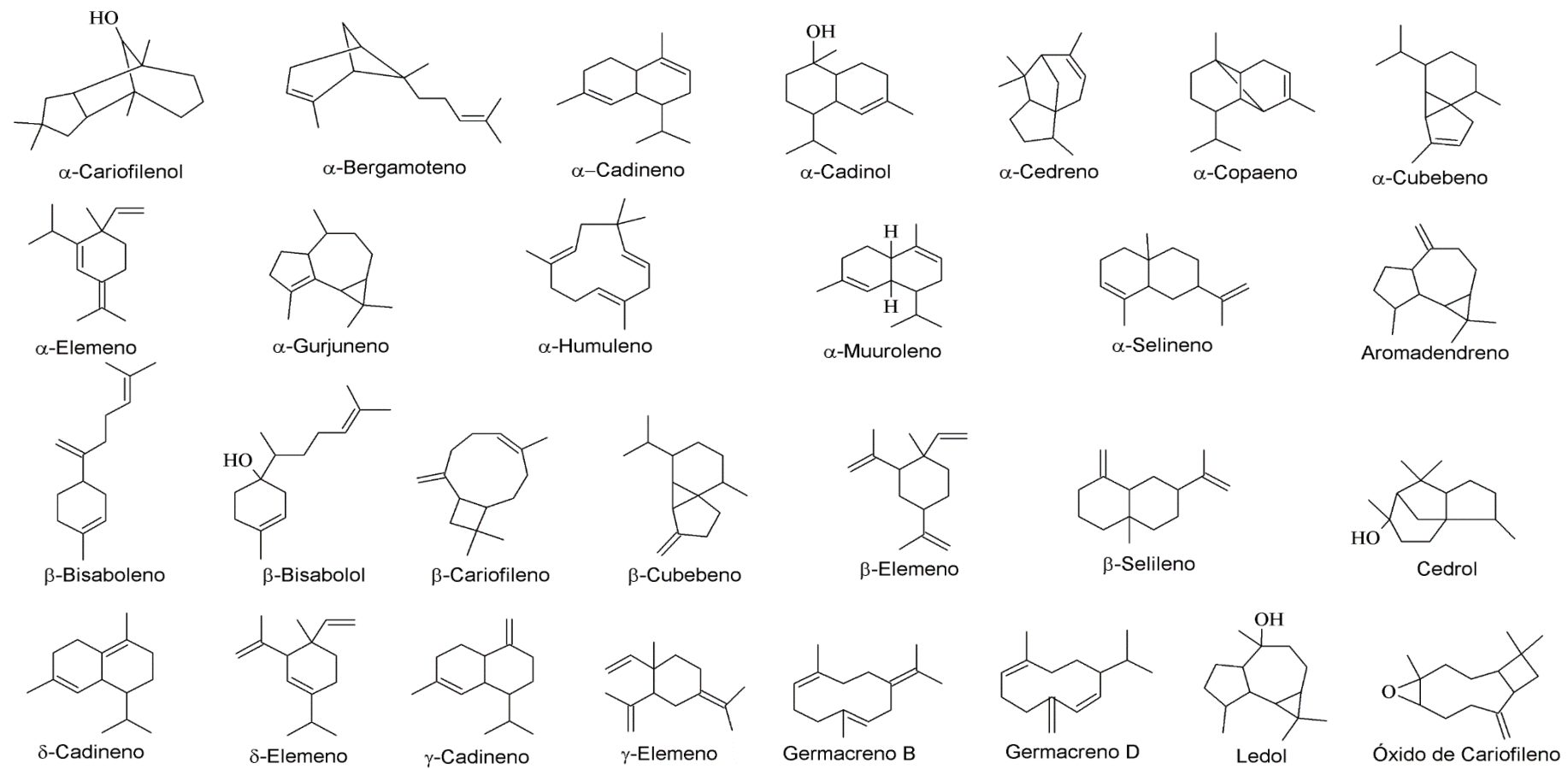


Figura 2-6 - Estruturas dos sesquiterpenos predominantes no óleo de copaíba identificados nas referências [1, 2, 20, 25, 26].

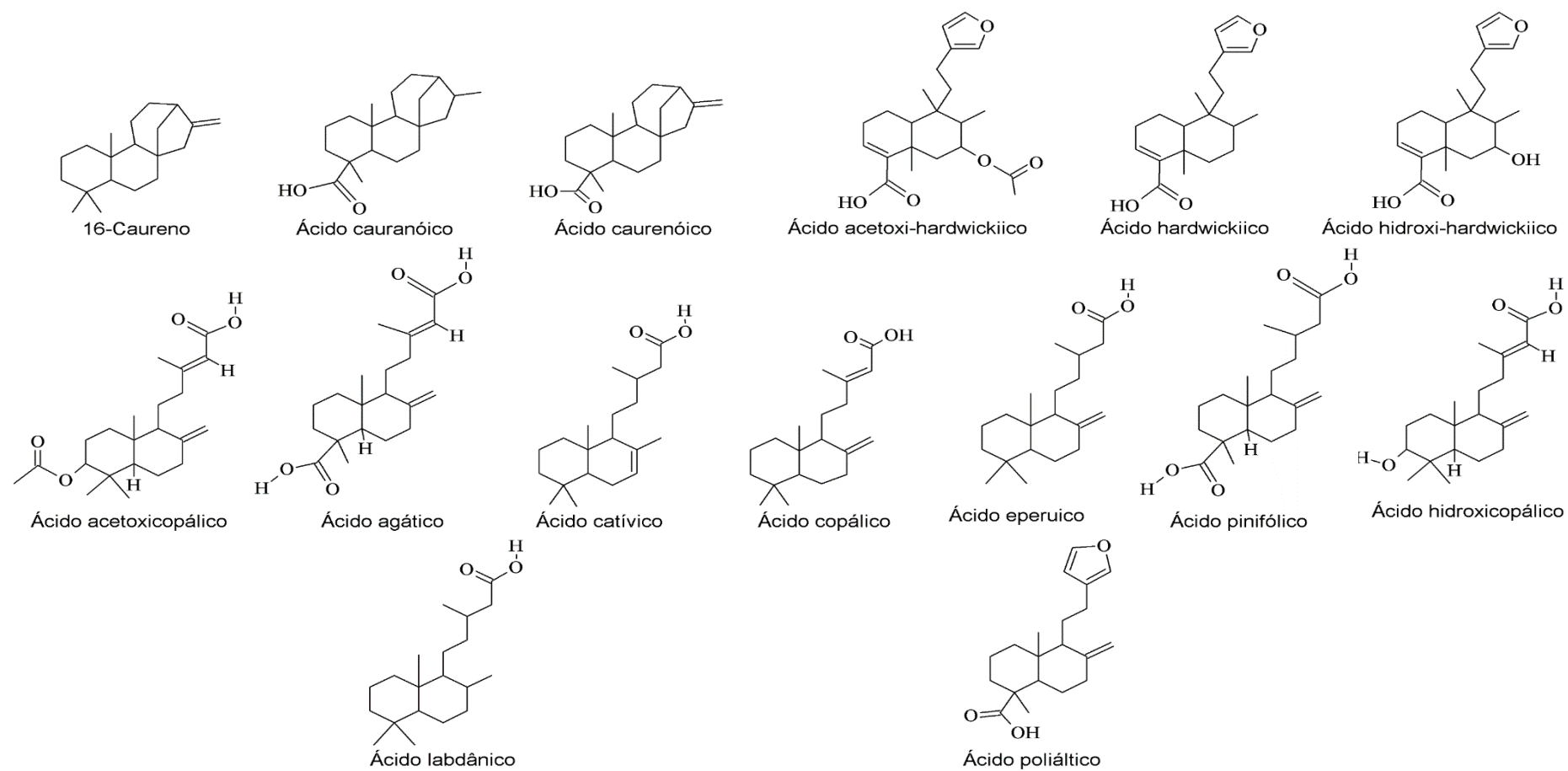


Figura 2-7 - Estruturas dos diterpenos predominantes no óleo de copaíba identificados nas referências [3, 5, 9, 25, 26].

A quantidade de sesqui e diterpenos certamente não se limitam apenas aos relacionados na Figura 2-6 e Figura 2-7, essa afirmação pode ser ratificada em outros estudos de caracterização e revisão que se dedicam à elucidação da composição dos mais diversos tipos de óleos de copaíba [1, 4, 5, 6, 9, 10, 27]. Desta forma, a quantidade de sesquiterpenos já identificados em óleos de copaíba das diversas espécies existentes, já ultrapassam as sete dezenas e os diterpenos excedem as duas dezenas, comprovando a complexidade deste produto de origem natural.

2.1.4 Utilizações do óleo de copaíba

Como já dito anteriormente, o uso do óleo de copaíba era bastante difundido pelos índios da América Latina, desde o século XVI, devido às propriedades curativas, que provavelmente é originária da observação comportamental de animais que buscavam esfregar suas feridas nos troncos das copaibeiras visando uma posterior cicatrização dessas feridas. Em razão da escassez de medicamentos utilizados na Europa, as aplicações curativas do óleo de copaíba, já utilizado pelos indígenas, levou aos médicos que vieram juntamente com os primeiros exploradores, a utilização deste óleo de modo a amenizar a carência de medicamentos [6, 10].

Veiga Jr. & Pinto (2002), em revisão de literatura identificaram sete aplicações etnofarmacológicas deste óleo para as vias urinárias, sete para as vias respiratórias, três para tratamento de pele, além de outras propriedades curativas como cicatrizante, afrodisíaco, anti-tetânico, anti-reumático, dores de cabeça, dentre outras utilizações [6].

Segundo Werf *et al.* (2000), o óleo de copaíba também é usado na composição de tintas a óleo para a pintura artística, cujo efeito de retardar a secagem da tinta, permite um período mais longo para a realização da obra, além de evitar rugas e rachaduras prematuras nos trabalhos artísticos, são conhecidos desde o início do século XIX. O pintor holandês Vincent Van Gogh utilizava o óleo de copaíba para obter tintas com tons escuros, profundos e saturados sem o inconveniente do efeito de afundamento da tinta. Utilizado também para a remoção e recuperação de

vernizes e tintas, o bálsamo de copaíba, como também é conhecido, é igualmente utilizado nos trabalhos de restauração [2].

Rodrigues *et al.* (2014), realizaram estudo de desenvolvimento de nanoemulsão larvicida baseada em óleo resina de *Copaifera duckei* com potencial inseticida para larvas de *Aedes aegypti* [28]. Bardají *et al.* (2016) além de caracterizarem o óleo-resina de *Copaifera reticulata*, verificaram a ação deste material como bactericida em patógenos bucais [29]. Borges *et al.* (2016), prepararam nano compósitos com óleo de *Copaifera langsdorffii*, objetivando o aumento do potencial anti-inflamatório do óleo de copaíba, no tratamento da endometriose, obtendo resultados que sugeriram que o nano compósito desenvolvido seria uma alternativa promissora para o tratamento dessa doença [30]. Maragon *et al.* (2017), desenvolveram estudo sobre o efeito citotóxico e da atividade antimicrobiana de emulsões formuladas com óleo de copaíba comercial, obtendo resultados promissores, indicando que formulações desse tipo de emulsão podem ser utilizadas no desenvolvimento de produtos para o controle de infecções por *Staphylococcus aureus* [31].

O uso deste recurso natural renovável, vem aumentando em razão de um maior apelo mundial inclusive no Brasil, pelo uso de fitoterápicos e outros produtos naturais, [6] o que tem aumentado a pressão na exploração. Todavia, como a produção do óleo é variável e em vista de uma maior demanda, as adulterações como a adição de outros líquidos miscíveis acabam por ocorrer, o que tem levado a diversas pesquisas no intuito de desenvolver métodos que possam detectar tais fraudes [1, 3, 5, 9, 18].

2.2 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE AUTENTICIDADE / ADULTERAÇÃO DE ÓLEO DE COPAÍBA

Considerando que existem várias espécies produtoras de óleo no gênero *Copaifera* e considerando também a variabilidade na composição desse produto, mesmo dentro de uma mesma espécie, a determinação de autenticidade e pureza

do óleo de copaíba é um desafio. Todavia, alguns autores propuseram métodos que têm a finalidade de identificar autenticidade, assim como a pureza desse produto natural de origem florestal, utilizando diversas técnicas analíticas [1, 2, 3, 4, 5, 9, 18].

2.2.1 Cromatografia Gasosa

A cromatografia é um método muito eficiente para separação de compostos e tem um amplo espectro de aplicação nas diversas áreas da ciência. Neste método, a separação dos diferentes compostos é estabelecida basicamente pela afinidade destes entre uma fase estacionária e uma fase móvel imiscíveis entre si. No caso da cromatografia gasosa, os analitos devem ser capazes de passarem para o estado gasoso sem que haja a degradação dos mesmos, nas temperaturas de trabalho das colunas utilizadas para a separação dos compostos presentes na amostra [32, 33].

A cromatografia gasosa apesar de ser uma técnica destrutiva e relativamente cara, se mostra muito eficiente para a obtenção de *fingerprints* (do inglês impressão digital) de produtos naturais, por estes tenderem a ser matrizes de alta complexidade, apresentando muitos compostos cuja variabilidade está diretamente relacionada com fatores como a localização geográfica, clima, luminosidade, época do ano da colheita, dentre outras variáveis, permitindo que cada produto tenha uma identidade única.

Veiga Jr. *et al.*(1997) utilizaram dois cromatógrafos gasosos de alta resolução, um acoplado a um detector de ionização de chama (CG-DIC) e outro a um espectrômetro de massas (CG-EM), para analisar 8 amostras autênticas coletadas diretamente dos troncos de diferentes copaibeiras (2 *Copaifera multijuga*, 2 *Copaifera langsdorffii* e 4 *Copaifera sp*) e 16 óleos comerciais de copaíba adquiridos no comércio de diferentes estados (3 no Pará, 4 no Amazonas, 6 no Rio de Janeiro, 1 em São Paulo, 1 em Minas Gerais e 1 no Paraná). Todas as amostras foram esterificadas com diazometano para possibilitar a detecção de ácidos carboxílicos na forma de ésteres metílicos. Para todas amostras autênticas foram evidenciadas a existência de duas regiões de eluição bem específicas, uma com menor tempo de retenção para os compostos sesquiterpênicos, que se apresentou com grande

congestionamento e sobreposição de picos, e outra com maior tempo de retenção para os diterpênicos, onde predominavam os ácidos copálico, hardwickiico e caurenóico. Na comparação entre os perfis cromatográficos das amostras autênticas e as comerciais foram observados indícios de adulteração grosseira, onde uma das evidências foi o não aparecimento claro das regiões sesquiterpênicas e diterpênicas, assim como a detecção dos fragmentos de massa m/z 74 e m/z 87, indicando a existência de ácidos graxos metilados. O número de diterpenos detectados nos óleos autênticos e comerciais, levou os autores a sugerirem que amostras autênticas de uma mesma espécie devem ter entre 3 e 9 diterpenos, enquanto que a presença de mais de 9 diterpenos em amostras comerciais indicam a mistura de diversos óleos de copaíba autênticos [1].

Werf *et al.*(2000) realizaram a caracterização de 28 amostras de óleos de copaíba, que foram divididos em dois grupos, o primeiro composto de 13 amostras comerciais relativamente recentes, sendo adquiridas em farmácias e fornecedores de suprimentos para pinturas artísticas, o segundo grupo foi composto de amostras históricas, disponibilizadas por museus e arquivos, cuja idade aproximada destas amostras, na época da pesquisa, era de cem anos. O estudo teve como objetivo principal verificar possíveis adulterações nas amostras, assim como distinguir amostras oriundas da espécie *Copaifera langsdorffii*, de amostras provenientes da espécie *Copaifera multijuga*. As amostras foram derivatizadas com Hidróxido de Tetrametilamônio (TMAH – do inglês, *Tetramethylammonium hydroxide*) e analisadas em cromatógrafo gasoso acoplado a detector de espectrometria de massas (CG-EM), onde identificaram dentre as 13 amostras comerciais, 1 amostra pura e 8 amostras com teor de pureza abaixo de 25%. Nas amostras históricas foram encontradas 2 amostras puras e 6 com grau de pureza abaixo de 25%. No que se referiu à identificação das prováveis espécies de origem dos óleos, os autores utilizaram marcadores diterpênicos específicos das espécies em questão, para a espécie *C. multijuga* ácidos diterpênicos bicíclicos dos tipos labdanos e clerodanos, todavia os óleos da *C. langsdorffii*, apresentaram também ácidos tetracíclicos do tipo caurano. Desta forma, eles puderam concluir que das amostras comerciais, 10 eram

oriundos da *C. multijuga*, 2 da *C. langsdorffii* e 1 de *Pinus*. Quanto às 15 amostras históricas, 12 eram oriundas da *C. langsdorffii* e 3 da *C. multijuga* [2].

Tappin *et al.*(2004) propuseram um método de quantificação de sesquiterpenos e diterpenos com o uso da cromatografia gasosa de alta resolução com detecção por ionização de chama (CG-DIC). Diante da complexidade da matriz a ser analisada, os autores optaram pela utilização do trans-(-)-cariofileno como padrão para a quantificação dos sesquiterpenos, e um padrão de ácido copálico para a quantificação dos diterpenos. Apenas o trans-(-)-cariofileno foi adquirido comercialmente, o ácido copálico foi isolado de uma amostra independente de óleo de copaíba. Seis amostras de óleos de copaíba comerciais foram esterificadas com diazometano para o desenvolvimento do método. Os pesquisadores lograram êxito na quantificação de aproximadamente 50% dos compostos majoritários presentes nas amostras analisadas, identificando similaridades e diferenças quantitativas nas substâncias presentes, entretanto, sem identificar aquelas presentes nas amostras que eram diferentes dos padrões utilizados. Concluíram que a padronização externa é o método mais adequado para quantificação dos dois grupos de terpenos presentes, contribuindo para o controle de qualidade dessa matéria prima, no que se refere às proporções de sesqui e diterpenos [4].

Veiga Jr. e Pinto (2005) sugeriram o monitoramento seletivo de íons como ferramenta para detecção de adulterações de óleos de copaíba. A metodologia proposta na verdade é muito semelhante à proposta por Veiga Jr. et al.(1997) [1], que também utilizaram cromatografia de alta resolução acoplada a espectrômetro de massas, o que diferencia esta metodologia da primeira, é o aprofundamento no que se refere aos tipos de ácidos graxos presentes por adulteração, além da identificação de fragmentos de específicos que indicam adulterações com óleos minerais [5].

Biavatti *et al.*(2006) propuseram um método como contribuição para o controle de qualidade de óleo de copaíba, que consistiu em análise por cromatografia gasosa equipado com detector de ionização de chama (CG-DIC), de 3 amostras autênticas, retiradas diretamente do tronco de copaibeiras e 12 amostras comerciais. A

preparação das amostras para os ensaios foi realizada de três maneiras distintas [34]:

- Fracionamento do óleo de copaíba em coluna cromatográfica impregnada com KOH, visando o isolamento da fração mais polar do óleo;
- Metilação das amostras brutas com diazometano;
- Transesterificação com KOH e Metanol, através do método sugerido por Hartman e Lago (1973).

No que se refere à preparação das amostras, os autores concluíram que a esterificação com diazometano se mostrou eficiente na metilação dos ácidos diterpênicos, enquanto que as demais estratégias foram consideradas de baixa eficiência. Foram utilizados como possíveis biomarcadores, os padrões de cariofilenol e os ácidos copaiferólico, hardwickiico e caurenóico, sendo que apenas o ac. copaiferólico foi detectado em todas amostras, o que levou os pesquisadores a sugerirem este composto como um marcador quimiotaxonômico exclusivo dos óleos de espécies do gênero *Copaifera* [9].

Steinberger e Herm (2011) analisaram diversas resinas, juntamente com 2 amostras de óleo de copaíba de uma coleção farmacêutica de século XVIII, pertencente ao Queens College em Cambridge (Reino Unido), utilizando o CG-EM e derivatização das amostras com Hidróxido de Trimetilsulfônio (TMSH – do inglês, Trimethylsulfonium hidroxide). Os resultados foram comparados com dados da literatura e apenas uma das amostras continha marcadores diterpênicos condizentes com os existentes nas espécies do gênero *Copaifera*, todavia, a outra amostra não apresentou compostos que indicassem que a mesma fosse oriunda do gênero *Copaifera* [35].

2.2.2 Titulometria

A grande vantagem de métodos titulométricos, é a relativa rapidez dos ensaios, assim como o baixo custo de equipamentos e insumos, aliados à fácil interpretação dos resultados.

Vasconcelos & Godinho (2002) utilizaram a técnica de titulação para determinar os índices de acidez (IA¹) e de éster (IE²) para a verificação de autenticidade do óleo de copaíba. Foi utilizada uma amostra autêntica de *Copaifera langsdorffii* e oito amostras comerciais de óleo de copaíba. Com a amostra autêntica, foram preparadas adulterações com óleo de soja e com álcool etílico, onde os percentuais de adulterantes variaram de 0,0 % a 100 %. No método proposto os valores de IA maiores que 80 indicavam que amostra seria autêntica. Quanto ao uso conjunto dos valores de IA e IE, os autores, sugerem que se $IA > 80$ e $IE > 23$, indica adulteração com óleo graxo. No caso de $IA < 80$ e $IE < 23$ indica que adulteração com material não saponificável como óleo mineral ou álcool etílico [3]. No entanto, deve-se considerar a grande variabilidade de composição do óleo de copaíba, desta forma, a utilização de apenas uma amostra de óleo de copaíba comprovadamente autêntico, não é conclusivo para considerar este método como definitivo, como os próprios autores declaram ao final do artigo.

2.2.3 Outras estratégias utilizadas

Barbosa et al. (2009) propuseram uma metodologia de detecção de adulteração de óleo de *Copaifera multijuga* Hayne por índice de refração e cromatografia de camada delgada-CCD. Foram utilizadas 8 amostras autênticas e 12 amostras comerciais de óleo de copaíba. As amostras autênticas apresentaram índice de refração no intervalo de 1,502 e 1,508 a 20°C, enquanto as amostras

¹ O índice de acidez é medido em miligramas (mg) de Hidróxido de Potássio (KOH) necessários para neutralizar um grama do óleo analisado.

² O índice de éster é expresso em mg de KOH necessários para saponificar um grama de triacilglicerídeo.

comerciais apresentaram valores entre 1,482 e 1,509 para a mesma temperatura. Dentre as 12 amostras comerciais, 3 apresentaram índice de refração e perfil cromatográfico em CCD semelhantes as amostras autênticas, 6 (seis) amostras comerciais apresentaram resultados próximos ao do óleo de soja (1,475) e 5 (cinco) amostras apresentaram perfis cromatográficos em CCD com indícios de adulteração com óleo de soja. Os autores avaliaram que o uso do índice de refração aliado à cromatografia de camada delgada, é barata rápida e eficiente para o controle de qualidade do óleo de copaíba [18]. No entanto, neste método os autores identificaram que nas amostras de óleo de copaíba com adulterações de até 33 % (v/v) de óleo de soja, os índices de refração são similares aos dos óleos de copaíba puros, o que indica a ineficiência do método na identificação de amostras com baixos teores de adulterantes.

É importante destacar que entre os métodos propostos na literatura, nenhum até o momento descreve a aplicação do infravermelho para o controle de qualidade de óleo-resina de copaíba, apesar dessa técnica já ter se mostrado um grande potencial com outros tipos de óleo como por exemplo o óleo de palma [36], o azeite de oliva [37], o biodiesel [38], o óleo de soja [39], óleos essenciais [40]. Cabe ainda mencionar que o advento de equipamentos baseados em infravermelho próximo portáteis podem tornar a aplicação dessa técnica mais simples, barata e com possibilidade de uso em campo por agências de fiscalização.

CAPÍTULO 3
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O grande desenvolvimento dos instrumentos de análise química, ocorridos nas últimas décadas do século XX possibilitou que uma grande quantidade de dados pudesse ser produzida na realização de um experimento ou análise química. Contudo, essa maior disponibilidade de informação também gerou a necessidade de métodos matemáticos e estatísticos que permitissem obter informações de uma forma efetiva dessa enorme quantidade de dados gerados [41, 42, 43].

Em 1972, o termo “*Kimimetri*” (Quimiometria) foi introduzido pelo químico Svante Wold, tendo ele sido o autor de um trabalho publicado na Suécia pela revista *Kemisk Tidskrift*. Em 1975, Kowalski introduziu o termo quimiometria na língua inglesa, referindo-se à mesma como um conjunto adequado de procedimentos aplicados a um grupo de dados, visando obter informações expressivas do ponto de vista químico. Svante Wold juntamente com o grupo de pesquisa do Prof. Bruce Kowalski, vieram a fundar a *International Chemometric Society*, no intuito de fortalecer a interação entre as áreas de química, matemática e estatística [41].

Ainda na década de 1970, para difundir a utilização de alguns métodos quimiométricos de reconhecimento de padrões e planejamento de experimentos o grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Bruce Kowalski lançou o Software quimiométrico ARTHUR. Em 1980 Kowalski foi convidado a ministrar cursos sobre quimiometria no Instituto de Química da Unicamp e deixa uma cópia do software ARTHUR, o que iniciou a Quimiometria no Brasil [41, 43].

De uma forma geral, a quimiometria é uma área interdisciplinar da química, onde a interação entre os métodos estatísticos e matemáticos, aliado à lógica em química, é aplicada a dados multivariados para se selecionar condições experimentais ótimas, assim como obter o máximo de informações químicas relevantes [41, 44].

Dentro da quimiometria destacam-se: (1) o planejamento de experimentos, que visa identificar os efeitos das variáveis, assim como suas interações, na otimização de processos e medidas experimentais de forma geral [45, 46, 47], sendo

amplamente utilizado por diversas indústrias e na otimização de seus experimentos [43]; (2) a análise exploratória e classificação supervisionada, que busca o reconhecimento de padrões no intuito de identificar tendências de agrupamento que possuem semelhança e realizar a classificação de amostras em grupos predefinidos a partir dos dados multivariados coletados [41, 45, 48]; (3) e a calibração multivariada que relaciona os dados com uma determinada propriedade que se quer quantificar (concentração, umidade, etc.) [41, 45, 49].

3.1 Organização dos dados

Nesta tese serão abordadas a organização dos dados voltados para a análise exploratória e classificação supervisionada, assim como para a calibração multivariada de 1ª ordem.

Diferentemente da análise univariada que tem como resposta apenas um valor ou escalar (concentração, pH, temperatura, absorvância em um comprimento de onda, etc.), na análise multivariada as respostas são múltiplas, que podem ser obtidas em uma única leitura ou análise, como acontece na espectroscopia de infravermelho por exemplo, ou por meio da junção dos resultados de várias análises distintas, como pH, temperatura, índice de refração, índice de acidez, etc. Em consequência disto, cada amostra deve ser organizada como um vetor linha, onde em cada coluna desse vetor estão dispostas as respostas obtidas para aquela amostra específica. Para a construção de um modelo multivariado, além das respostas múltiplas para uma unidade experimental, tem-se também múltiplas amostras, que são organizadas em uma matriz, onde as linhas dessa matriz serão os vetores das amostras.

3.1.1 Matrizes, vetores e escalares: Definições e notações

Matrizes são estruturas bidimensionais ou tabelas dispostas em linhas e colunas, cujos elementos que as compõem podem ser números reais ou complexos, funções ou outras matrizes. Seguindo a notação padrão de álgebra linear, a representação de uma matriz é sempre por uma letra maiúscula em negrito (ex.: **X**). Vetores são arranjos unidimensionais com apenas uma linha ou uma coluna e são

chamados de vetor linha e vetor coluna, respectivamente, sendo representados por letras minúsculas em negrito (ex.: \mathbf{x}). Escalares são números cuja representação é dada por uma letra em itálico minúscula sem negrito (ex: x). Matrizes transpostas são obtidas intercambiando linhas e colunas da matriz original, onde a transposta de uma matriz \mathbf{X} será representada por \mathbf{X}^T .

3.2 Pré-processamento de dados

Após os dados serem organizados na matriz de dados, muitas vezes eles necessitam passar por um pré-processamento para corrigir eventuais efeitos indesejáveis presentes nos dados, tais como ruído e variação da linha de base em espectros. Esses pré-processamentos podem ser: alinhamento de tempo de retenção em cromatogramas, normalizações, alisamentos, correção da linha de base, centragem na média, correções de espalhamento de sinal, dentre outros. Os pré-processamentos que serão abordados nesta tese tiveram um uso direto nas três aplicações apresentadas nos capítulos 4, 5 e 6.

3.2.1 Alinhamento de tempo de retenção em cromatogramas

Quando se fazem múltiplas corridas cromatográficas como em um cromatógrafo gasoso, por exemplo, muitos fatores podem influenciar os tempos de retenção dos compostos presentes na amostra analisada, conforme pode ser visualizado na Figura 3-1. O envelhecimento da coluna, diferenças nas técnicas de extração e preparo da amostra, flutuações nas temperatura do fornos, são alguns desses fatores [41, 50]. Quando esses cromatogramas serão utilizados como fonte de dados para comparação direta entre as amostras, as diferenças apresentadas entre os tempos de retenção causam um sério problema, pois a mesma informação química estará presente em uma variável/coluna da matriz diferente. [41]

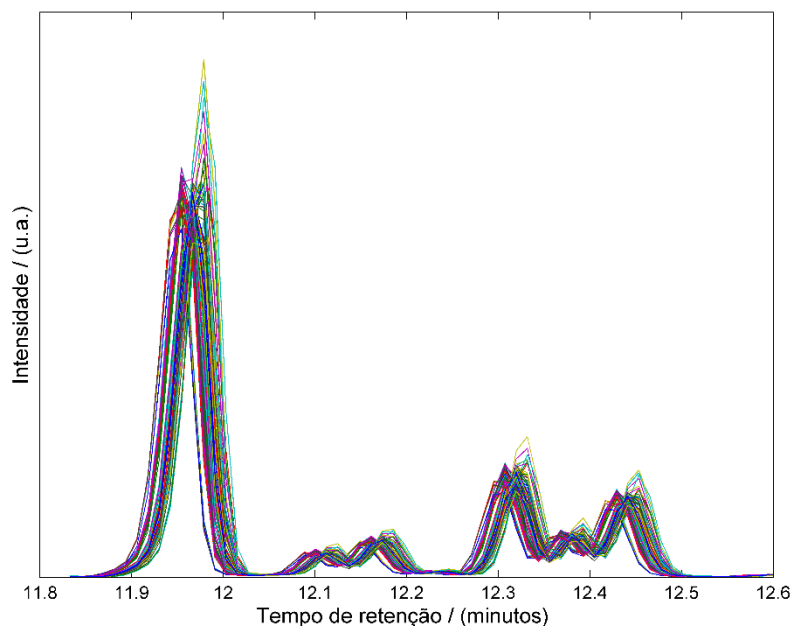


Figura 3-1 - Fragmento de um grupo de 120 cromatogramas de óleo de copaíba desalinhados (Dados reais, referentes a ensaios realizados no capítulo 5 desta tese).

O alinhamento dos tempos de retenção é realizado através de algoritmos específicos, como COW (do inglês, *Correlation Optimized Warping*) [51], o DTW (do inglês, *Dynamic Time Warping*) [52], e o Icoshift (do inglês, *Interval Correlation Optimised Shifting*) [53]. Após a aplicação do icoshift nos cromatogramas representados na Figura 3-1 tem-se picos com uma correspondência muito melhor dos tempos de retenção (Figura 3-2).

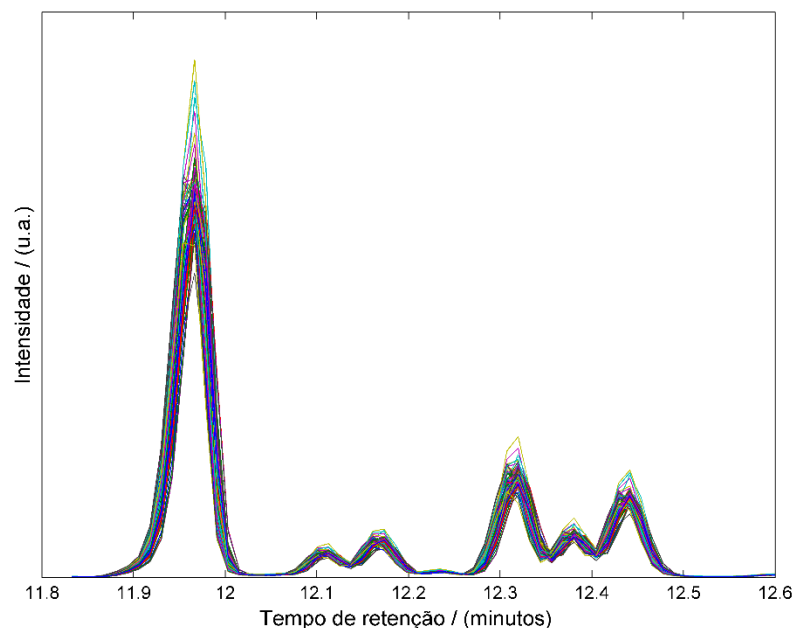


Figura 3-2 - Fragmento de um grupo de 120 cromatogramas de óleo de copaíba alinhados após tratamento dos dados pelo algoritmo Icoshift (Dados reais, referentes a ensaios realizados no capítulo 5 desta tese).

3.2.2 Normalização

Nos métodos instrumentais as respostas analíticas estão sujeitas a variações aditivas e multiplicativas, aumentando ou diminuindo o sinal medido para algumas ou todas as amostras. Variações nas intensidades das fontes de radiação, resposta de detectores ou pequenas mudanças nas condições experimentais são exemplos de problemas que podem causar esse tipo de variação indesejada. Muitas vezes esses efeitos podem ser minimizados aplicando algum pré-processamento de normalização. A normalização garante que as amostras tenham um impacto igualitário no modelo multivariado desenvolvido [54, 55].

- Nas normalizações mais comuns cada variável da amostra é dividida pelo fator de normalização escolhido. A fórmula geral para a normalização é:

$$x_{ij(\text{normalizado})} = \frac{x_{ij}}{w_i} \quad \text{Equação 3-1}$$

onde x_{ij} é a j-ésima variável da i-ésima amostra, e w_i é o fator de normalização da i-ésima amostra.

- A correção multiplicativa de espalhamento (**MSC**, do inglês, *Multiplicative Scatter Correction*), é um tipo de normalização utilizada em espectroscopia e visa minimizar os efeitos de espalhamento de luz ou outro fenômeno físico que interfira no sinal instrumental, corrigindo os efeitos aditivos e multiplicativos. A correção é realizada através de uma regressão linear para cada espectro em relação ao espectro médio do conjunto de amostras, estimando-se desta forma os coeficientes linear e angular representados por \hat{a} e \hat{b} , respectivamente. Desta forma cada espectro pode ser corrigido subtraindo-se do sinal original o coeficiente linear e então dividindo-se o resultado pelo coeficiente angular, como representado pela Equação 3-2 [41, 56, 57, 58].

$$\mathbf{x}_{i(\text{MSC})} = \frac{\mathbf{x}_i - \hat{a}}{\hat{b}} \quad \text{Equação 3-2}$$

onde $\mathbf{x}_{i(\text{MSC})}$ é o espectro da i-ésima amostra com o sinal corrigido, \mathbf{x}_i é o espectro original da i-ésima amostra e \hat{a} e \hat{b} são respectivamente as estimativas para os coeficientes linear e angular.

- O SNV (do inglês, Standard Normal Variate), ou padronização normal do sinal, é também outro tipo de normalização muito popular nas aplicações espectroscópicas, e assim como o MSC corrige os efeitos aditivos e multiplicativos, tendo uma forma de cálculo para a correção de sinal semelhante ao MSC, no entanto na correção o sinal cada espectro original é subtraído da média das intensidades deste espectro e dividido pelo desvio padrão das intensidades deste espectro, conforme a Equação 3-3 [41].

$$\mathbf{x}_{i(\text{SNV})} = \frac{\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}}_i}{s_i} \quad \text{Equação 3-3}$$

onde $x_{i(SNV)}$ é o espectro da i-ésima amostra com o sinal corrigido, \bar{x}_i é a média das intensidades no espectro original da i-ésima amostra e s_i é o desvio padrão das intensidades no espectro original na i-ésima amostra.

3.2.3 Derivadas

A aplicação das derivadas podem ressaltar pequenas diferenças em espectros assim como em cromatogramas, além de atenuar as flutuações da linha de base. Todavia na aplicação das derivadas sinais pouco intensos, inclusive os ruídos, são amplificados. Para melhorar a relação sinal/ruído (S/R) um algoritmo de alisamento pode ser utilizado. Desta forma, a metodologia mais utilizada é a derivação utilizando o algoritmo de Savitzky-Golay, que aplica um filtro que pode ser ajustado para o alisamento do sinal conforme o tamanho da janela escolhida deste filtro. Janelas menores influem menos no sinal original, mas também tem pouco efeito na redução dos ruídos. Por outro lado, janelas muito grandes podem eliminar os ruídos, mas podem descaracterizar o espectro ou cromatograma, suprimindo informações analíticas relevantes. Portanto, a melhor largura da janela deve ser selecionado pelo usuário.

3.2.4 Centragem na média

A centragem na média é um pré-processamento aplicado a cada variável da matriz. A média de cada variável no conjunto de amostras é calculada e em seguida este valor é subtraído da respectiva variável de cada amostra, conforme a Equação 3-4.

$$x_{ij(cm)} = x_{ij} - \bar{x}_j \quad \text{Equação 3-4}$$

onde $x_{ij(cm)}$ representa o valor de intensidade da j-ésima variável da i-ésima amostra centrada na média, x_{ij} o valor de intensidade original da j-ésima variável da i-ésima amostra e \bar{x}_j é a média das intensidades da j-ésima variável do conjunto de amostras considerado.

Nesta transformação a informação e estrutura dos dados originais são preservados, deslocando apenas a origem do sistema de coordenadas para a média/centro dos dados [41, 58].

3.2.5 Autoescalamento

Para realizar este pré-processamento os dados devem ser inicialmente centrados na média e em seguida cada variável é dividida pelo seu respectivo desvio padrão, tornando as novas variáveis das amostras adimensionais. Este tipo de pré-processamento é indicado quando as variáveis estão em escalas/unidades diferentes ou a variação entre as variáveis são muito diferentes. Esta transformação de dados diminui a influência de variáveis dominantes no modelo desenvolvido. O autoescalamento pode ser expresso pela Equação 3-5 [41, 59].

$$x_{ij(ae)} = \frac{x_{ij} - \bar{x}}{s_j} \quad \text{Equação 3-5}$$

onde $x_{ij(ae)}$ é o valor de intensidade da j -ésima variável da i -ésima amostra após o autoescalamento, x_{ij} é o valor de intensidade original da j -ésima variável da i -ésima amostra, \bar{x} e s_j são a média e o desvio padrão da j -ésima variável do conjunto de amostras respectivamente.

3.3 Análise de componentes principais – PCA

Introduzido por Karl Pearson em 1901 e formalizado por Hotelling em 1933, a Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) tem por objetivo substituir uma grande quantidade de variáveis correlacionadas por um número menor de variáveis não correlacionadas, realizando a compressão dos dados multivariados para um espaço de menor dimensão, sem que haja perda nas informações presentes no conjunto de dados analisado [41, 46]. Considerado um método de grande importância na Quimiometria e na análise multivariada em diferentes áreas, a PCA, além da redução nas dimensões do grupo de dados analisados, é também utilizada no reconhecimento de tendências nos dados que

corroboram para o agrupamento de amostras semelhantes, permitindo também a identificação de amostras atípicas ou anômalas (“*outliers*”)[54].

A compressão de dados é realizada efetuando-se combinações lineares entre as variáveis dos dados originais, realizando aglomeração daqueles que possuem informações correlacionadas, reorganizando os dados em um novo sistema de eixos, chamado de componentes principais (PC, do inglês *Principal Component*). Esse novo sistema de coordenadas torna mais fácil a interpretação dos dados e evidencia agrupamentos de amostras com características semelhantes, sendo também possível detectar amostras com comportamentos distintos. As PC's devem ser ortogonais, garantindo que a informação contida em uma delas não esteja presente na PC subsequente. [41, 54]

A primeira PC, ou PC1, está direcionada ao longo do sentido de maior variância dos dados. Da mesma forma, a PC2 está direcionada ao longo do segundo sentido de maior variância e é ortogonal à PC1 e essa regra segue para se obter as demais PC's [41]. Apenas para um exemplo ilustrativo, considerando que um conjunto de 10 amostras contendo 15 variáveis cada sejam submetidas a uma PCA resultando em uma distribuição tridimensional desses dados em formato de um cilindro elíptico (Figura 3-3), a primeira PC estaria direcionada para o sentido do comprimento do cilindro, explicando a maior parte da variabilidade. Na sequência, as PC2 e PC3 seriam perpendiculares em relação a PC1 e entre si e direcionadas para os sentidos da base do cilindro. Dessa forma, utilizando apenas três PCs a maior parte da variabilidade dos dados que possuem nas 15 variáveis seria explicada, tendo uma compressão de 15 variáveis para 3 e preservando as informações, cumprindo o objetivo de uma PCA.

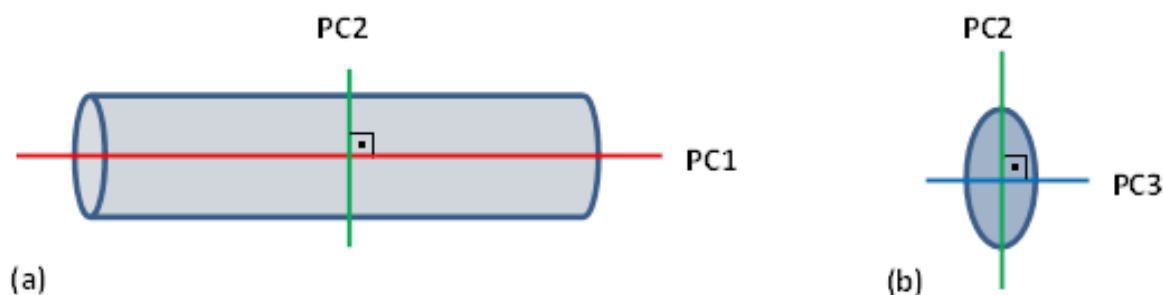


Figura 3-3 - Exemplo didático com uma distribuição em três dimensões das variâncias. (a) PC1 X PC2 e (b) PC2 x PC3 (adaptação: Ferreira (2015)) [41].

Matematicamente a PCA, é a decomposição da matriz de dados originais (\mathbf{X}), onde as amostras são dispostas nas linhas e as variáveis nas colunas (Figura 3-4), resultando no produto das matrizes de escores (\mathbf{T}) e a transposta da matriz de pesos (\mathbf{P}^T), e a soma de uma matriz de resíduos Equação 3-6 [54, 60].

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E}$$

Equação 3-6

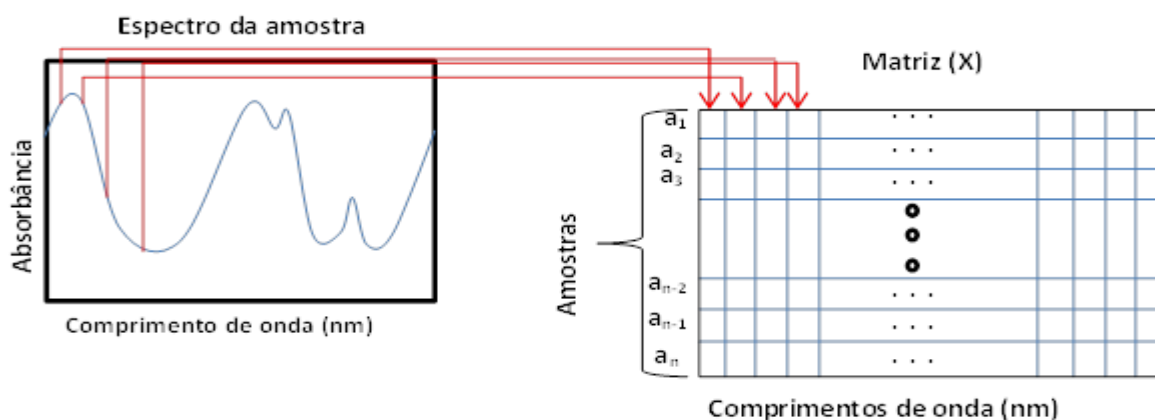


Figura 3-4 - Montagem da Matriz (\mathbf{X}) com dados de espectros.

Os escores representam as projeções das amostras nos eixos das componentes principais, contendo as relações entre as amostras analisadas. Portanto, dependendo do caso, os escores podem revelar a formação de grupos entre as amostras. Enquanto os pesos, nos permitem identificar quais as variáveis influenciam nas formações dos grupos observados no gráfico de escores [54].

As amostras anômalas, cujo termo em inglês é *outliers*, são observações de amostras que possuem um comportamento anormal, diferindo das demais amostras observadas em um determinado conjunto de dados [60, 61, 62]. Nesta tese, a detecção de amostras anômalas ou *outliers* foi realizada utilizando os parâmetros T^2 Hotelling e resíduos Q, a um determinado nível de confiança.

O T^2 de Hotelling é a distância que uma determinada amostra está da média do conjunto de amostras dentro do espaço definido pelas componentes principais do modelo PCA, sendo definido pela Equação 3-7 [55, 63, 64, 65].

$$T_i^2 = \mathbf{t}_i \boldsymbol{\lambda}^{-1} \mathbf{t}_i^T = \mathbf{x}_i \mathbf{P} \boldsymbol{\lambda}^{-1} \mathbf{P}^T \mathbf{x}_i^T \quad \text{Equação 3-7}$$

onde:

- \mathbf{t}_i é a i -ésima linha da matriz \mathbf{T} do modelo PCA;
- $\boldsymbol{\lambda}$ é a matriz diagonal dos autovalores associados aos autovetores incluídos no modelo PCA;
- \mathbf{x}_i é a i -ésima linha da matriz de dados (\mathbf{X});
- \mathbf{P} é a matriz de pesos retidos no modelo PCA.

O valor limite de T^2 que é calculado pela distribuição F conforme a Equação 3-8.

$$T_{k,m,\alpha}^2 = \frac{k(m-1)}{m-k} F_{k,m-k,\alpha} \quad \text{Equação 3-8}$$

Onde:

- k é o número de componentes principais;
- m é o número de amostras utilizadas para o desenvolvimento do modelo;
- α é o limite de confiança.

Os resíduos Q correspondem à soma dos quadrados dos erros associados ao modelo PCA, que representam a falta de ajuste do modelo PCA, sendo definidos pela Equação 3-9 [55, 64, 65, 66].

$$Q_i = \mathbf{e}_i \mathbf{e}_i^T = \mathbf{x}_i (\mathbf{I} - \mathbf{P}_k \mathbf{P}_k^T) \mathbf{x}_i^T \quad \text{Equação 3-9}$$

Onde:

- \mathbf{e}_i é a i -ésima linha da matriz (\mathbf{E});
- \mathbf{I} é a matriz identidade;

O Q é um escalar que mede a variação não modelada no modelo PCA. Estes valores devem ser pequenos quando um modelo está bem ajustado, o que pode ser avaliado por limites de confiança calculados pelas equações a seguir:

$$Q_\alpha = \Theta_1 \left[\frac{c_\alpha \sqrt{2\Theta_2 h_0^2}}{\Theta_1} + 1 + \frac{\Theta_2 h_0 (h_0 - 1)}{\Theta_1^2} \right]^{1/h_0} \quad \text{Equação 3-10}$$

$$\Theta_i = \sum_{j=k+1}^n \lambda_j^i \quad \text{para } i = 1, 2, 3 \quad \text{Equação 3-11}$$

$$h_0 = \frac{2\Theta_1 \Theta_3}{3\Theta_2^2} \quad \text{Equação 3-12}$$

Onde:

- c_α na Equação 3-10 é o desvio padrão normal correspondente à percentagem superior $(1-\alpha)$;
- k na Equação 3-11 é o número de componentes principais retidas no modelo;
- n é o número total de componentes principais;
- λ_j é o autovalor associado à j -ésima componente principal.

Quando os valores de T^2 e Q de uma amostra estão acima dos seus respectivos valores limites calculados, esta amostra é considerada um *outlier*.

3.4 Calibração multivariada

Quando submetemos uma amostra para análise em um instrumento com o objetivo de realizar uma análise quantitativa, é necessário estabelecer uma relação matemática entre as respostas obtidas e a(s) propriedade(s) de interesse que se deseja determinar. Desta forma, é possível realizar previsões a respeito de propriedades de interesse na amostra como: concentração, viscosidade, densidade, umidade, etc., esse procedimento é ilustrado na Figura 3-5, sendo definido como calibração. Quando mais de uma resposta instrumental para cada amostra é relacionada com uma propriedade de interesse tem-se a calibração multivariada [41, 67].

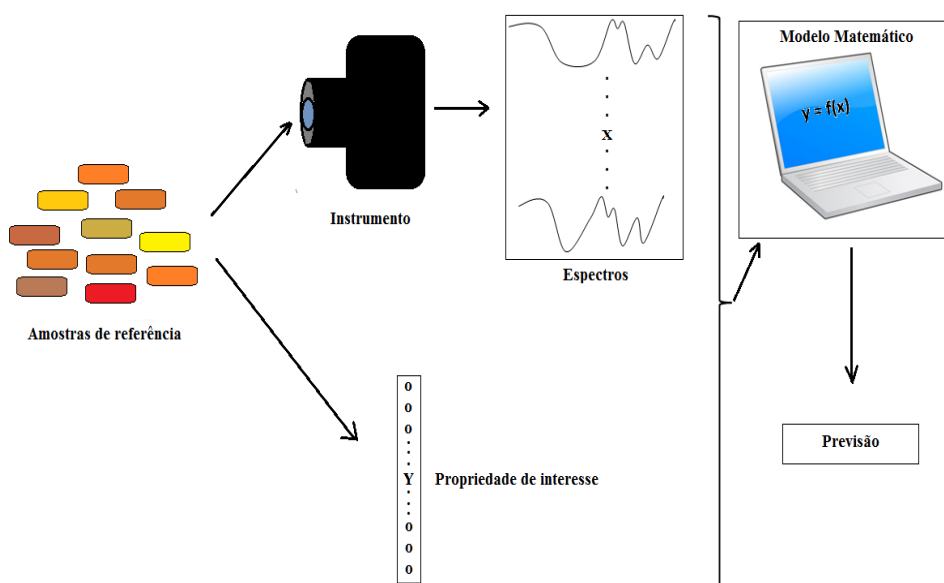


Figura 3-5 - Representação esquemática da construção de um modelo matemático de previsão de informações químicas. (adaptado de Ferreira (2015)) [41].

A matriz \mathbf{X} contém os espectros, constituindo o conjunto de dados instrumentais que é empregado para realizar a calibração, onde as variáveis fornecidas neste caso, pelos espectros, são chamadas de variáveis preditoras ou variáveis independentes. Por outro lado, o vetor \mathbf{y} contém os valores de uma propriedade de interesse, e é denominado como variável dependente. Quando \mathbf{X} e \mathbf{y} estiverem de alguma forma relacionados a uma lei físico-química, e existe uma variação, neste caso, nos espectros relacionada à propriedade de interesse, deverá

ser admissível a obtenção de uma equação matemática em que se possa determinar e/ou quantificar esta propriedade [41, 67].

É importante destacar que para o desenvolvimento de modelos matemáticos de predição robustos, é necessário reunir um grupo representativo de amostras cujas propriedades de interesse (concentração, viscosidade, densidade, umidade, etc.) sejam conhecidas. Desta forma utilizam-se métodos de regressão multivariada apropriados na construção do modelo de previsão [41].

É importante salientar que para o desenvolvimento do modelo matemático duas etapas devem ser cumpridas: a Calibração e a Validação [67].

- Calibração: é realizada com um conjunto de amostras na qual os valores da propriedade de interesse são conhecidos. O conhecimento dos valores da propriedade de interesse pode se dar pelo uso de amostras preparadas em laboratório a partir de padrões confiáveis, onde se conheça a concentração de cada um dos constituintes desta amostra e a segunda forma, onde as amostras podem ser oriundas de processos industriais ou até mesmo amostras complexas como produtos naturais, onde nestes casos, as propriedades de interesse devem ser determinadas por um método analítico de referência independente;
- Validação: é um conjunto de amostras com os valores da propriedade de interesse também conhecidas, mas que não fizeram parte da fase de calibração. Essas amostras são utilizadas para testar se o método de calibração desenvolvido atende a todos os requisitos para sua aplicação, validando assim o modelo construído.

Os métodos de calibração multivariada mais utilizados são: Regressão por Quadrados Mínimos Clássico (CLS, do inglês, *Classical Least Squares*); Regressão Linear Múltipla (MLR, do inglês, *Multiple Linear Regression*); Regressão por Componentes Principais (PCR, do inglês, *Principal Component Regression*) e a Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLSR do inglês, *Partial Least Squares Regression*) [41, 67].

No CLS, deve-se conhecer todas as substâncias, que produzem as informações multivariadas, o que não é possível em muitas situações práticas. O MLR, não apresenta esse requisito, mas tem o inconveniente de se necessitar de um número de amostras maior que o número de variáveis, em razão de problemas de colinearidade, o que pode ser resolvido com a seleção de variáveis. Todavia, o processo de seleção pode não ser possível ou conduzir a bons resultados em diversas aplicações [67].

O modelo PCR, se distingue dos anteriores por aplicar a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*), resolvendo os principais problemas encontrados na MLR. Não é necessário se conhecer todos os componentes que produzem os dados multivariados ou de um número de amostras maior que o de variáveis, uma vez que não se tem problema de colinearidade pelo fato das PCs serem ortogonais [67].

O PLSR, assim como o PCR é um método robusto e não possui problemas de colinearidade por empregar PCA. Entretanto, no algoritmo do PLSR é feita uma correlação entre a matriz de dados instrumentais (\mathbf{X}) e o vetor da propriedade de interesse (\mathbf{y}) durante a decomposição por PCA, de forma a maximizar a covariância entre \mathbf{X} e \mathbf{y} , enquanto que em PCR é maximizada apenas a variância explicada em \mathbf{X} . Essa diferença, em algumas situações, faz com que o PLSR consiga modelar/estimar melhor a propriedade de interesse, tornando este método o mais popular em calibração multivariada [41, 67, 68]. Por ter sido a base de um dos métodos propostos nessa tese a regressão por PLS será detalhada na seção seguinte.

3.4.1 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais - PLSR

Desenvolvido nos anos 70 por Herman Wold, o PLSR foi originalmente concebido para aplicações em econometria [41, 60, 69]. No intuito de substituir o CLS na análise de dados com variáveis com alta correlação, Svante Wold (filho de Herman), desenvolveu a versão do PLSR para aplicação na química [41].

Considerado um dos métodos de regressão, mais utilizados em quimiometria [41, 60, 69, 70], tendo se popularizado principalmente devido às aplicações com espectroscopia no infravermelho próximo – NIR (do inglês, *Near-Infrared spectroscopy*) [41].

No PLSR é necessário a utilização de uma matriz \mathbf{X} , que contém as variáveis independentes e o vetor \mathbf{y} que se referem às variáveis dependentes [69, 71].

Dependendo do número de propriedades de interesse que se deseja a modelar, o PLSR é citado na literatura como PLSR1 ou PLSR2. No caso do PLSR1, apenas uma propriedade de interesse é estimada, enquanto que no PLSR2, mais de uma propriedade de interesse são modeladas [41]. Nesta tese, será tratado apenas de PLSR1, que será simplesmente identificado como PLSR.

Assim como na PCA, no PLSR também é feita uma compressão dos dados e a criação de um novo sistema de coordenadas, todavia, no PLSR esses novos eixos são chamados de variáveis latentes (VL), uma vez que essas novas variáveis sofrem uma rotação, em relação às componentes principais de PCA, buscando uma melhor correlação com o eixo das variáveis dependentes [41, 60, 72], conforme ilustrado na Figura 3-6.

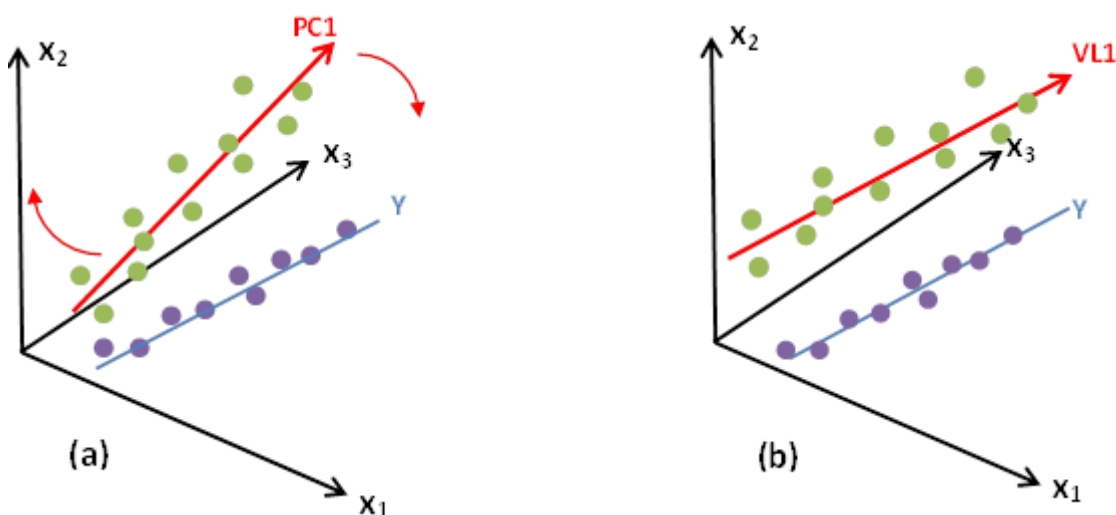


Figura 3-6 – (a) Esquema que ilustra a rotação que é realizada em uma PC para maximizar a correlação com o vetor y . (b) Representação esquemática da variável latente (VL) com sua direção otimizada.

No PLSR a matriz de dados independentes (\mathbf{X}) também é decomposta no produto das matrizes de escores (\mathbf{T}) e a transposta da matriz de pesos (\mathbf{P}^T), mais a soma da matriz de resíduos (\mathbf{E}) [54, 60, 73]. Todavia, os dados dependentes também devem ser modelados, onde \mathbf{y} é neste caso, o vetor de dados dependentes, os pesos transpostos por (\mathbf{q}^T) e os erros não modelados por (\mathbf{f}), resultando portanto na Equação 3-13 e Equação 3-14 [60, 73, 74].

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad \text{Equação 3-13}$$

$$\mathbf{y} = \mathbf{Tq}^T + \mathbf{f} \quad \text{Equação 3-14}$$

Terminada a fase de calibração, as equações citadas podem ser combinadas resultando em um vetor de coeficientes de regressão (Equação 3-15), que permite estimar a propriedade de interesse para uma amostra " \mathbf{x}_i ", conforme Equação 3-16 [60].

$$\hat{\mathbf{b}} = \mathbf{W}(\mathbf{P}^T \mathbf{W})^{-1} \mathbf{q}^T \quad \text{Equação 3-15}$$

$$\hat{y}_i = \mathbf{x}_i \hat{\mathbf{b}} \quad \text{Equação 3-16}$$

Para que o $\hat{\mathbf{b}}$ fique bem determinado e o modelo fique bem ajustado, faz-se necessário a escolha do número adequado de VL que explique a informação analítica necessária.

Além disso, no PLSR também é realizada a detecção e retirada de amostras anômalas presentes no conjunto de dados de calibração e validação utilizando os mesmos parâmetros já descritos para PCA [73].

3.4.2 Figuras de Mérito em Calibração Multivariada

Outro aspecto importante no desenvolvimento de métodos analíticos é a sua validação, que pode ser realizada através da determinação de diversas figuras de mérito, que são parâmetros estatísticos utilizados para a verificação de eficiência ou validação do método. Em calibração multivariada algumas dessas figuras de mérito tem seu cálculo realizado da mesma forma ou análoga ao que é feito em calibração univariada, como para exatidão e precisão. Por outro lado, a sensibilidade, a incerteza, limite de detecção, etc., tem cálculo distinto.

Os parâmetros utilizados na validação de um método podem variar conforme a finalidade, local ou agência de controle a que a validação estará sujeita. As mais utilizadas são a exatidão, precisão, sensibilidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, intervalos de confiança dentre outros. Em geral, os critérios para estimativa e aceitação dos resultados das figuras de mérito são estabelecidas por órgãos de fiscalização e estão descritas em normas específicas. Aqui serão abordadas as figuras de mérito utilizadas nesta tese.

- **RMSEC - Raiz quadrada do erro médio quadrado da calibração**

Expressa a concordância entre os valores estimados e os de referência. Este parâmetro é estimado utilizando todas as amostras do conjunto de calibração.

$$\text{RMSEC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{i,\text{cal}} - \hat{y}_{i,\text{cal}})^2}{n_c - \text{VL} - 1}} \quad \text{Equação 3-17}$$

Onde, n_c é o número de amostras de calibração, VL é o número de variáveis latentes do modelo $y_{i,\text{cal}}$, e $\hat{y}_{i,\text{cal}}$ são respectivamente os valores de referência e estimados.

- **RMSECV – Raiz quadrada do erro quadrado da validação cruzada;**

Embora o RMSEC seja um parâmetro importante para medir o ajuste nas amostras de calibração, ele não pode ser usado para estimar o número de variáveis

latentes do modelo por estar sujeito a sobreajuste. Para este fim, as mesmas amostras de calibração são analisadas utilizando um procedimento de validação cruzada, que permite estimar o RMSECV [41].

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n_c}} \quad \text{Equação 3-18}$$

- **RMSEP – Raiz quadrada do erro médio quadrado da predição**

O RMSEP é uma figura de mérito utilizada para verificar a acurácia do método de regressão na fase de validação. É baseado na concordância entre os valores preditos pelo modelo e os valores de referência de um conjunto de amostras que não estavam presentes no desenvolvimento do modelo, e pode ser expressa pela Equação 3-19 [75, 76].

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n_v}} \quad \text{Equação 3-19}$$

onde, n_v é o número de amostras de validação, $y_{i,\text{val}}$, e $\hat{y}_{i,\text{val}}$ são respectivamente os valores de referência e estimados.

- **Coefficiente de determinação (R^2)**

Indica o grau de ajuste do modelo aos dados, tanto para amostras de calibração como de validação.

- **REP – Erro relativo da predição**

Com o erro relativo de predição, a precisão relativa dos conjuntos de calibração e validação podem ser calculadas as unidades relativas, conforme a Equação 3-20 [77].

$$\text{REP} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(\hat{y}_i - y_i)^2}{y_i^2}} 100 \quad \text{Equação 3-20}$$

Onde n é o número de amostras de calibração (n_c) ou validação (n_v) dependendo do conjunto de dados considerado, \hat{y}_i e y_i são, respectivamente, os valores estimados e de referência da propriedade de interesse, das amostras de calibração ou validação.

- **Precisão**

Indica o nível de concordância entre os valores medidos para a propriedade de interesse uma mesma amostra homogênea ou várias amostras em condições específicas. [78]. Considerando a existência de “ n ” amostras medidas em “ m ” replicatas, a precisão média pode ser estimada por:

$$\text{Precisão} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (\hat{y}_{ij} - \hat{\bar{y}}_i)^2}{n(m-1)}} \quad \text{Equação 3-21}$$

Onde n é o número de amostras consideradas (n_c para as amostras de calibração ou n_v para as de validação), \hat{y}_{ij} é o valor estimado para a j -ésima replicata da i -ésima amostra e $\hat{\bar{y}}_i$ é a média das replicatas da i -ésima amostra.

- **Capacidade de detecção (CC β)**

A capacidade de detecção (CC β) permite verificar se o método desenvolvido é apropriado para a determinação do analito a baixas concentrações e é definida e adotada pela norma ISO 11843 (Capability of detection) [79, 80, 81, 82].

$$CC\beta = \delta_{\alpha,\beta,\nu} \frac{s}{b} \sqrt{\frac{1}{n_c} + \frac{1}{m} + \frac{\bar{y}_i^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2}} \quad \text{Equação 3-22}$$

Onde s é o desvio padrão dos resíduos da regressão entre os valores de referência (abscissa) *versus* os valores estimados (ordenada) para as amostras de calibração, b é a inclinação dessa regressão, n_c é o número de amostras, m é o número de replicatas realizadas em cada amostra, \bar{y}_i é a concentração média das amostras de calibração, e $\delta_{\alpha,\beta,\nu}$ é o parâmetro não-centralizado obtido a partir da distribuição t não central com probabilidades alfa e beta, considerando $\nu = n - 2$ como graus de liberdade.

- **Ajuste da reta**

Para estimar a qualidade do ajuste do modelo no conjunto de validação e verificar se os valores estimados são estatisticamente equivalentes com os de referência será aplicada a abordagem proposta por Rius e Rius (1997) que se baseia no cálculo de regiões elípticas de confiança conjunta (EJCR, do inglês - *Elliptical Joint Confidence Regions*). Esta abordagem permite a avaliação do ajuste da reta para dados multivariados, bem como a presença de viés nos resultados. Após a estimativa dos intervalos de confiança para a intercepção e inclinação, verifica-se se esses intervalos incluem os valores teóricos de 0 e 1 para a intercepção e inclinação, respectivamente, o que indicará que o método não apresenta qualquer viés constante ou proporcional nos resultados. Graficamente isso é visualizado pela presença do ponto (1,0), que representa a posição ideal da inclinação e do intercepto, respectivamente, dentro da elipse de confiança [83].

3.5 Classificação por Modelagem Independente por Analogia de Classes direcionado pelos dados (DD-SIMCA).

O modelo DD-SIMCA (do inglês, *data driven – soft independent modeling of class analogy*) se diferencia do modelo SIMCA convencional por utilizar uma abordagem diferente para o cálculo dos limites de confiança que delimitam a classe alvo. Sua base matemática está na PCA, onde um modelo PCA independente é construído para modelar cada classe de interesse. Conforme sugerido por Zontov *et al.* (2017) e Rodionova *et al.* (2014), [84, 85], os passos utilizados para o desenvolvimento do DD-SIMCA estão descritos a seguir:

- i. Análise de componentes principais (PCA) do conjunto de treinamento contendo os dados instrumentais da classe alvo, devidamente pré-processados e centrados na média;
- ii. Escolha do número de componentes principais a serem utilizados;
- iii. Cálculo das distâncias de escores (SD, do inglês *score distance*). Esta distância é calculada de forma análoga à dos valores de T^2 de Hotelling (Equação 3-7) [85];

Cálculo das distâncias ortogonais (OD, do inglês *orthogonal distance*), que é calculado como a soma dos quadrados dos erros associados ao modelo PCA (Equação 3-24) [86]. Deve-se destacar que a OD são idênticos aos resíduos Q definidos pela equação 3-9.

Para facilitar que o leitor possa acompanhar as equações e símbolos desse capítulo com os trabalhos já publicados com o modelo DD-SIMCA, a notação utilizada para a SD e OD foi escolhida como h_i e v_i , respectivamente, que é a notação utilizada nos trabalhos que propuseram e empregam DD-SIMCA;

$$h_i = \mathbf{t}_i \boldsymbol{\lambda}^{-1} \mathbf{t}_i^T \quad \text{Equação 3-23}$$

$$v_i = \mathbf{e}_i \mathbf{e}_i^T \quad \text{Equação 3-24}$$

- iv. Os valores médios de h e v foram calculados e nomeados como h_0 e v_0 respectivamente, sendo utilizados como fatores de normalização das distâncias de escores e ortogonal respectivamente;
- v. Os números de graus de liberdade para a distância de escores (N_h) e da distância ortogonal (N_v) são calculados pelo chamado método de momentos, conforme as Equações 3-25 e 3-26, como indicado nas referências [86, 87];

$$N_h = \text{int} \frac{2h_0^2}{V_h} \quad \text{Equação 3-25}$$

$$N_v = \text{int} \frac{2v_0^2}{V_v} \quad \text{Equação 3-26}$$

Onde, o termo “int” equivale ao arredondamento da expressão para o inteiro mais próximo e maior que zero, V_h e V_v , são as variâncias de h e v respectivamente.

- vi. Um parâmetro que engloba h e v , refletindo assim uma medida de distância global (c) pode ser calculado conforme a Equação 3-27 e apresenta valores que seguem uma distribuição de qui-quadrado com $N_h + N_v$ graus de liberdade [86].

$$c = N_h \frac{h}{h_0} + N_v \frac{v}{v_0} \alpha \chi^2(N_h + N_v) \quad \text{Equação 3-27}$$

O valor “ c ” é calculado para criar a regra de decisão determinada por $c \leq c_{\text{crítico}}$. [88]. Caso uma amostra apresente valor de $c \leq c_{\text{crítico}}$ esta é identificada como pertencente à classe alvo.

- vii. A distância crítica $c_{crítico}$, é obtida pela distribuição qui-quadrado, com nível de confiança de $(1-\alpha)$ com $N_h + N_v$ graus de liberdade, conforme Equação 3-28 [86, 88].

$$c_{crítico} = \chi^{-2}(1-\alpha, N_h + N_v) \quad \text{Equação 3-28}$$

Para a realização das fases i e ii, foram utilizados o software Matlab R2012a, e a ferramenta PLS_Toolbox 7.0.3. Nas demais fases foi utilizado o toolbox DD-SIMCA disponibilizado gratuitamente por seus autores por meio de seu website [89]. O toolbox DD-SIMCA realizou os cálculos de todas as variáveis exceto o do número de PC's e o erro do tipo I (α), sem o uso da interface do toolbox.

3.5.1.1 Validação de modelos de classificação.

Em modelos de classificação, o desempenho do método é frequentemente descrito por figuras de mérito que possam medir sua eficiência em identificar amostras pertencentes e não pertencentes à classe alvo, sendo a sensibilidade e a especificidade as medidas utilizadas nestes casos. Para se calcular a taxa de sensibilidade (TST), é necessário ter um conjunto de validação com uma quantidade representativa de amostras independentes que pertençam à classe alvo, mas que não foram utilizadas na construção do modelo, estas amostras podem ser classificadas corretamente pelo método (Verdadeiro Positivo) ou incorretamente (Falso Negativo). No cálculo da taxa de especificidade (TSP), é necessário também uma outra quantidade de amostras igualmente representativas no conjunto de validação, mas que não pertençam à classe alvo e que também podem ser classificadas corretamente (Verdadeiro Negativo) ou incorretamente (Falso Positivo). [90, 91] Complementarmente a eficiência do método pode ser calculada utilizando a taxa de eficiência (TEF) [58, 65].

- A taxa de sensibilidade (TST) do método [84] é a porcentagem de acertos de amostras pertencentes à classe alvo e pode ser calculado utilizando-se a Equação 3-29.

$$TST = \frac{VP}{VP + FN} 100\% \quad \text{Equação 3-29}$$

Onde VP é o número de amostras verdadeiro positivo, que é o número de amostras pertencentes à classe alvo e corretamente classificados como tal; FN é o número de amostras identificadas como falso negativo, amostras pertencentes à classe alvo, mas erroneamente classificadas como pertencentes a uma classe não alvo, ou erro do tipo I.

- A taxa de especificidade (TSP) do método [84] é a porcentagem de acertos de amostras pertencentes à classe não alvo e pode ser calculado utilizando-se a Equação 3-30.

$$TSP = \frac{VN}{VN + FP} 100\% \quad \text{Equação 3-30}$$

Onde VN é o número de amostras verdadeiro negativo, que é o número amostras não pertencentes à classe alvo e corretamente classificados como tal; FP é o número de amostras identificadas como falso positivo, sendo estas amostras não pertencentes à classe alvo, mas erroneamente classificadas como pertencentes a classe alvo, ou erro do tipo II.

- A taxa de eficiência (TEF), como o próprio nome já sugere, mede eficiência do modelo, que leva em consideração as taxas de erros falsos negativos (TFN) e falsos positivos (TFP), ou erros dos tipos I e II, respectivamente. A Equação 3-31 é utilizada para o cálculo da TEF.

$$TEF = 100\% - (TFN + TFP) \quad \text{Equação 3-31}$$

$$TFN = \frac{FN}{FN + VP} 100\% \quad \text{Equação 3-32}$$

$$TFP = \frac{FP}{FP + VN} 100\% \quad \text{Equação 3-33}$$

Onde TFN (Equação 3-31) é a taxa de erros falso negativo observada no modelo para a classe alvo, ou erro do tipo I e TFP (Equação 3-32) é a taxa de erros falso positivo observada no modelo quando aplicado em amostras da classe não alvo, ou erro do tipo II.

CAPÍTULO 4

DETERMINAÇÃO DA PUREZA DO ÓLEO DE COPAÍBA UTILIZANDO UM ESPECTRÔMETRO PORTÁTIL NIR E PLSR EM AMOSTRAS SUSPEITAS DE ADULTERAÇÃO COM ÓLEO DE SOJA.

4 DETERMINAÇÃO DA PUREZA DO ÓLEO DE COPAÍBA UTILIZANDO UM ESPECTRÔMETRO PORTÁTIL NIR E PLSR EM AMOSTRAS SUSPEITAS DE ADULTERAÇÃO COM ÓLEO DE SOJA

Diversos métodos baseados em cromatografia gasosa, cromatografia de camada delgada, volumetria ácido-base e índice de refração, já foram propostos com o intuito de caracterizar e/ou determinar adulterações do óleo de copaíba, conforme já descrito no capítulo 2. E apesar de alguns desses métodos serem de custo relativamente baixo, ainda assim tais procedimentos mantêm a dependência de uma estrutura mínima de laboratório para a realização das análises ou apresentam problemas de seletividade, de forma que até o momento cooperativas que compram e revendem o óleo de copaíba (OC) ainda não tem implementado um método que permita a avaliação da pureza ou qualidade do OC.

A espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR, do inglês – *Near Infrared*) associado à quimiometria vem sendo utilizada em processos de controle de qualidade de diversos produtos como fármacos [92, 93, 94], alimentos [95, 96, 97], combustíveis [38, 98], e já demonstrou um grande potencial de aplicação para a análise de diversos tipos de óleos, como por exemplo o óleo de palma [36], o azeite de oliva [37], o óleo de soja [39] e óleos essenciais [40]. Tendo em vista o grande potencial e o aparecimento nos últimos anos de equipamentos portáteis de custo relativamente baixo, o desenvolvimento de um método utilizando esta técnica para o controle de qualidade do óleo de copaíba pode trazer uma grande contribuição e segurança aos seguimentos utilizadores deste recurso florestal não madeireiro. Portanto, o principal objetivo desse capítulo foi o desenvolvimento de um novo método para a determinação do teor de pureza de óleos da *Copaifera langsdorffii* Desf. suspeitos de estarem adulterados com o óleo de soja ou outros óleos vegetais, utilizando um espectrômetro NIR portátil e calibração multivariada empregando

regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR, do inglês, *Partial Least Squared Regression*).

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

➤ Equipamentos, vidrarias, acessórios e insumos.

Todos os equipamentos utilizados para a realização desta tese estavam em perfeito funcionamento, calibrados e com suas revisões periódicas em dia. As vidrarias volumétricas devidamente calibradas.

- CG-EM: Cromatógrafo gasoso da marca Agilent Technologies modelo 7890A GC System, acoplado a um detector de espectro de massas da mesma marca, modelo 5975C inert XL MSD e amostrador automático GC Sampler 120. Microcomputador com software ChemStation para controle do sistema de cromatografia;
- Gás Hélio, pureza 99,999%;
- Pulsing Vortex Mixer da marca Fisher Scientific;
- Espectrometro portátil MicroNir 1700, VIAVI Solutions;
- Suporte para MicroNIR 1700 e cubeta construídos para esse trabalho;
- Cubetas de Quartzo de 10mm de caminho óptico, capacidade para 3,5 mL;
- Seringa de vidro com capacidade de 10 μ L, marca Hamilton;
- Coluna capilar HP5-ms 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano (30m x 0.25mm de diâmetro interno x 0.25 μ m de filme);
- Vials de vidro âmbar capacidade de 1,5mL, com tampa e lacre e septo em Teflon®;

- Balança BEL modelo Umark 210A, Capacidade máxima de 210 g, resolução 0,1 mg;
- Balões volumétricos de 10 mL em vidro;
- Tubos de ensaio de vidro com tampa, capacidade 70 mL;
- Balões volumétricos de 100 mL em plástico;
- Micropipeta automática PIPETMAN, capacidade 2 a 20 μ L, marca GILSON;
- Micropipeta automática LABMATE, capacidade 20 a 200 μ L, marca HT high tech lab;
- Micropipeta automática PIPETMAN, capacidade 200 a 1000 μ L, marca GILSON;
- Pipeta automática PhysioCare concept, capacidade 1 a 10 mL, marca EPPENDORF;
- Ponteiras para pipetas e micropipetas;
- Broca manual para madeira tipo trado 3/4 X 25 polegadas (Diâmetro x comprimento);
- Cano de PVC de 1/2 polegada de diâmetro;
- Mangueira de plástico de 3/4 polegadas de diâmetro;
- Frascos de plástico com tampa, para 500mL;
- Pipeta de Pasteur em plástico, capacidade de 3 mL;

➤ **Solventes e reagentes**

- Metanol, pureza 99,9% adequado para HPLC, marca TEDIA;
- n-Hexano pureza 95%, adequada para HPLC, marca TEDIA;

➤ **Reagentes**

- Hidróxido de Sódio P.A. ACS, Pureza 99%

4.1.1 Escolha da espécie de *Copaifera*

A espécie *Copaifera langsdorffii* Desf. foi escolhida para o desenvolvimento do método devido à sua abundância na maioria do território brasileiro, [6] inclusive no Distrito Federal e proximidades, o que favoreceu a ida a campo para a realização de coletas de amostras autênticas de óleo de copaíba (OC), diretamente dos troncos das copaibeiras. Assim como a aquisição de amostras de extrativistas da região.

➤ **Coleta/aquisição de amostras autênticas:**

Foram estabelecidos contatos com proprietários rurais e extrativistas de óleo de copaíba, no estado de Goiás e Minas Gerais, onde haviam relatos da ocorrência de copaibeiras, por eles chamadas de “Pau-de-óleo” e “Pau’dói”.

A coleta *in situ* propriamente dita, foi realizada efetivamente na área rural do distrito de Santa Rosa, Município de Formosa-GO, nas coordenadas 15° 01’ 21” Sul, 47° 17’ 24” Oeste, Figura 4-1.



Figura 4-1 - Área de coleta de amostras *in situ*, indicada com a seta azul (imagem obtida no Google Earth).

Nesta área foram coletadas oito amostras autênticas diretamente das copaibeiras, através de abertura de furo no tronco da árvore a 1 metro de altura, onde as árvores tinham um diâmetro mínimo de 40 cm, de acordo com o especificado na literatura [17], e instalação de dreno e frasco para coleta do óleo, conforme já ilustrado na Figura 2-3. Outras nove amostras foram adquiridas de extrativistas do óleo de copaíba ou de terceiros. Os detalhes relacionados ao local e data de aquisição das amostras, assim como de seus volumes, estão detalhados no Anexo I.

4.1.2 Análise de amostras em Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

Segundo a literatura, o óleo de copaíba (OC) já foi encontrado adulterado com álcool etílico, triacilgliceróis e óleos minerais [1, 3, 5, 9, 18]. Considerando que a adulteração visa auferir lucro à pessoa que comete esse crime, o adulterante geralmente é adicionado em uma quantidade apreciável na amostra, de fácil acesso e baixo custo. Neste trabalho, o óleo de soja foi escolhido para tal finalidade, pois o consumo direto deste óleo pela população brasileira é superior a 80% do consumo de todos os óleos comestíveis comerciais no Brasil [99], além de ser citado como um adulterante muito provável por outros trabalhos [1, 3, 6].

Todas as 9 amostras adquiridas de terceiros foram analisadas através de CG-EM para a identificação de possíveis contaminações/adulteração dessas com triacilgliceróis. As amostras em que esse tipo de adulteração foi detectado foram identificadas e retiradas do grupo de amostras autênticas, sendo estas deixadas apenas para a validação do método.

4.1.2.1 Preparação das amostras

Antes de serem submetidas ao CG-EM as amostras foram submetidas a um processo rápido e barato de transesterificação, baseado no método ISO 5509/78, [100, 101] com adaptações, descrito a seguir:

Foi pesado 1,0000 g do óleo a ser analisado em um balão volumétrico de 10,00 mL, o balão foi completado até a marca de aferição com n-Hexano PA, a solução foi agitada até a homogeneização e transferida para um tubo de ensaio de aproximadamente 70 mL. Em seguida, foi adicionado 0,50 mL de uma solução metanólica de NaOH a $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ e colocado por 20 segundos em vortex a 2500 rpm³. Após repouso e a separação das fases, foram transferidos 100 µL do sobrenadante em outro balão volumétrico de 10,00 mL e completado com n-Hexano PA. Cada amostra foi preparada em triplicata e transferidas para *vials* de 1,5 mL e injetado 2 µL no CG-EM.

Deve-se destacar que este método não realiza a esterificação dos ácidos livres presentes na amostra, de forma que não é capaz de fornecer uma amostra para a caracterização química completa do OC. Contudo, permite a transesterificação de triacilgliceróis em ésteres metílicos, conforme esquema na Figura 4-2, permitindo a detecção deste tipo de adulteração no óleo de copaíba por cromatografia gasosa, o que foi suficiente para atingir os objetivos desse trabalho.

³ Rpm: rotações por minuto.

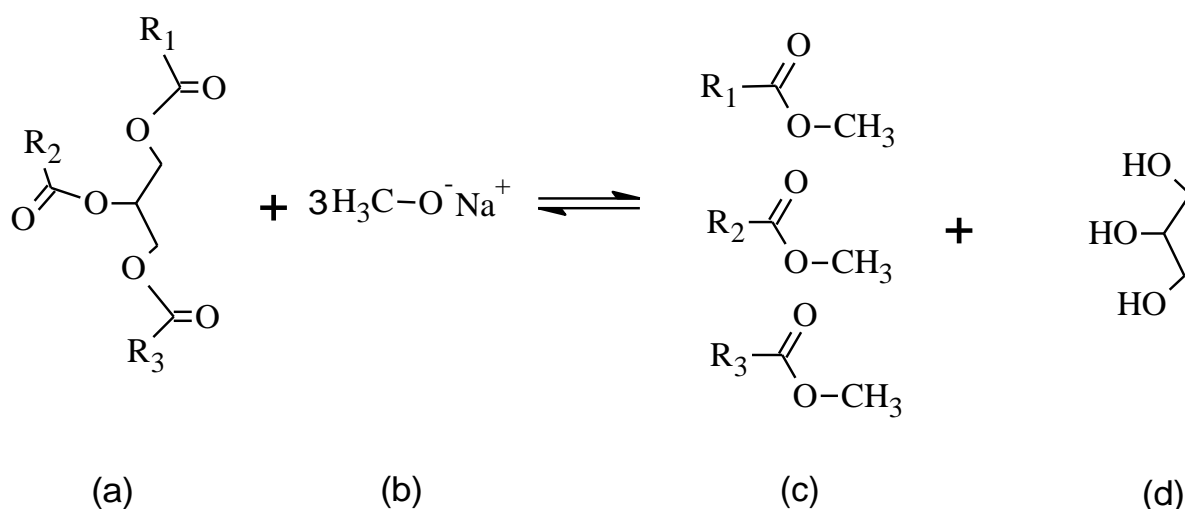


Figura 4-2 - Esquema simplificado da transesterificação total de um triacilglicerídeo em ésteres metílicos por catálise básica com hidróxido de sódio (a: Triacilglicerídeo, b: Metanoato de sódio, c: Ésteres metílicos, d: Glicerol).

4.1.2.2 Instrumentação

As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso Agilent 7890A, acoplado a espectrômetro de massas Agilent 5975C. A injeção foi realizada no modo Split com divisão de 20:1 e fluxo de 14 mL.min⁻¹ à temperatura de 270°C. A temperatura da fonte de ionização foi de 230°C, com ionização por impacto de elétrons a 70 eV⁴, a varredura de massas foi realizada no intervalo de 40 a 600 u⁵.

Foi utilizada uma coluna capilar HP5-ms (5 % fenil–95 % metilpolisiloxano), com Hélio a 99,999% de pureza como gás carreador. As temperaturas de trabalho utilizadas para cada corrida cromatográfica foram: Isoterma de 2 minutos a 110°C, aquecimento até 130°C a taxa de 3°C.min⁻¹, até 290°C a taxa de 8,5°C.min⁻¹ com isoterma de 5 minutos, totalizando 32 minutos de corrida.

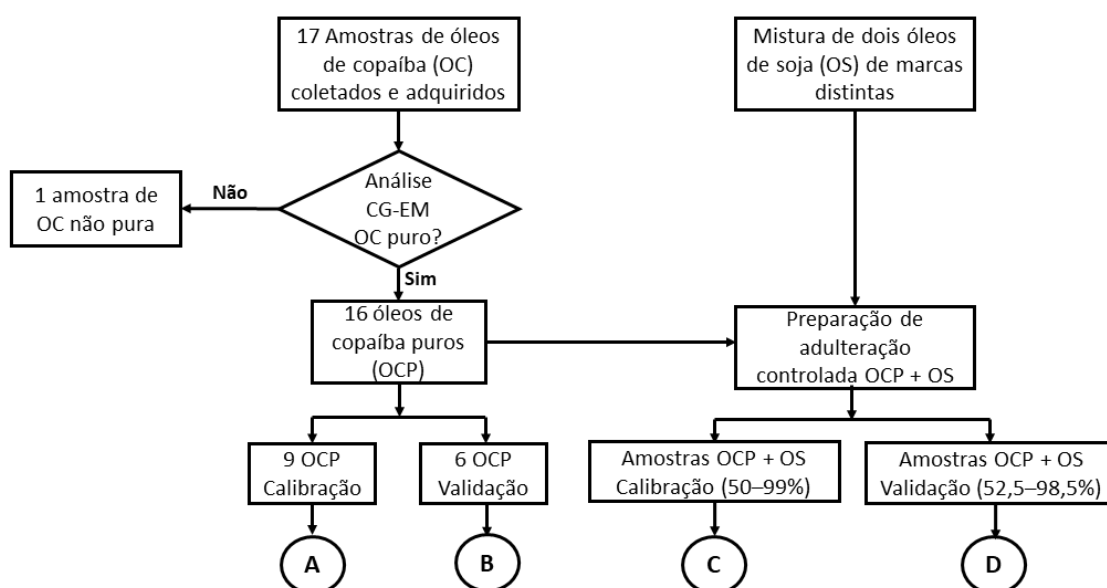
⁴ eV: Elétron-volt.

⁵ u: unidade de massa atômica

4.1.3 Preparação das amostras com adulterações controladas

As amostras adulteradas foram preparadas a partir de 15 amostras de óleos de copaíba (OC) puros e uma mistura de óleos de soja comerciais de duas marcas distintas (OS) a 20 °C, usando micropipetas calibradas (20-200 uL, 200-1000 uL, 1-10 mL) e frascos volumétricos calibrados de 10 mL.

Para o desenvolvimento do modelo PLSR, foram preparadas 25 amostras de calibração com base em 11 origens diferentes de OC puros. Dentre as 25 amostras de calibração, nove foram compostas de OC puros sem adulteração e as outras 16 foram constituídas por misturas contendo OC adulterado com OS, cuja pureza variaram de 50,00 a 100,00% (v / v). Da mesma forma, foram preparadas 21 amostras de validação com base em 15 OC puros de diferentes origens, em que seis deles eram amostras de OC puros e 15 amostras adulteradas, onde o teor de pureza variou entre 52,50 e 100,00 % (v / v). O esquema geral da preparação das amostras de calibração e validação estão ilustrados na Figura 4-3.



Amostras de Calibração: A + C

Amostras de Validação : B + D

Figura 4-3 - Esquema geral de preparação das amostras de calibração e validação.

Os detalhes dos teores de pureza para as amostras utilizadas nos conjuntos de calibração e validação são apresentados na Tabela 4-1. É importante observar que as amostras numeradas CO-02, CO-03, CO-06, CO-08 e CO-15 são de origem distinta e foram incluídas apenas no conjunto de validação. Isso foi feito para avaliar a robustez do método com amostras de OC autênticas com origens distintas das que fizeram parte do conjunto de calibração.

Tabela 4-1 – Planejamento experimental para a composição das amostras de calibração e validação.

Amostras de Calibração			Amostras de Validação		
Amostra	Fonte ^a	Pureza ^b	Amostra	Fonte ^a	Pureza ^b
AC0-1	CO-12	100,00			
AC0-2	CO-14	100,00			
AC0-3	CO-13	100,00			
AC0-4	CO-10	100,00	AV0-1	CO-15	100,00
AC0-5	CO-01	100,00	AV0-2	CO-06	100,00
AC0-6	CO-11	100,00	AV0-3	CO-08	100,00
AC0-7	CO-09	100,00	AV0-4	CO-02	100,00
AC0-8	CO-04	100,00	AV0-5	CO-03	100,00
AC0-9	CO-05	100,00	AV0-6	CO-07	100,00
AC1	CO-10	99,00	AV1	CO-15	98,50
AC2	CO-12	98,00	AV2	CO-10	97,50
AC3	CO-14	97,00	AV3	CO-16	96,50
AC4	CO-13	96,00	AV4	CO-12	95,50
AC5	CO-01	95,00	AV5	CO-11	94,50
AC6	CO-16	92,50	AV6	CO-14	91,25
AC7	CO-12	90,00	AV7	CO-09	88,75
AC8	CO-14	87,50	AV8	CO-02	86,25
AC9	CO-13	85,00	AV9	CO-03	82,50
AC10	CO-10	80,00	AV10	CO-04	77,50
AC11	CO-09	75,00	AV11	CO-06	72,50
AC12	CO-16	70,00	AV12	CO-07	67,50
AC13	CO-07	65,00	AV13	CO-01	62,50
AC14	CO-13	60,00	AV14	CO-08	57,50
AC15	CO-11	55,00	AV15	CO-13	52,50
AC16	CO-04	50,00			

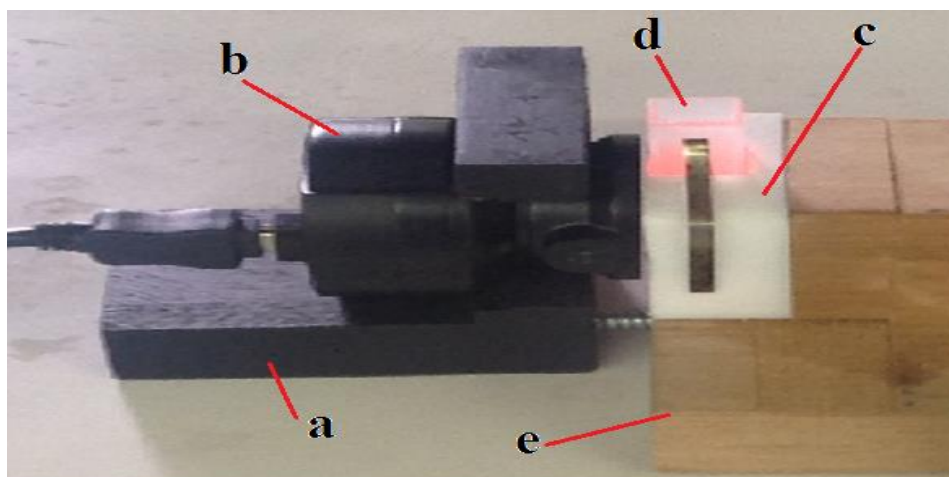
^a Fontes dos óleos de copaíba autênticos

^b Teores de pureza em % (volume/volume)

A preparação das amostras seguiu o Protocolo de adulteração de óleo de copaíba com óleo de soja, descrito em detalhes no Anexo II.

4.1.3.1 Construção de acessório para aquisição de espectros NIR de amostras líquidas para o espectrômetro portátil MicroNir 1700.

Foi desenvolvido um acessório para aquisição de espectros no infravermelho próximo para líquidos no espectrômetro MicroNir 1700®, composto de um suporte de madeira para acomodar o espectrômetro portátil e uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico contendo a amostra de OC. A cavidade para acomodar a cubeta foi confeccionada em Politetrafluoretileno (PTFE), comercialmente conhecido como Teflon®, para que houvesse uma superfície refletora para o NIR e se utilizasse o princípio de transfectância [102, 103, 104], como técnica de aquisição dos espectros, Figura 4-4.



a - Suporte para o MicroNir 1700; **b** – MicroNir 1700; **c** – Porta cubeta em PTFE; **d** – Cubeta de 10mm de caminho óptico; **e** – Base do suporte da cubeta

Figura 4-4 - Aparato desenvolvido no laboratório para leitura de líquidos no espectrômetro MicroNir 1700®.

4.1.4 Aquisição dos espectros NIR das amostras de óleo copaíba

Os espectros NIR de todas as amostras foram adquiridos em triplicata usando o espectrômetro portátil MicroNIR 1700® (VIAVI Solutions), que é baseado em um

4 – Determinação da pureza do óleo de copaíba utilizando um espectrômetro portátil NIR e PLSR em amostras suspeitas de adulteração com óleo de soja

filtro linear variável, uma matriz de detectores de Arseneto de Gálio de Índio (InGaAs) e duas lâmpadas de tungstênio como fonte de radiação.

O intervalo de comprimento de onda do equipamento foi de 908,1 a 1676,2 nm com uma resolução de 6,2 nm. Cada espectro foi convertido na escala de absorbância e o resultado foi uma média de 200 varreduras com um tempo de integração de 2000 μ s, totalizando 0,4 s de tempo de medição.

Cada amostra preparada foi lida no aparato de aquisição de espectros NIR em triplicata, Figura 4-5. Totalizando 75 espectros de amostras de calibração, e 63 espectros de validação.

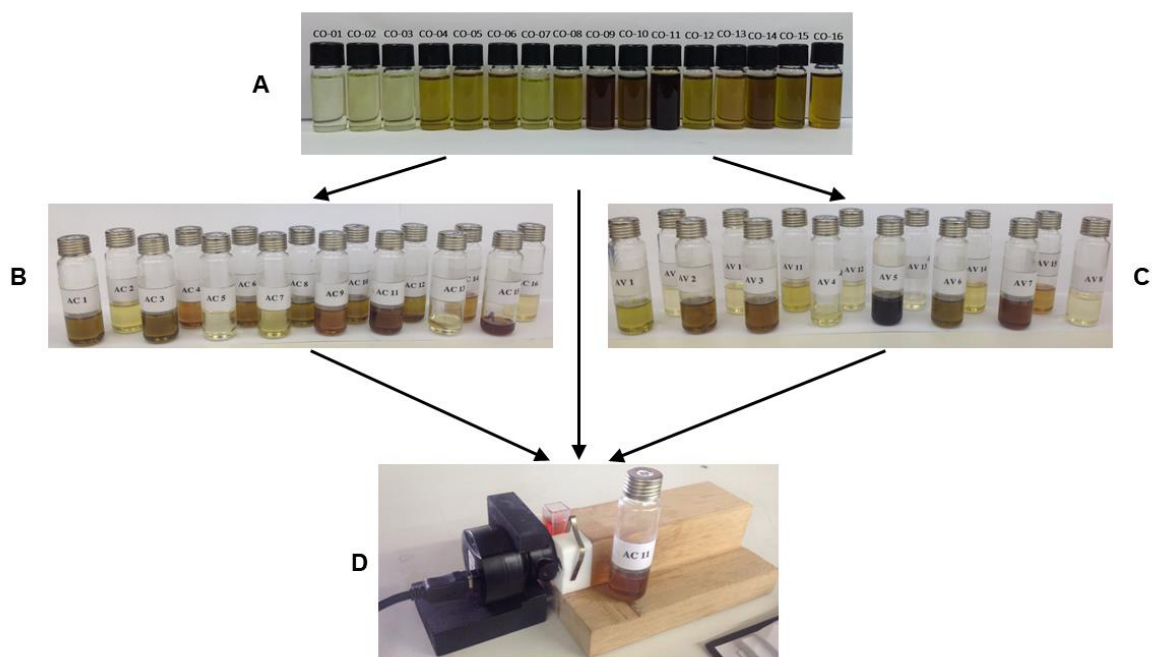


Figura 4-5 - (A) Óleos de copaíba autênticos; (B) Amostras de calibração adulteradas; (C) Amostras de validação adulteradas; (D) Aparato de aquisição de espectros em amostras líquidas.

4.1.5 Validação das amostras adulteradas por cromatografia gasosa com espectrometria de massas acoplada (CG-EM)

Todas as amostras de calibração e validação foram submetidas a análise em cromatógrafo gasoso com espectrometria de massas em triplicata, visando ratificar

os teores de ácidos graxos nas amostras. Foram preparados padrões de calibração específicos para este ensaio, como estabelecido no “Protocolo para preparação de curva de calibração de Óleo de Copaíba adulterado com óleo de soja, para uso em cromatógrafo gasoso”, conforme Anexo III.

Os parâmetros de aquecimento da coluna foram alterados, visando uma melhor definição dos picos dos ácidos graxos metilados, melhorando o processo de quantificação. Desta forma os novos parâmetros de aquecimento foram: Isoterma de 2 minutos a 110°C, aquecimento até 130°C a taxa de 3°C.min⁻¹, aquecimento até 200°C a taxa de 8,0°C.min⁻¹ com isoterma de 8 minutos, aquecimento até 290°C a taxa de 8,5°C.min⁻¹ com isoterma de 2 minutos, totalizando 38 minutos de corrida.

4.1.6 Validação com amostras comerciais e adulterações com óleo de fritura.

No método proposto, outros dois conjuntos de dados foram utilizados para a validação. Um conjunto de dados consistiu em apenas uma amostra adquirida de um extrativista, na qual uma adulteração foi previamente identificada pela análise em CG-EM. O segundo conjunto de dados consistiu em seis misturas preparadas com diferentes OC puros adulterados com OS já usado em frituras. A pureza nominal neste segundo conjunto de validação variou de 56,00 à 94,00% (v / v). Esses conjuntos de dados de validação foram utilizados para verificar a robustez do método proposto em relação às adulterações realizadas com óleo de soja usado e uma amostra adulterada/contaminada real.

4.1.7 Desenvolvimento de modelo em PLSR

Para explicar a covariância entre os espectros NIR e os teores de pureza de OC, o número adequado de variáveis latentes (VL) para o modelo foi determinado, utilizando a validação cruzada por *Venetian blinds*. Neste tipo de validação as amostras de teste são divididas em grupos com “n” amostras cada e são realizadas sub-validações onde a cada iteração, a n-ésima amostra de cada grupo é retirada do

conjunto de amostras de calibração, sendo então construído um modelo, onde as amostras retiradas são usadas para realizar a validação-cruzada.

Vários pré-processamentos foram testados para o desenvolvimento do modelo: variável normal padronizada (SNV, do inglês *Standard Normal Variate*) + centragem na média, SNV + 1ª derivada + centragem na média, SNV + 2ª derivada + centragem na média. Todas as derivadas foram processadas com algoritmo de suavização de Savitzky-Golay.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora os óleos de copaíba puros tenham sido obtidos da mesma espécie, eles apresentaram uma variação considerável de cor, como pode ser observado na Figura 4-6. Dois aspectos que podem ter influenciado na coloração das amostras foram os seguintes: (1) as amostras CO-01, CO-02, CO-03, CO-07 foram coletadas de árvores que estavam situadas em matas ciliares (muito próximo a um curso d'água); (2) as amostras CO-04, CO-05, CO-06 e CO-08 foram coletadas em árvores situadas em mata fechada (Cerradão⁶) e com distância de curso d'água maior que 500 metros. No que se refere às amostras CO-09 à CO-16 foram adquiridas de extrativistas ou comerciantes e não foi possível estabelecer o local específico de coleta, assim como a metodologia da coleta. Além disso, a viscosidade dessas amostras também apresentou variação significativa, variando de 10,9 a 28,3 cSt. Essas características ilustram a variação natural que pode ser observada nos óleos de copaíba, mesmo dentro da mesma espécie.

⁶ Cerradão é um tipo de formação do bioma Cerrado, com dossel predominantemente contínuo, cujas alturas médias do extrato arbóreo variam de 8 a 15 metros. [164]



Figura 4-6 – Foto das amostras puras de óleo de copaíba.

4.2.1 Caracterização cromatográfica das amostras de óleo de copaíba

Dentre as nove amostras adquiridas de extrativistas e no comércio, a única que apresentou contaminação/adulteração com ácidos graxos e que não foi utilizada na construção do modelo foi a amostra CO-17, adquirida diretamente de extrativista no distrito de JK em Formosa (GO). Como pode ser observado no cromatograma apresentado na Figura 4-7, foram detectados picos dos ésteres metílicos dos ácidos hexadecanóico (16:0) e do octadec-9-enóico (18:1), nos tempos de retenção de 19,45 e 21,48 minutos respectivamente. As áreas destes picos equivalem a 0,257 e 2,210% da área total dos picos quantificados. A identificação desses compostos foi realizada utilizando a lista interna NIST (do inglês National Institute of Standards and Technologies), do equipamento CG-EM utilizado e indicam a presença de uma adulteração ou contaminação com óleos vegetais.

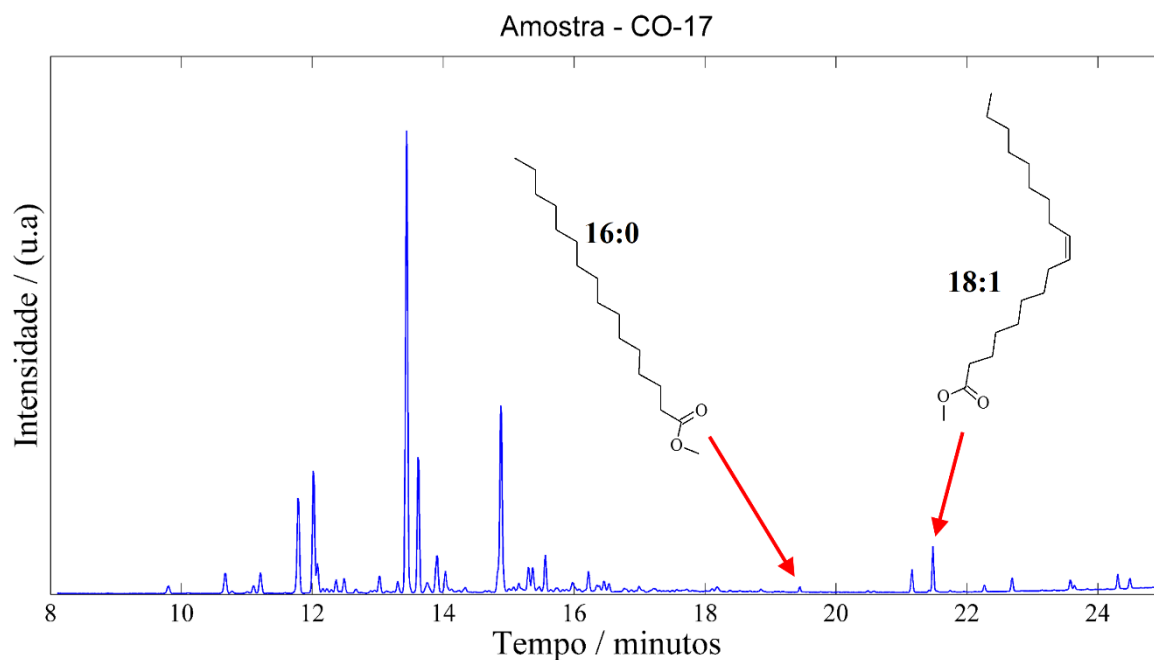


Figura 4-7 - Cromatograma obtido para a amostra CO-17 após processo de transesterificação.

As amostras utilizadas para construir o modelo foram devidamente analisadas no CG-EM e os compostos identificados, também através da lista interna NIST do equipamento e estão relacionadas no Anexo IV.

Visando facilitar a visualização da diversidade desses óleos foi elaborada uma análise de componentes principais - PCA (Figura 4-8), com os teores dos compostos das amostras CO-01 à CO-17, conforme dados do Anexo IV. Como pré-processamento, os dados foram centrados na média e foi realizada uma validação cruzada do tipo deixar uma amostra de fora (do inglês, *leave one out*), onde uma amostra por vez é retirada do conjunto de amostras e o modelo é então validado, o número de iterações nesta validação é igual ao número de amostras do conjunto de calibração.

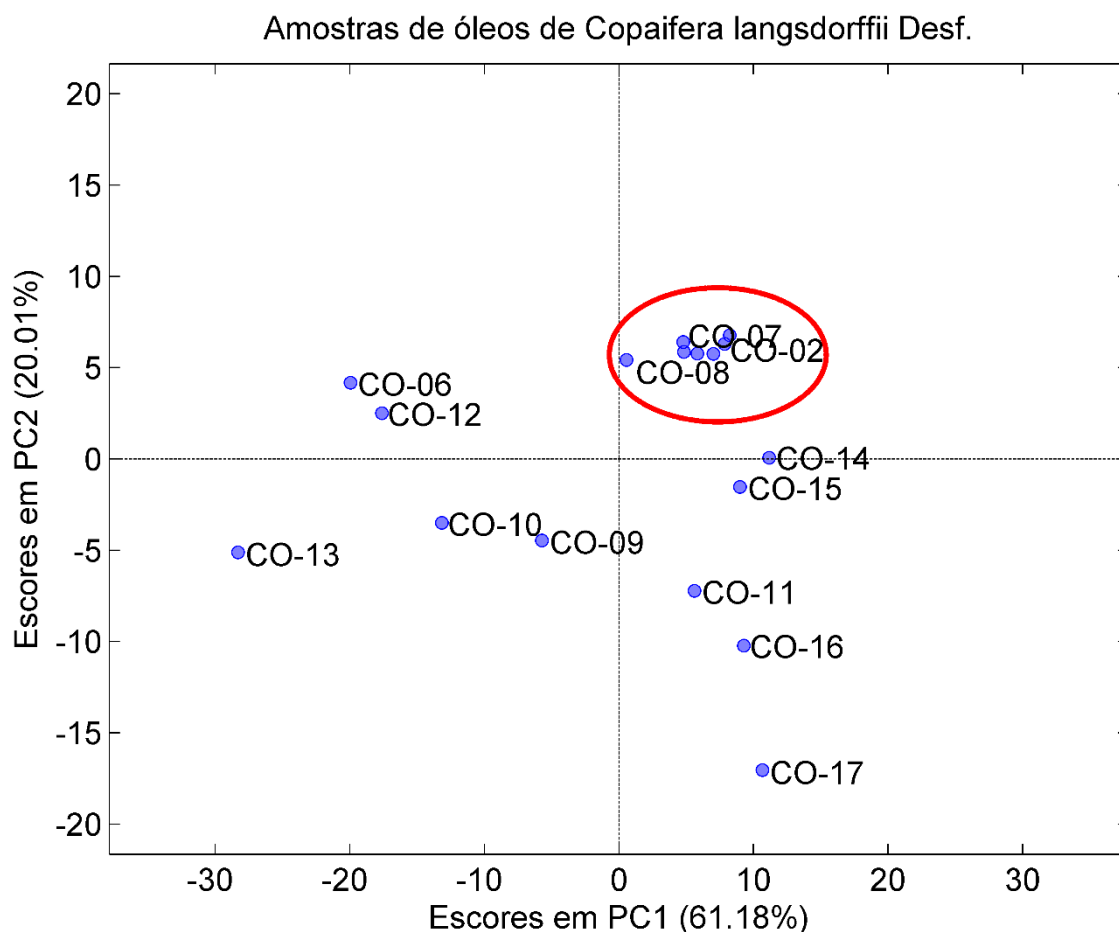


Figura 4-8 - Análise de componentes principais das amostras CO-01 a CO-17 (PC1 x PC2).

A análise dos escores das duas primeiras componentes principais (PC1 x PC2), que explicam 81,19% da variância das amostras, revelou que sete amostras (CO-01 à CO-05, CO-07 e CO-08), indicadas por um círculo vermelho, se agruparam no quadrante positivo de PC1xPC2, Figura 4-8, indicando uma maior similaridade para essas amostras. Pode-se observar nesta mesma figura, que 10 amostras se encontram mais dispersas, revelando uma maior variabilidade das mesmas. Observando o gráfico de pesos (Figura 4-9), tem-se que os compostos que mais contribuem para esse agrupamento das amostras (CO-01 à CO-05, CO-07 e CO-08) foram o beta-Cubebeno, beta-Bisaboleno, alfa-Bergamoteno e alfa-Bisaboleno. Além disso, estas amostras pertencem a um grupo de óleo coletado *in situ* em uma

pequena região geográfica, comprovando que a composição deste produto é altamente influenciada pela localização geográfica.

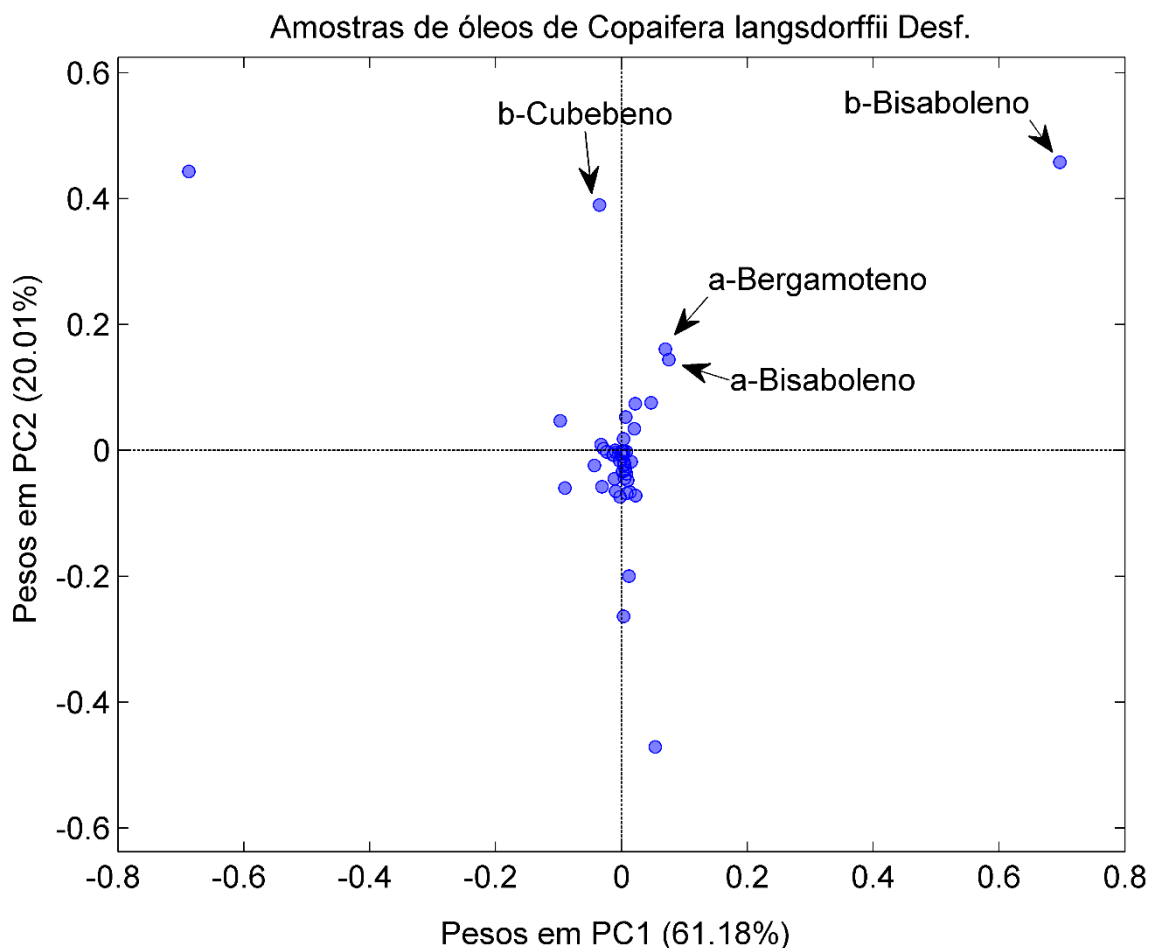


Figura 4-9 – Gráfico de pesos das amostras CO-01 a CO-17 (PC1 x PC2)

Do ponto de vista prático, a variação natural observada nas amostras de diferentes origens, indica que é necessário um número maior de amostras para o desenvolvimento de um método analítico por espectroscopia e calibração multivariada, tendo em vista que as amostras de calibração devem cobrir a variabilidade natural existente nas amostras de óleo de copaíba.

4.2.2 Espectros NIR das amostras de óleo de copaíba

A Figura 4-10 mostra os espectros NIR para as amostras de óleo de copaíba puro (OC), misturas de óleo de copaíba com óleo de soja (OCOS) e óleo de soja puro (OS). Os espectros das amostras de OC na figura evidenciam a variabilidade dos dados NIR como uma função da composição entre as amostras. Observa-se que a diferença mais visível entre os espectros de OC puros é a banda de absorção centrada em 1420 nm. Essa banda apresenta diferenças significativas de intensidade e pode ser atribuída ao primeiro sobretom do estiramento da ligação “O-H” [105, 106, 36], e pode estar relacionada à presença de ácidos diterpênicos. Todavia, essa variação não foi observada nos espectros de todas as amostras. Nesta banda, observou-se uma variação clara da intensidade de absorbância nos espectros de OC, bem como em OCOS, porém esta variação não foi observada nos espectros de OS. Por outro lado, na comparação entre os espectros das amostras de OC puro e as misturas OCOS foi observada uma alta similaridade.

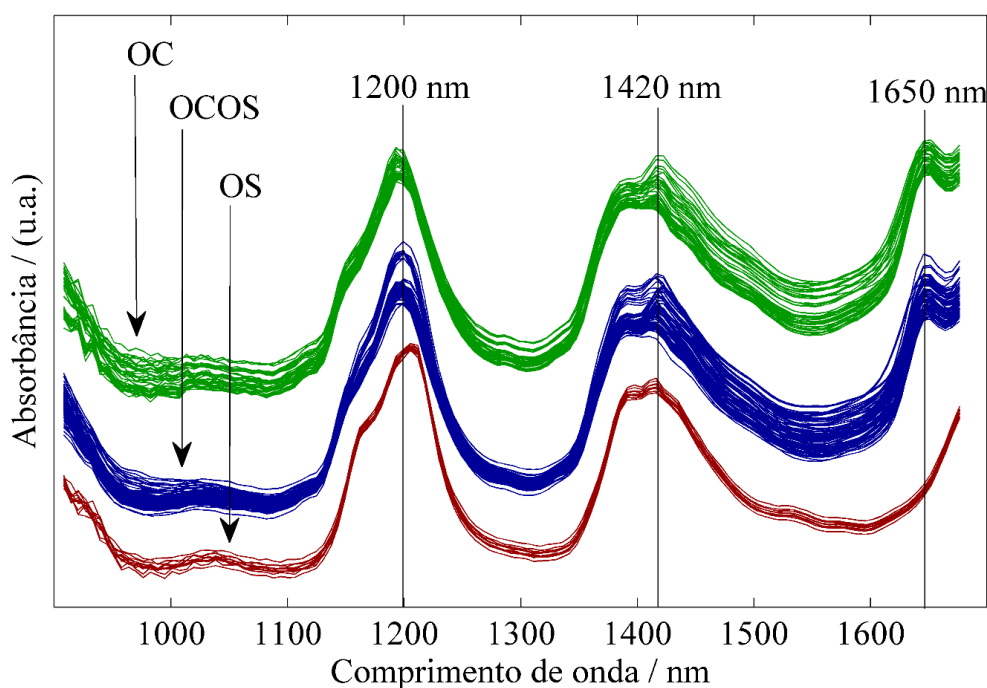


Figura 4-10 - Espectros NIR de amostras de OC (Óleo de copaíba puro), OCOS (Óleo de copaíba adulterado com óleo de soja) e OS (Óleo de soja puro). Para facilitar a visualização dos três grupos de amostras, um deslocamento na linha de base foi adicionado a cada grupo.

Outra diferença nítida foi que os espectros das amostras de óleo de soja (OS) apresentaram uma variação significativa em relação às amostras de OC e OCOS pela ausência da banda de absorção centrada em 1650 nm em amostras de OS, de forma que a banda em 1650 nm está relacionada à presença de OC (Figura 4-10). Esta banda pode ser atribuída ao primeiro sobretom do estiramento da ligação C-H associado a uma dupla ligação de carbono “C=C”, talvez devido à presença de um grupo vinílico ou uma estrutura química contendo um anel com dupla ligação [105, 106]. O aparecimento desta banda nas amostras de óleo de copaíba é justificável devido à presença dos compostos terpênicos como o β e δ -Elemeno por possuírem radicais vinílicos, assim como dos compostos α -Bergamoteno, α -Copaeno, β -Cariofileno e β -Bisaboleno por conterem ciclo com dupla ligação. Além disso, observando a banda centrada em 1200 nm, pode-se notar que as amostras de OC apresentam uma banda mais larga. No entanto, uma vez que essa banda está associada ao segundo sobretom do estiramento das ligações “C-H” de grupos CH₃ e CH₂, não é possível indicar uma razão clara para a diferença observada entre os espectros de OC e OS [107].

4.2.3 Desenvolvimento e validação do modelo PLSR

Em razão do ruído observado nos comprimentos de onda situados entre 908,1-1081,5 nm, como pode ser verificado na Figura 4-10, esta região foi excluída do desenvolvimento dos modelos PLSR. Além disso, os espectros NIR apresentaram mudanças na linha de base que foram corrigidas antes da modelagem PLSR. Esse desvio pode ser geralmente corrigido por diferentes métodos de pré-processamento, tais como: 1ª derivada, 2ª derivada, variável normal padronizada (SNV, do inglês *Standard Normal Variate*) ou correção multiplicativa de espalhamento (MSC, do inglês *Multiplicative Scatter Correction*). Todos esses métodos de pré-processamento foram avaliados na análise.

Após a otimização do modelo, os pré-processamentos que apresentaram melhor performance no desenvolvimento do modelo, foram a combinação da primeira derivada (baseada no algoritmo Savitzky-Golay com polinômio de segundo

grau e janela de 9 pontos), SNV e a centragem na média. Foram desenvolvidos e comparados quatro modelos, onde dois deles englobaram a região espectral entre 1087,7-1676,2 nm e os outros dois a região no intervalo 1397,5-1676,2 nm. As figuras de mérito obtidas na fase de calibração estão apresentadas na Tabela 4-2.

Tabela 4-2 - Figuras de mérito dos modelos de PLSR para a determinação da pureza de OC no modo de calibração.

	1087,7-1676,2 nm		1397,5-1676,2 nm	
	1º modelo	2º modelo	3º modelo	4º modelo
VL ^a	8	12	6	12
RMSEC ^b	0,82	0,49	1,53	0,80
RMSECV ^b	0,97	0,71	1,73	1,12
R ²	0,997	0,999	0,990	0,997
REP	1,00	0,63	1,75	0,91
Precisão	0,47	0,45	0,57	0,66

^a VL=Número de variáveis latentes. ^b valores expressos em %(volume/volume).

Uma avaliação mais detalhada dos resultados apresentados na Tabela 4-2 indica um desempenho superior para o 2º modelo para realizar a quantificação da pureza do óleo de copaíba nas amostras. Isto é devido a resultados melhores para todas as figuras de mérito do 1º, 3º e 4º modelos, principalmente no que se refere aos valores de RMSECV e REP. No entanto, observando os resultados dos parâmetros para a identificação de *outliers* (estatísticas de Hotelling T² e resíduos Q) nas amostras de validação (Figura 4-11), apenas 1º e o 3º modelos não apresentam nenhum espectro com valores acima dos limites de 95 % de confiança simultaneamente para esses dois parâmetros.

4 – Determinação da pureza do óleo de copaíba utilizando um espectrômetro portátil NIR e PLSR em amostras suspeitas de adulteração com óleo de soja

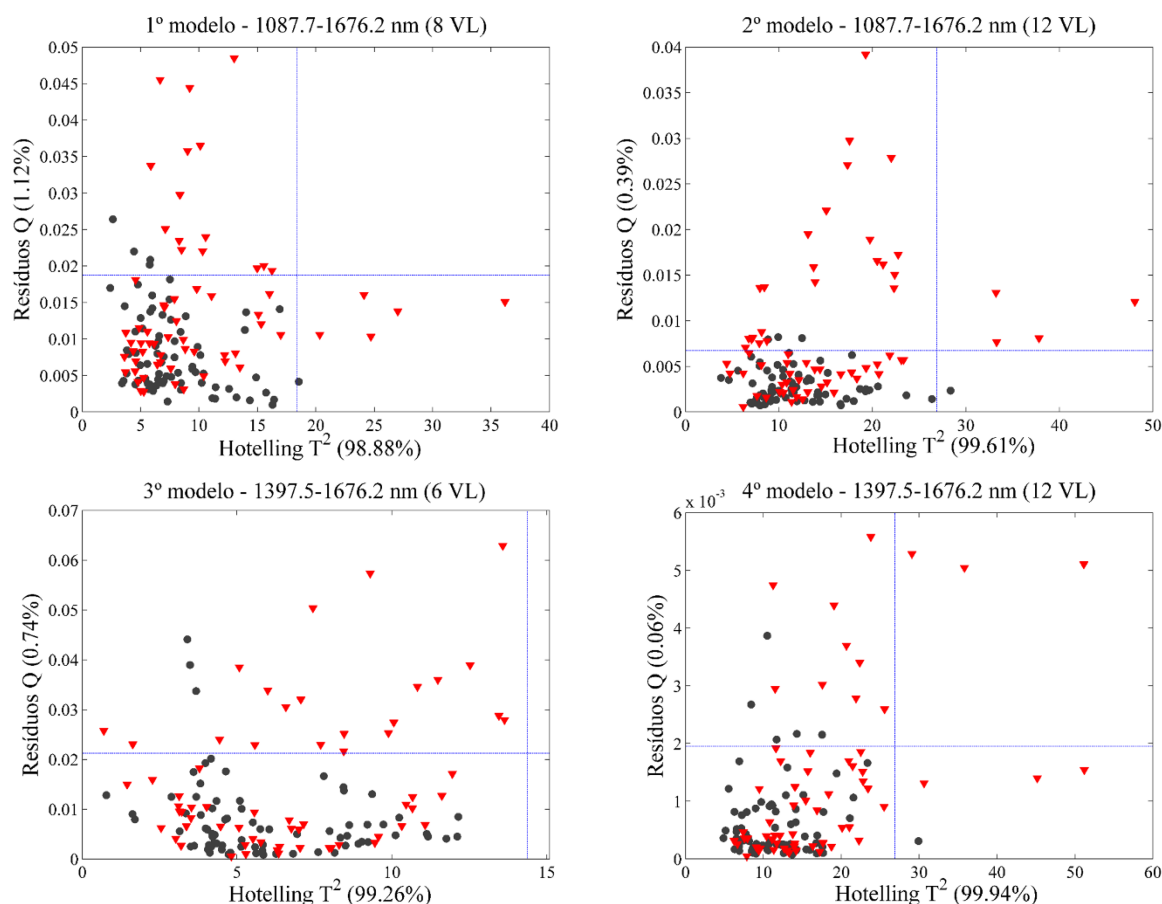


Figura 4-11 – Gráficos de T^2 de Hotelling *versus* resíduos Q, para os quatro modelos testados, (•) amostras de calibração, (▼) amostras de validação.

A grande variabilidade do óleo de copaíba e o número limitado de origens de amostras, 11 em amostras de calibração e 15 nas amostras de validação, contribuíram, sem dúvida, para o aparecimento dos valores elevados de T^2 e Q para algumas amostras. Este problema pode ser minimizado à medida que se incorpora novas amostras trazendo mais variabilidade e robustez ao modelo.

Considerando a disponibilidade limitada de amostras e a importância de um método com menor probabilidade de identificação de uma amostra autêntica como uma amostra anômala, o 1º modelo foi considerado o mais robusto e com erro de quantificação que atende às necessidades para a determinação da pureza de OC.

Considerando ainda, as figuras de mérito do conjunto de validação, apresentado na Tabela 4-3, pode-se confirmar por um teste F que não há diferença estatística nos erros de estimativa da pureza entre o primeiro e o segundo modelo ($F_{cal}=1,44$ e $F_{tab (95\%,63,63)}=1,51$), que aparentemente apresentou menor erro na fase de calibração.

Tabela 4-3 - Figuras de mérito obtidas para os modelos de PLSR para a determinação da pureza de OC no conjunto de validação.

	1087,7-1676,2 nm		1397,5-1676,2 nm	
	1º modelo	2º modelo	3º modelo	4º modelo
VL ^a	8	12	6	12
RMSEP ^b	1,51	1,26	1,88	1,15
R ²	0,991	0,994	0,985	0,994
REP	1,91	1,59	2,16	1,41
Precisão ^b	0,63	0,56	0,59	0,61
CC β ^b	0,76	0,49	1,42	0,73
Inclinação da reta ^c	1,018 \pm 0,033 ^d	1,016 \pm 0,027 ^d	0,985 \pm 0,041 ^d	1,005 \pm 0,026 ^d
Intercepto ^c	-1,30 \pm 2,90 ^d	-1,55 \pm 2,41 ^d	0,97 \pm 3,64 ^d	-0,39 \pm 2,27 ^d

^a Variáveis latentes

^b Valores expressos em %(volume/volume)

^c Parametros de ajuste da reta para as amostras de validação

^d Nível de confiança 95 %

O RMSEP indicou que o erro médio de previsão foi de 1,5%, o que pode ser considerado apropriado para uso em análises de rotina. Além disso, os valores de REP obtidos para os conjuntos de calibração e validação corroboram esse resultado, exibindo erros relativos médios inferiores a 2,0%.

Pode-se observar que os valores de confiança para a inclinação da reta e intercepto, estimados com base na abordagem EJCR (*Elliptic Joint Confidence Region*) por mínimos quadrados ordinários [83], incluem os valores esperados de 1 e 0, respectivamente, indicando que não há evidência de erros sistemáticos no modelo. A Figura 4-12 apresenta este resultado graficamente pelo EJCR para todos os 4 modelos desenvolvidos. Como o ponto (1,0) está contido em todas as elipses, a presença de erros sistemáticos pode ser descartada em todos os modelos.

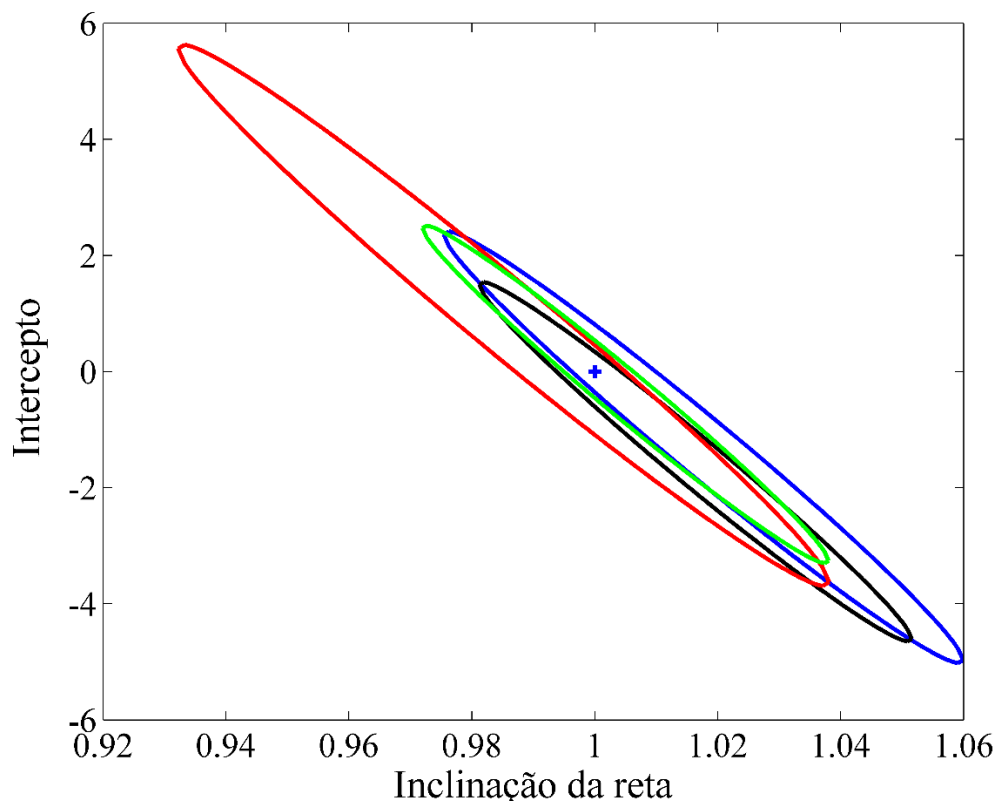


Figura 4-12 - regiões de confiança conjunta elíptica (EJCR) para os modelos PLSR desenvolvidos: (—) 1º modelo, (—) 2º modelo, (—) 3º modelo, (—) 4º modelo.

Considerando os bons resultados para RMSEP, REP, coeficiente de determinação (R^2) e ausência de viés (erro sistemático), a veracidade do modelo pode ser assumida. A precisão também foi considerada adequada, com desvios abaixo de 0,7 % (v / v).

Embora o método tenha sido desenvolvido para a determinação do conteúdo de pureza do óleo de copaíba com amostras apresentando purezas superiores a 50 % (v / v), a capacidade de detecção ($CC\beta$) também foi avaliada, mostrando que o método é capaz de detectar amostras contendo OC em concentrações iguais ou maiores que 0,8 % (v / v). Este resultado indica que, se necessário, o intervalo de

concentrações de OC do modelo poderia ser expandido para praticamente toda a gama de amostras possíveis, com uma pureza variando de 0,8 a 100,0% (v / v).

A correlação muito boa entre os valores de referência e os valores estimados é observada na Figura 4-13, que expressa graficamente os resultados observados para as figuras de mérito do 1º modelo PLSR.

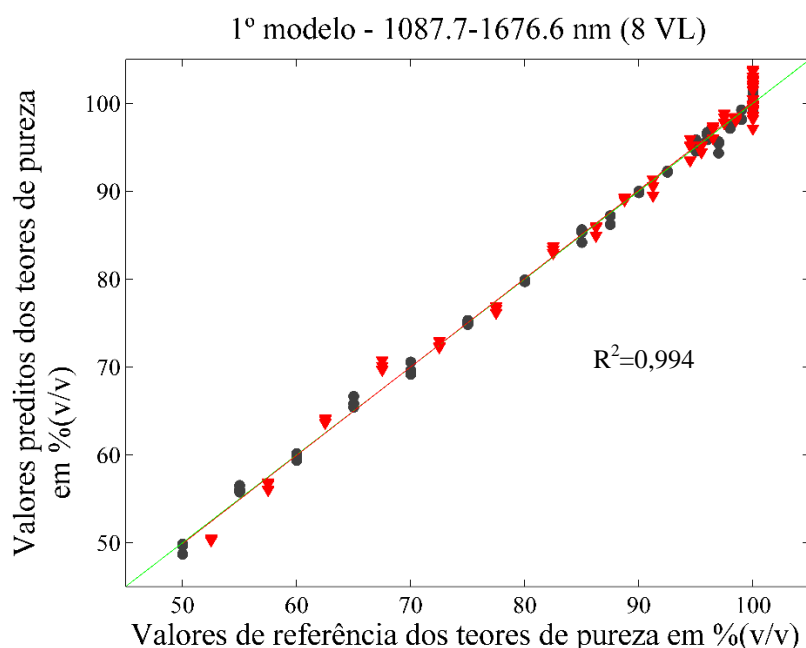


Figura 4-13 – Valores de referência versus valores estimados para as amostras de (•) calibração e (▼) validação.

A análise do gráfico dos erros absolutos *versus* os valores estimados para o primeiro modelo (Figura 4-14) mostra que apenas quatro repetições apresentam erros acima de 3% (v / v). Um dos espectros é referente à amostra com pureza de 67,5 % (v / v), cuja origem era (CO-07), enquanto que os outros três espectros pertencem a amostras de OC puro (CO-06 e CO-08) e que foram não incluídas nas amostras de calibração. Esta constatação confirma a necessidade de uma maior diversidade de amostras para o desenvolvimento do modelo. Todavia, frente ao reduzido número de amostras com um erro acima de 3 %, podemos atestar a confiabilidade do modelo

desenvolvido para a estimativa dos teores de pureza de óleos de copaíba. É importante destacar que o comportamento linear observado na Figura 4-14, mais claramente ressaltado nas amostras com 100% de pureza, se deve ao fato de existirem diversas amostras com teor de referência igual a 100% e teores estimados levemente diferentes desse valor, que quando ordenados no gráfico resultam na tendência linear observada. Contudo, esse comportamento não implica na existência de qualquer erro sistemático ou tendência não linear no modelo.

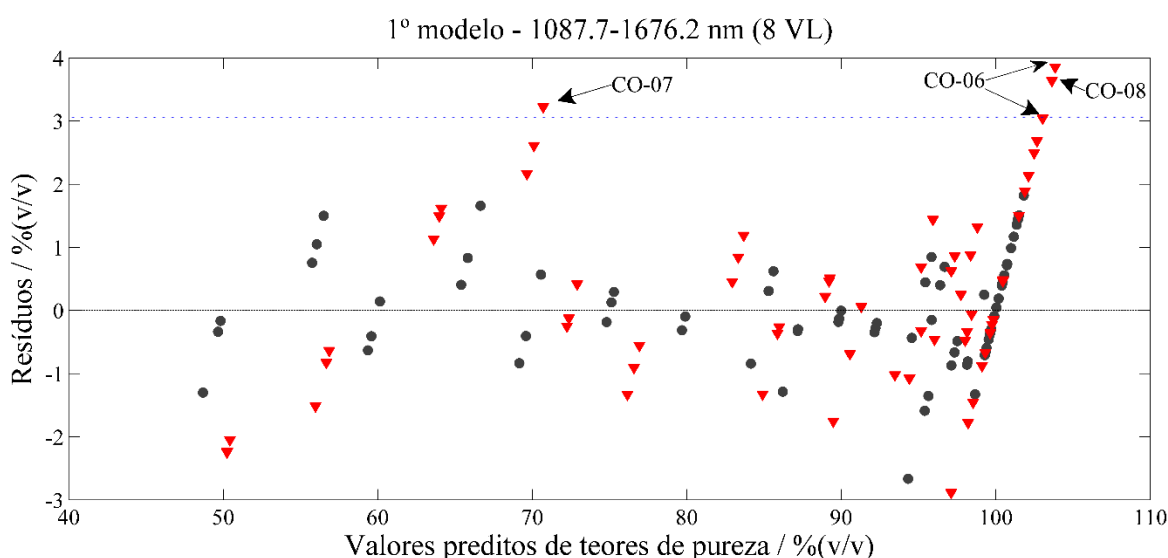


Figura 4-14 – Dispersão de resíduos (erros absolutos) *versus* valores estimados de teores de pureza, das amostras de (•) calibração e (▼) validação.

Outro teste de desempenho do método foi a análise de amostras de óleos de copaíba autênticos adulterados com óleo de soja usado em fritura (CO-FS), bem como a amostra CO-17 identificada como adulterada pelo método CG-EM. A determinação foi realizada em triplicata e os resultados médios são apresentados na Tabela 4-4. As amostras de CO-FS apresentaram valores com boa concordância em relação aos valores de referência e baixos RSD, indicando que o método foi robusto o suficiente para identificar a pureza dessas amostras. No que se refere a amostra CO-17, o método revelou uma alta pureza, concordando com os resultados obtidos com o método cromatográfico para esta amostra. No entanto, esta amostra

apresentou valores Q de resíduos acima de 0,4 e T^2 de valores de Hotelling acima de 100, o que indica que esta amostra é um *outlier* em comparação com as amostras de calibração, reforçando a hipótese de que é improvável que o adulterante/contaminante seja óleo de soja. Além disso, a identificação dessa amostra como anômala mostra que amostras adulteradas com outros compostos / matérias-primas podem ser identificadas por este método, o que amplia sua aplicabilidade para fins de triagem.

Tabela 4-4 – Resultados das estimativas de pureza, por amostras externas de óleos de copaíba adulterados e testados no 1º modelo.

Amostras	Referência ^a	Estimado ^a	DP ^b	RSD ^c
CO-FS ^d	94,00	94,31	0,50	0,53
	87,00	87,19	0,77	0,88
	71,00	71,02	0,17	0,24
	67,00	67,50	0,68	1,01
	59,00	59,47	0,03	0,05
	56,00	56,59	0,89	1,57
CO-17	97,93*	99,01	0,55	0,56

^a valores estimados pelo 1º modelo PLSR e expressos em %(v / v).

^b desvio padrão (DP) expresso em %(v / v).

^c desvio padrão relativo (RSD) expresso em %.

^d amostras autênticas de óleo de copaíba adulteradas com óleo de soja usado em fritura (CO-FS)

* valor estimado por CG-EM

4.3 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o método proposto expressaram a confiabilidade do uso de um espectrômetro NIR portátil associado com o PLSR para a determinação do teor de pureza dos óleos da espécie *Copaifera langsdorffii* Desf. adulterados com óleo de soja.

As adulterações realizadas com óleo de soja novo, bem como com o óleo de soja usado em frituras foram identificadas corretamente, provando que o presente método tem potencial para ser usado para fins de controle de produção por cooperativas de extrativistas, assim como pelos órgãos de controle que necessitem desse tipo de análise.

A análise pelo método desenvolvido é rápida, além de não ser necessária nenhuma preparação de amostra e, conseqüentemente não é gerado nenhum resíduo químico no processo. Portanto, o método proposto também pode ser considerado ecologicamente amigável.

CAPÍTULO 5

APLICAÇÃO DE ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) NA IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES EM ÓLEO DE COPAÍBA SUBMETIDO AO ENVELHECIMENTO FORÇADO POR ESTRESSE TÉRMICO

5 APLICAÇÃO DE ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) NA IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES EM ÓLEO DE COPAÍBA SUBMETIDO AO ENVELHECIMENTO FORÇADO POR ESTRESSE TÉRMICO

As espécies do gênero *Copaifera* e que no Brasil têm como representantes a *Copaifera langsdorffii.*, *C. multijuga*, *C. duckei*, *C. reticulata*, *C. officinalis*, dentre outras, são produtoras do óleo de copaíba, cuja composição é uma mistura complexa de sesquiterpenos e diterpenos [6]. A grande variabilidade de composição desses óleos não se limitam apenas à diversidade de espécies produtoras desse produto florestal não madeireiro (PFNM), pois as condições climáticas, localização geográfica, idade das árvores, assim como a época de colheita são fatores que influenciam nessa variação [1, 4, 20, 23, 108]. Tal variação também pode ser observada dentro de uma mesma espécie assim como em uma mesma árvore [25].

Além dos fatores citados, o tempo e condições de estocagem, desde sua colheita na floresta até a sua efetiva comercialização, são fatores que podem contribuir na alteração da composição desse PFNM, seja por evaporação de compostos voláteis, assim como por processos oxidativos, ou pela degradação de outros componentes do óleo. Após uma busca minuciosa na literatura, foi encontrado apenas um estudo de estabilidade envolvendo a porção volátil do óleo de copaíba [109]..

A análise de componentes principais (PCA) tem sido empregada em variadas aplicações de controle de qualidade, sendo capaz de identificar padrões em amostras quanto à sua origem [110, 111], tipos de adulterantes [112], variabilidade de composição de café, tabaco, óleos comestíveis [54, 113, 114], identificação de processos de envelhecimento de óleo de soja, bebidas e queijo [39, 115, 116], assim como outras aplicações.

Estudos de estabilidade de diversos produtos podem ser conduzidos através de protocolos de envelhecimento acelerado, cujo o tempo de exposição do produto

às condições controladas de umidade, temperatura e luminosidade, etc, pode variar entre 24 a 96 horas em ensaios com sementes [117, 118], podendo chegar a 180 dias, no caso de alguns alimentos industrializados [119]. A ANVISA disponibiliza guias com diretrizes propostas para a condução de estudos acelerados de estabilidade para cosméticos, e fármacos, onde o teste acelerado é geralmente utilizado no desenvolvimento de produtos, para a verificação da estabilidade de princípios ativos, sendo conduzido por até seis meses [120, 121].

No entanto, outros autores têm utilizado tempos e condições de temperatura diversos, no intuito de identificar alterações de composição de produtos naturais e cosméticos. Choi e Sawamura (2002), estudaram os efeitos da estocagem em óleo essencial de *Citrus tamurana* por 9 semanas às temperaturas de -21, 5, 20 e 30 °C [122]. Ramos (2006), investigou a estabilidade de microcápsulas com fração volátil de óleo de copaíba, por um período de 60 dias, com temperaturas de 25 e 40 °C e umidade relativa de 50% [123]. Pedro (2009), avaliou a estabilidade de loção corporal cosmética em ambientes com 8, 25, 35 e 45 °C, em amostragens semanais por 10 semanas consecutivas [124].

Diante do apresentado, neste capítulo da tese, foi realizado um estudo de envelhecimento acelerado do óleo de copaíba durante 10 semanas⁷ em diferentes temperaturas para avaliar sua estabilidade frente a esse estresse, sendo as possíveis mudanças acompanhadas pelas técnicas de CG-EM e NIRS. Dada a complexidade do óleo de copaíba e a sua variedade de compostos sesquiterpênicos e diterpênicos, será utilizada a análise de componentes principais para a análise exploratória dos dados a fim de identificar as amostras que sofreram alterações durante os tratamentos térmicos.

⁷ A escolha deste tempo para os ensaios, foi definido baseado nos parâmetros aproximados utilizados por Pedro (2009) e considerando a quantidade disponível de amostras para a realização de ensaios semanais em triplicata.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Equipamentos, vidrarias e acessórios

- CG-EM: Cromatógrafo gasoso da marca Agilent Technologies modelo 7890A GC System, acoplado a um detector de espectro de massas da mesma marca, modelo 5975C inert XL MSD e amostrador automático GC Sampler 120. Microcomputador com software ChemStation para controle do sistema de cromatografia;
- Gás Hélio, pureza 99,999%;
- Gás Nitrogênio, pureza 99,999%;
- Espectrômetro portátil MicroNir 1700, VIAVI Solutions;
- Cubetas de Quartzo de 10mm de caminho óptico, capacidade para 3,5 mL;
- Seringa de vidro com capacidade de 10 μ L, marca Hamilton;
- Coluna capilar HP5-ms 5% fenil 95% dimetilsiloxano (30m x 0.25mm de diâmetro interno x 0.25 μ m de filme);
- Vials de vidro âmbar capacidade de 1,5mL, com tampa e lacre e septo em Teflon®;
- Vials insert de vidro 250 μ L
- Balança BEL modelo Umark 210A, Capacidade máxima de 210 g, resolução 0,1 mg;
- Buretas em vidro com capacidade para 100 mL;
- Frascos erlenmeyer com capacidade para 150 mL
- Picnômetros em vidro com capacidade para 5 mL;

- Balões volumétricos de 10 mL em vidro;
- Tubos de ensaio de vidro com tampa, capacidade 70 mL;
- Balões volumétricos de 100 mL em plástico;
- Micropipeta automática LABMATE, capacidade 20 a 200 μL , marca HT high tech lab;
- Pipeta automática PhysioCare concept, capacidade 1 a 10 mL, marca EPPENDORF;
- Ponteiras para pipetas e micropipetas;
- Pipeta de Pasteur em plástico, capacidade de 3 mL;

5.1.2 Solventes e reagentes

- Metanol, pureza $\geq 99,9\%$ adequado para HPLC, marca TEDIA;
- Etanol, pureza $\geq 99,8\%$, marca Dinâmica
- Água deionizada ultrapura 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$
- Hidróxido de Trimetilsulfônio $\sim 0,25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em metanol, Marca Sigma Aldrich
- Carbonato de sódio anidro ACS $\geq 99,5\%$, marca Sigma Aldrich
- Hidróxido de potássio, PA $\geq 85\%$, marca Synth
- Ácido clorídrico PA 37%, marca Vetec
- Fenolftaleína PA, marca Synth

5.1.3 Escolha e preparo das amostras

Visando obter uma amostra com maior representatividade da composição do óleo de copaíba para as amostras submetidas ao estudo, foi preparado aproximadamente 1,9 litros de uma mistura de óleos de *Copaifera langsdorffii* Desf., das amostras autênticas CO-10 (~180 mL), CO-12 (~50 mL), CO-13 (~70 mL), CO-14 (~800 mL), CO-15 (~800 mL), cujas origens já foram indicadas no capítulo 4

Para isso, cento e vinte frascos de vidro âmbar com capacidade para 30 mL e tampa plástica, foram preenchidos com 15 mL da mistura preparada, sendo que dentre esses, vinte e sete frascos foram preenchidos sob atmosfera inerte de gás nitrogênio a uma pureza de 99,999% conforme ilustrado na Figura 5-1.

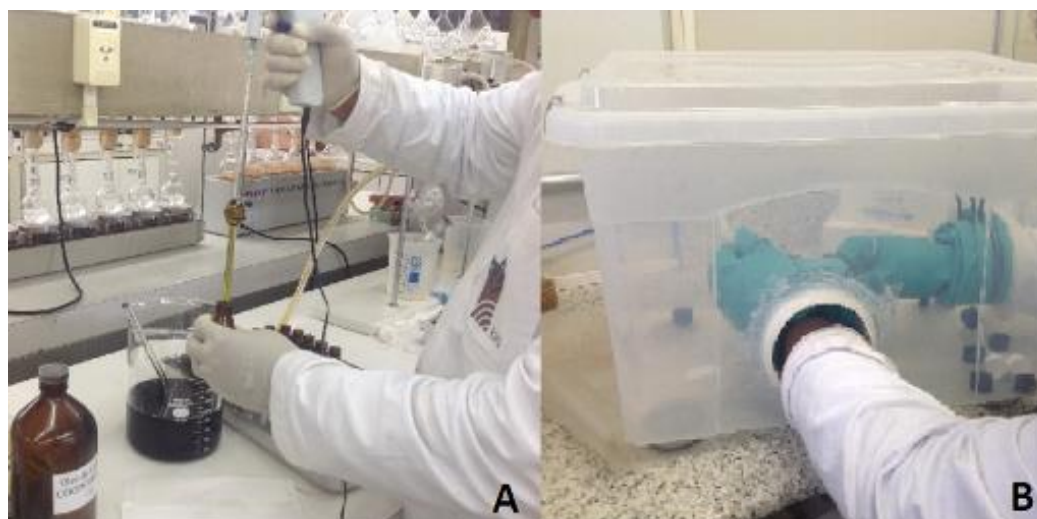


Figura 5-1 - Envase das amostras de óleo de copaíba para teste de envelhecimento acelerado. **A:** envase de amostras, **B:** Lacração dos frascos em atmosfera inerte.

As amostras foram separadas em quatro grupos, sendo que o primeiro era composto de apenas três amostras e os outros três grupos de 39 frascos cada e acomodadas em bandejas de alumínio, onde em cada um desses três últimos grupos haviam nove amostras envazadas sob atmosfera inerte.

As amostras do primeiro grupo serviram como referência das condições iniciais do óleo estocado. No segundo grupo as amostras foram colocadas em geladeira a

uma temperatura de $5,0 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$. No terceiro grupo as amostras foram colocadas em sala climatizada com temperatura controlada a $23,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. O quarto grupo de amostras foram estocadas em uma estufa a uma temperatura de $55 \pm 2^{\circ}\text{C}$. a temperatura da estufa, foi estabelecida para simular as condições de temperatura que amostras de óleo de copaíba são submetidas quando expostas em feiras, sob a incidência de sol direto. As amostras foram devidamente identificadas conforme descrito a seguir e apresentado no esquema de organização das amostras em bandejas de alumínio na Figura 5-2:

- Grupo 1: Z1 a Z3;
- Grupo 2: G1 a G30 e GN1 a GN9 (para amostras em atmosfera de Nitrogênio);
- Grupo 3: C1 a C30 e CN1 a CN9 (para amostras em atmosfera de Nitrogênio);
- Grupo 4: E1 a E30 e EN1 a EN9 (para amostras em atmosfera de Nitrogênio).

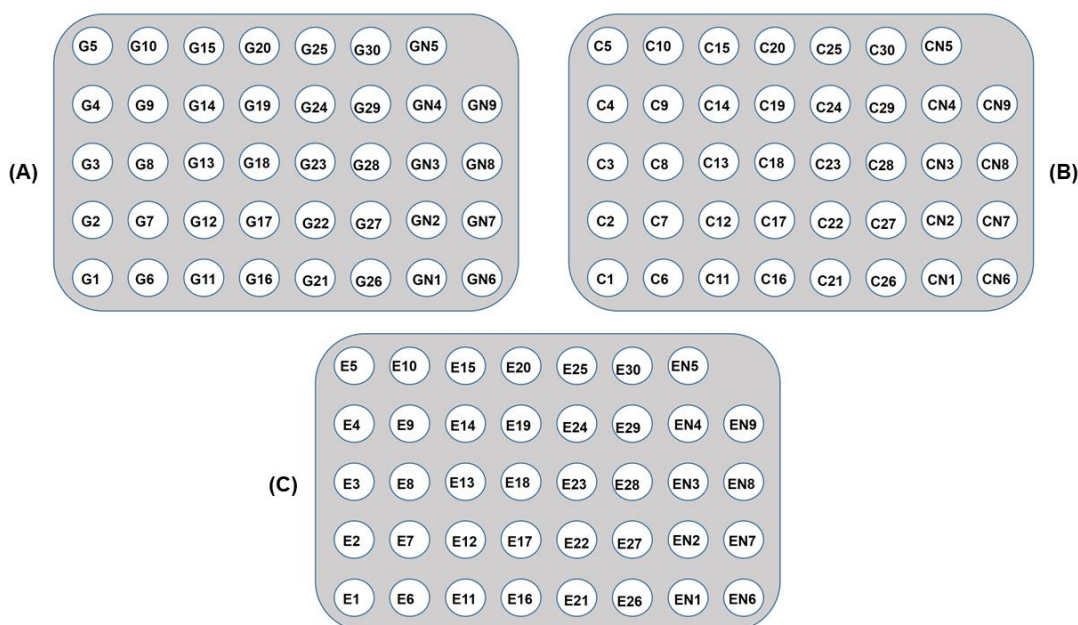


Figura 5-2 - Esquema de organização das amostras de óleo de copaíba submetidas a estresse térmico, (A) Grupo 2, (B) Grupo 3 e (C) Grupo 4.

5.1.4 Amostragem

O primeiro grupo, como já mencionado, foram amostras de controle. Nos outros três grupos, a cada semana foram sorteadas três amostras de cada grupo. Nas semanas 5, 8 e 10, além das amostras de envase normal sorteadas, foram sorteadas três outras amostras que foram envazadas em atmosfera inerte. A ordem de amostragem estabelecida por sorteio a cada semana está descrita no Anexo V.

5.1.5 Ensaios Físico-Químicos

No intuito de acompanhar quaisquer alterações nos parâmetros físico-químicos das amostras, a cada amostragem semanal, as mesmas foram submetidas à análise dos seguintes parâmetros:

- **Índice de acidez:**

Este índice expressa a quantidade necessária de hidróxido de potássio (KOH) em miligramas para neutralizar 1 grama de óleo. O ensaio com adaptações foi baseado na metodologia sugerida pela Farmacopeia Brasileira, 5ª Edição [125].

Este parâmetro teve como objetivo acompanhar indiretamente alterações no teor de ácidos diterpênicos das amostras devido às condições de armazenamento.

Foram pesados em erlenmeyers de 150 mL, alíquotas de 2 g das amostras de óleo de copaíba. A essas amostras foram adicionados 10 mL de uma mistura de etanol e éter etílico (1:1 volume/volume) e sete gotas de fenolftaleína em solução alcoólica 1 %. A solução foi titulada com solução de KOH a 0,1 mol.L⁻¹ até aparecimento de coloração rosa pálido persistente. O índice de acidez (IA) foi obtido pela Equação 5-1.

$$IA = \frac{5,610 \cdot n}{m}$$

Equação 5-1

Onde IA é o índice de acidez calculado através de uma reação de neutralização, expresso em mg de KOH necessário para neutralizar 1 grama de

óleo, “n” é o volume em mililitros gasto de KOH a 0,1M, “m” é a massa de óleo utilizada. A constante 5,61 é referente à quantidade de miligramas de KOH por mililitro de titulante a uma concentração de 0,1 mol.L⁻¹.

- **Densidade:**

A densidade relativa foi calculada usando a razão da massa obtida pelo volume do picnômetro, conforme estabelece a Farmacopeia Brasileira [125].

- **Índice de refração:**

O índice de refração foi medido em um refratômetro analógico de bancada do tipo Abbé, em sala climatizada a 20 °C. Foi utilizada uma gota de cada amostra e medidas em triplicata.

- **Viscosidade cinemática:**

É a expressão numérica da resistência que sofre uma camada líquido ao se movimentar em relação a uma camada vizinha. A viscosidade de uma substância líquida vem da interação entre suas moléculas, onde o aumento de temperatura aumenta a energia cinética dessas moléculas diminuindo a viscosidade do líquido em questão. A unidade de medida utilizada é o Centistokes (cSt) que equivale a 1 mm².s⁻¹ [125, 126].

Para a determinação da viscosidade foi inserido um volume fixo da amostra em um viscosímetro capilar do tipo Cannon-Fenske calibrado, em banho térmico de 40 °C e foi medido o tempo de escoamento do óleo e multiplicado pela constante de calibração do viscosímetro a 40 °C.

5.1.6 Aquisição dos espectros no infravermelho próximo das amostras

Os espectros de infravermelho próximo (NIR, do inglês Near Infrared), foram coletados pelo princípio da transfectância em espectrofotômetro portátil MicroNir

1700, com o auxílio de adaptador para acondicionamento das amostras em cubetas de quartzo. O procedimento de aquisição foi idêntico ao utilizado no capítulo 4 desta tese.

Ao final da coleta de todos os espectros, estes foram organizados em uma matriz com dimensão de 120 linhas por 125 colunas, onde nas linhas estão as amostras na ordem dos sorteios e nas colunas os comprimentos de onda.

5.1.7 Análise das amostras no Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas - CG-EM

Após as 10 semanas todas as 120 amostras foram novamente sorteadas para a realização das caracterizações das amostras em equipamento de cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

O procedimento mais comum encontrado no estudo de caracterização do óleo de copaíba via cromatografia gasosa, é submeter o óleo à reação de derivatização com diazometano, para que os ácidos diterpenos sejam convertidos em seus respectivos ésteres metílicos, permitindo a volatização dos mesmos e a detecção por este método analítico [1, 4, 9, 23, 27]. Apesar da reação ser rápida e eficiente, a natureza tóxica e explosiva desse derivatizante [127, 128], além da grande dificuldade de importação deste reagente, levou à busca de um outro derivatizante de fácil aquisição e manipulação. Considerando que o hidróxido de trimetilsulfônio – (TMSH, do inglês - *Trimethylsulfonium Hydroxide*), foi utilizado com êxito na caracterização do óleo de copaíba assim como outras resinas de uma coleção farmacêutica do século XVIII e em objetos de arte dos séculos XVI e XVII [35, 129], este derivatizante foi escolhido por uma questão de segurança, além deste reagente apresentar uma versatilidade importante na análise do óleo de copaíba, sendo possível realizar em apenas uma etapa a esterificação de ácidos livres na amostra, assim como a transesterificação de triacilgliceróis [130, 131, 132].

5.1.7.1 Derivatização das amostras

O protocolo de transesterificação utilizado foi baseado no método utilizado por Steigenberger (2013), com adaptações [133].

Foram pesados 50 mg de OC de cada amostra em balões volumétricos de 10,00 mL, os balões foram completados com metanol e agitados até a dissolução das amostras. A solução foi deixada a 40 °C por 30 minutos, em seguida foi centrifugada a 2500 rpm.

Posteriormente foi transferida uma alíquota de 200 µL do sobrenadante para um *vial* e adicionados 60 µL de TMSH com leve agitação manual e deixado por um período de reação de 30 minutos antes da injeção no GC-EM.

5.1.7.2 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso Agilent 7890A, acoplado a espectrômetro de massas Agilent 5975C. A injeção foi realizada no modo Split com divisão de 20:1 e fluxo de 14 mL.min⁻¹. A temperatura de injeção e da fonte de ionização foram de 270 °C e 230°C, respectivamente. O intervalo de varredura de massas foi realizado no intervalo de 50 a 600 m/z⁸, com ionização por impacto de elétrons a 70 eV.

Foi utilizada uma coluna capilar HP5-ms (5 % fenil–95 % metilpolisiloxano) da Agilent com as seguintes dimensões: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. O gás carreador utilizado foi o Hélio 5.0 (99,999% de pureza). As temperaturas de trabalho utilizadas para cada corrida cromatográfica foram: Isoterma 110 °C (2 min), rampa de aquecimento até 130°C (3,0 °C.min⁻¹), rampa de aquecimento até 290°C (8,0 °C.min⁻¹), isoterma de 8 minutos, rampa de aquecimento até 300 °C (8,5 °C.min⁻¹), isoterma de 6 minutos, totalizando 43,181 minutos de corrida.

⁸ m/z: razão massa/carga dos fragmentos de massa.

As amostras foram injetadas por amostrador/injetor automático CTC GC Sampler 120 Agilent. O volume injetado de cada amostra foi de 2 μL , com velocidade de injeção de 50 $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$. Os compostos foram identificados por comparação dos seus respectivos espectros de massa com o banco de dados do *National Institute of Standards and Technology* – NIST, e a quantificação de cada composto foi realizada por normalização pela área de cada pico em relação à área total dos picos, pelo software ChemStation da Agilent.

5.1.8 Desenvolvimento dos modelos em PCA

Para o desenvolvimento dos modelos de PCA foram utilizadas três bases de dados. A primeira foi composta pelos 53 compostos mais abundantes detectados pelo software Chemstation (Agilent), a qual foi organizada em uma matriz de dados **X1**, onde cada linha dessa matriz é a média das amostras de cada grupo semanal e nas colunas os valores de área normalizados para 100% dos 53 compostos, gerando uma matriz com 40 linhas e 53 colunas. A Figura 5-3 é a representação gráfica desta matriz.

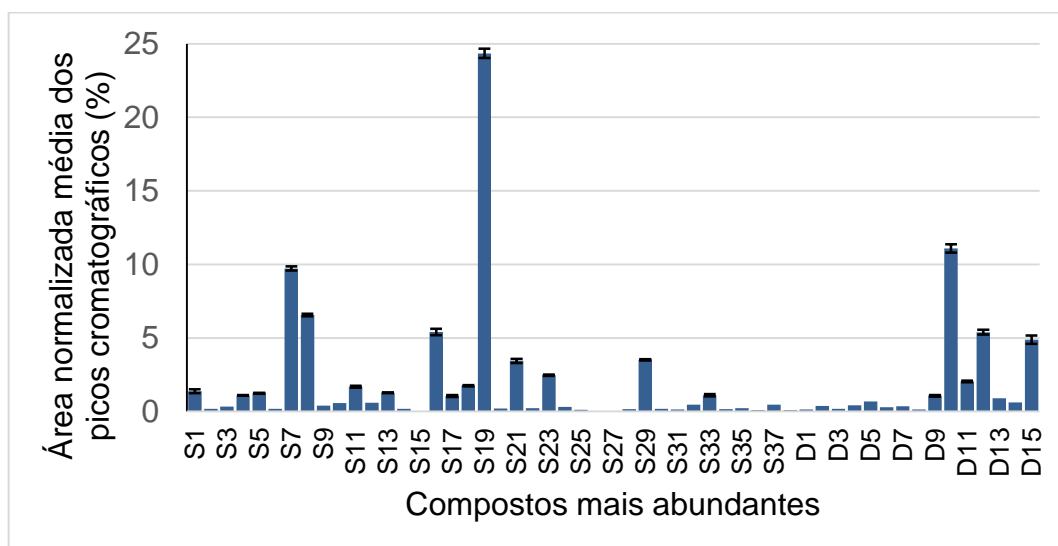


Figura 5-3 - Representação gráfica das áreas médias normalizadas dos picos dos 53 compostos mais abundantes das amostras semanais de óleo de copaíba submetidas à estresse térmico. As áreas normalizadas maiores que 1 % exibem, complementarmente, barras de erros referentes aos respectivos desvios padrão.

A identificação dos 53 compostos detectados pelo Chemstation e identificados pelo banco de dados NIST, estão relacionados na Tabela 5-1.

Tabela 5-1 - Relação dos 53 compostos mais abundantes detectados nas amostras de óleo de copaíba submetidas à estresse térmico.

Código	Composto	Código	Composto	Código	Composto
S1	δ -Elemeno	S19	β -Bisaboleno	S37	α -Bisabolol
S2	α -Cubebeno	S20	γ -Cadineno	S38	Cedr-8-en-13-ol
S3	α -Ylangeno	S21	β -Sesquifellandreno	D1	Pimara-8,15-dieno
S4	α -Copaene	S22	trans- γ -Bisaboleno	D2	16-Caureno
S5	β -Elemeno	S23	cis- α -bisaboleno	D3	Ácido Anticopálico*
S6	N.I.	S24	Hidrato de cis-sesquisabineno	D4	N.I.
S7	β -Cariofileno	S25	Germacreno B	D5	N.I.
S8	α -Bergamoteno	S26	N.I.	D6	N.I.
S9	N.I.	S27	N.I.	D7	N.I.
S10	Aristoleno	S28	N.I.	D8	N.I.
S11	β -Farneseno	S29	Ledol	D9	N.I.
S12	N.I.	S30	γ -Gurjuneno	D10	Ácido Caurênico*
S13	α -Humuleno	S31	Óxido de Ledeno	D11	Ácido Copálico*
S14	γ -Muuroleno	S32	4-epi-Cubedol	D12	N.I.
S15	α -Curcumeno	S33	Espatuleno	D13	N.I.
S16	Germacreno-D	S34	Cadinol T	D14	N.I.
S17	Zingibereno	S35	N.I.	D15	Ácido Hardwickiico*
S18	trans- α -Bisaboleno	S36	Óxido de Cariofileno		

Códigos iniciados pelas letras “S” e “D” classificam os compostos como sesquiterpênicos e diterpênicos respectivamente; “N.I.” = compostos não identificados pelo banco de dados NIST; * ácido detectado como éster metílico.

Para a segunda base foram utilizados os cromatogramas das amostras no intervalo de 9,1050 a 32,4837, onde, assim como na primeira matriz, as linhas são representadas pelas médias das amostras de cada grupo semanal, que foram organizados na matriz **X2** com 40 linhas e 1921 colunas, conforme ilustra a Figura 5-4.

5 –Aplicação de análise de componentes principais (PCA) na identificação de alterações em óleo de copaíba submetido ao envelhecimento forçado por estresse térmico

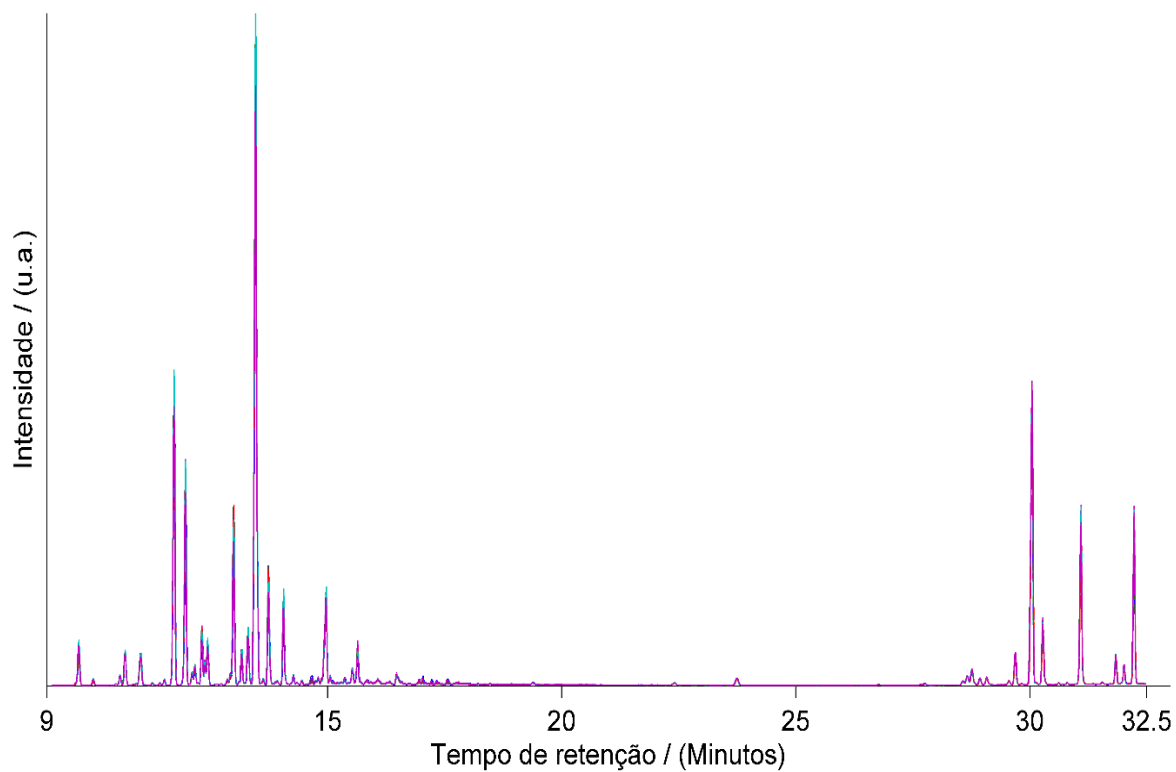


Figura 5-4 – Cromatogramas das médias das amostras semanais de óleo de copaíba por ambiente.

Na terceira base de dados foram utilizados os espectros NIR no intervalo de 908,1 a 1676,2 nm, gerando a matriz **X3** com 40 linhas e 125 colunas, ilustrada na Figura 5-5.

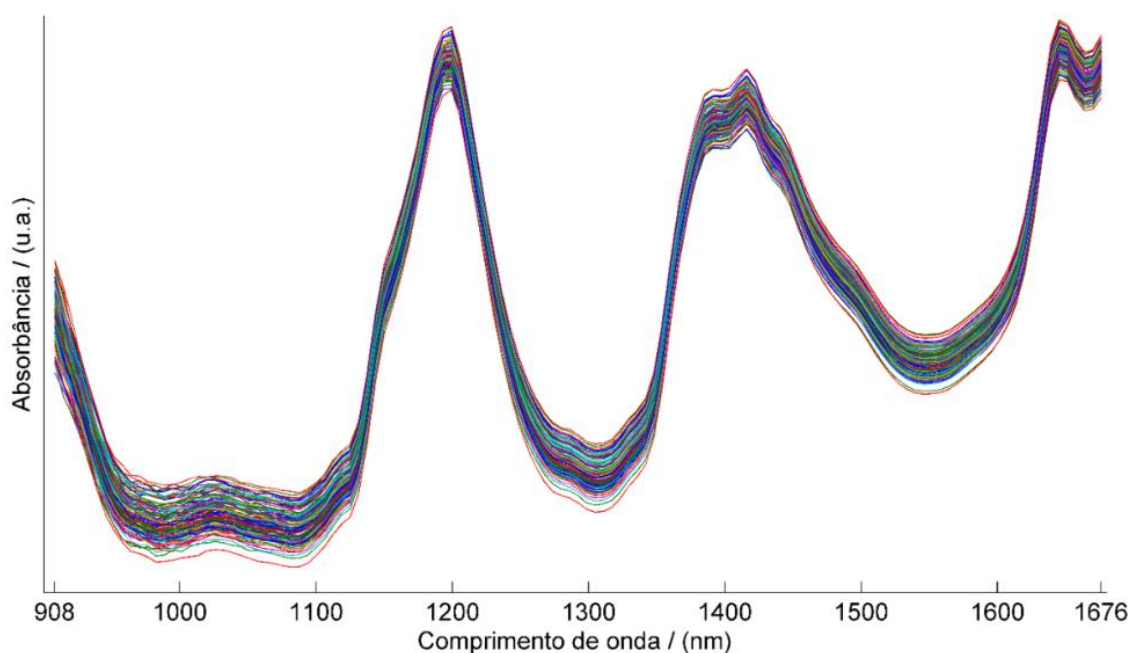


Figura 5-5 - Espectros NIR das médias das amostras semanais de óleo de copaíba por ambiente.

Essas matrizes de dados foram submetidas a Análise de Componentes Principais (PCA) para a identificação de alterações nas amostras submetidas à estresse térmico.

5.1.8.1 Pré-processamentos dos dados

Na matriz **X1** que continha como variáveis os valores de área normalizados para 100% dos 53 compostos, foram testados os pré-processamentos centragem na média e autoescalamamento.

Na matriz **X2** os cromatogramas, por apresentarem desvios de tempo de retenção entre as corridas, foram submetidos a um alinhamento nos tempos de retenção dos picos pelo algoritmo *Icoshift* [53]. Adicionalmente os pré-processamentos, Normalização por área total, Normalização pelo pico mais intenso, centragem na média e autoescalamamento foram testados no desenvolvimento da PCA.

Na matriz **X3** foram testados os pré-processamentos, variável normal padronizada (SNV), 1ª derivada e 2ª derivada pelo algoritmo Savitzky–Golay e centragem na média.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Caracterização físico-química dos óleos submetidos ao estresse térmico

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com comparação das médias pelo teste de Tukey com 99% de nível de confiança, para cada resultado das caracterizações físico-químicas das amostras submetidas ao tratamento de estresse térmico.

5.2.1.1 Índice de Refração

Conforme análise de variância (Tabela 5-2), uma vez que o *p*-valor é maior que o nível de significância de 0,01, este parâmetro não apresentou variação significativa a nível de 99% de confiança. Os valores médios de índice de refração das amostras ficaram distribuídos no intervalo entre 1,506 e 1,508 a 20 °C.

Tabela 5-2 – Análise de variância (ANOVA) do Índice de Refração a 99% de nível de confiança.

Fonte	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	<i>p</i> -valor
Modelo	6	3,160E-06	5,267E-07	1,751	0,140
Erro	33	9,926E-06	3,008E-07		
Total corrigido	39	1,309E-05			

5.2.1.2 Densidade

A análise de variância da densidade (Tabela 5-3) indicou haver diferença significativa a 99% de nível de confiança (*p*-valor<<0,01) entre os resultados obtidos. As amostras puderam ser classificadas em quatro grupos distintos, conforme mostra

5 –Aplicação de análise de componentes principais (PCA) na identificação de alterações em óleo de copaíba submetido ao envelhecimento forçado por estresse térmico

a Tabela 5-4, onde apenas as amostras de referência não foram semelhantes a outro grupo. É possível concluir também que a temperatura de acondicionamento contribui para a semelhança entre as médias para este parâmetro, com exceção das amostras acondicionadas em atmosfera inerte da estufa. Não há neste momento uma explicação para esse comportamento para a densidade.

Tabela 5-3 - Análise de variância (ANOVA) da Densidade

Fonte	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	p-valor
Modelo	6	1,543E-04	2,572E-05	40,369	8,053E-14
Erro	33	2,103E-05	6,372E-07		
Total corrigido	39	1,754E-04			

Tabela 5-4 - Resumo dos valores da Densidade com comparação de médias (teste de Tukey)

Categoria	Média*	Erro padrão*	Limite inferior*	Limite superior*
Câmara Climatizada	0.941 a	2,524E-04	0,941	0,942
Câmara Climatizada (N ₂)	0.941 a	4,609E-04	0,940	0,942
Estufa (N ₂)	0.940 ab	4,609E-04	0,939	0,942
Estufa	0.939 b	2,524E-04	0,938	0,940
Geladeira	0.937 c	2,524E-04	0,936	0,938
Geladeira (N ₂)	0.937 c	4,609E-04	0,936	0,938
Referência	0.933 d	7,982E-04	0,931	0,935

Médias seguidas com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 99% de nível de confiança; (N₂) – Amostras envazadas em atmosfera de nitrogênio; * Valores expressos em g / mL.

5.2.1.3 Índice de Acidez

A análise de variância do índice de acidez (Tabela 5-5) indicou não haver diferença significativa a 99% de confiança para as médias desse parâmetro (p -valor > 0,01). A

5 –Aplicação de análise de componentes principais (PCA) na identificação de alterações em óleo de copaíba submetido ao envelhecimento forçado por estresse térmico

Tabela 5-6 mostra que os valores médios desse parâmetro ficaram distribuídos entre 27,776 a 30,603 mg de KOH / g de óleo. Tal resultado indica que não houve alteração nos teores dos ácidos diterpênicos das amostras analisadas, indicando haver uma grande estabilidade desses compostos no óleo nas condições testadas.

Tabela 5-5 - Análise de variância (ANOVA) do Índice de Acidez.

Fonte	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	p-valor
Modelo	6	7,448	1,241	0,497	0,806
Erro	33	82,494	2,500		
Total corrigido	39	89,943			

Tabela 5-6- Resumo dos resultados obtidos para índices de acidez.

Categoria	Média*	Erro padrão*	Limite inferior*	Limite superior*
Referência	30,603 a	1,581	26,282	34,925
Geladeira	28,363 a	0,500	26,996	29,730
Estufa	28,233 a	0,500	26,866	29,600
Geladeira (N ₂)	28,210 a	0,913	25,715	30,705
Câmara Climatizada	27,949 a	0,500	26,583	29,316
Estufa (N ₂)	27,924 a	0,913	25,429	30,419
Câmara Climatizada (N ₂)	27,776 a	0,913	25,281	30,271

(N₂) – Amostras envazadas em atmosfera de nitrogênio; * Valores expressos em mg de KOH/g de óleo.

5.2.1.4 Viscosidade

A análise de variância das amostras para o parâmetro viscosidade apresentou um p-valor abaixo de 0,01 (Tabela 5-7), indicando haver diferença significativa entre os tratamentos de estocagem a diferentes temperaturas. O teste de Tukey (Tabela 5-8) mostra a formação de 2 grupos distintos, o primeiro composto pelas amostras dos ambientes de estufa, outro composto pelo ambiente de estufa em atmosfera normal e os demais ambientes (câmara climatizada, geladeira e referência).

5 –Aplicação de análise de componentes principais (PCA) na identificação de alterações em óleo de copaíba submetido ao envelhecimento forçado por estresse térmico

Tabela 5-7 - Análise de variância (ANOVA) dos resultados de Viscosidade.

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	p-valor
Modelo	6	10,206	1,701	8,184	1,839E-05
Erro	33	6,859	0,208		
Total corrigido	39	17,065			

Tabela 5-8 - Resumo dos valores da Viscosidade com comparação de médias pelo teste de Tukey.

Categoria	Média*	Erro padrão*	Limite inferior*	Limite superior*
Estufa (N ₂)	13,196 a	0,263	12,476	13,915
Estufa	12,452 ab	0,144	12,058	12,846
Câmara Climatizada	11,687 b	0,144	11,293	12,082
Câmara Climatizada (N ₂)	11,645 b	0,263	10,926	12,365
Geladeira	11,620 b	0,144	11,226	12,015
Geladeira (N ₂)	11,465 b	0,263	10,745	12,184
Referência	11,433 b	0,456	10,187	12,679

Médias seguidas com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 99% de nível de confiança; (N₂) – Amostras envazadas em atmosfera de nitrogênio; * Valores expressos em cSt.

Dentre os parâmetros físico-químicos analisados, a viscosidade foi a que mais indicou a influência da estocagem a maiores temperaturas. Diversos autores relatam que a estocagem a temperaturas mais elevadas, favorece a oxidação de compostos terpênicos [109, 134, 135, 136], o que pode levar a polimerização desses compostos aumentando a viscosidade [134, 135, 137, 138].

5.2.2 Caracterização das amostras por cromatografia gasosa com detecção de espectros de massas – CG-EM

Na análise cromatográfica foram detectados pelo CG-EM os 53 compostos mais abundantes, onde 16 deles não puderam ser identificados pelo banco de dados

5 –Aplicação de análise de componentes principais (PCA) na identificação de alterações em óleo de copaíba submetido ao envelhecimento forçado por estresse térmico

NIST utilizado como referência interna do software Chemstation. Conforme ilustra o cromatograma na Figura 5-6.

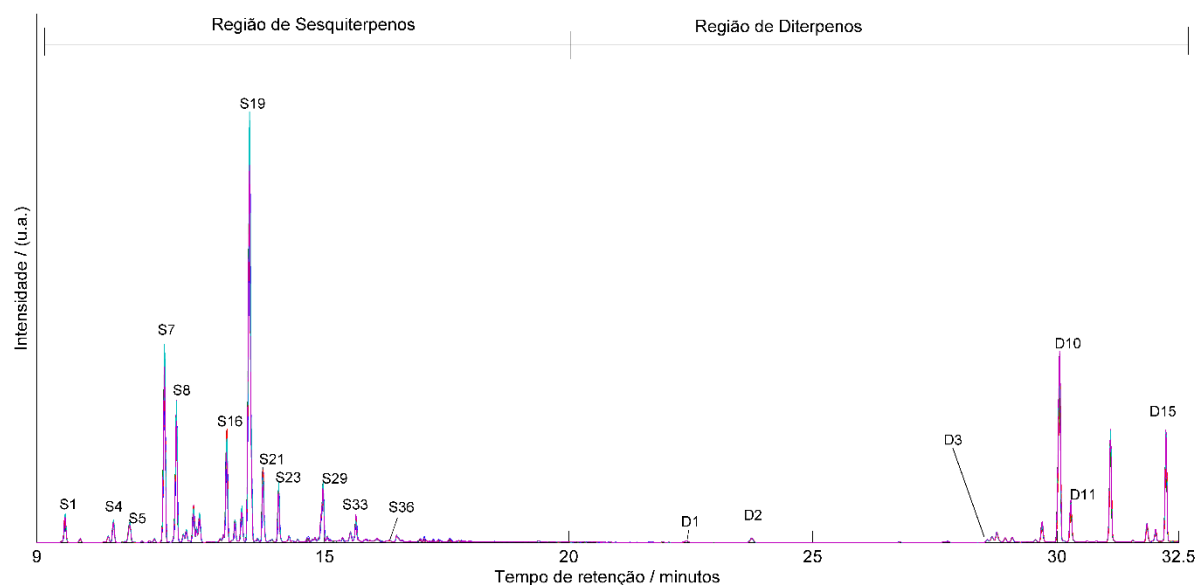


Figura 5-6 - Cromatogramas das amostras submetidas à estresse térmico. com a identificação de alguns picos. A identificação dos picos começados pela letra “S” equivalem aos sesquiterpenos, Picos começados pela letra “D” equivalem aos diterpenos.

Foram identificados seis compostos diterpênicos conforme ilustrados na Figura 5-7.

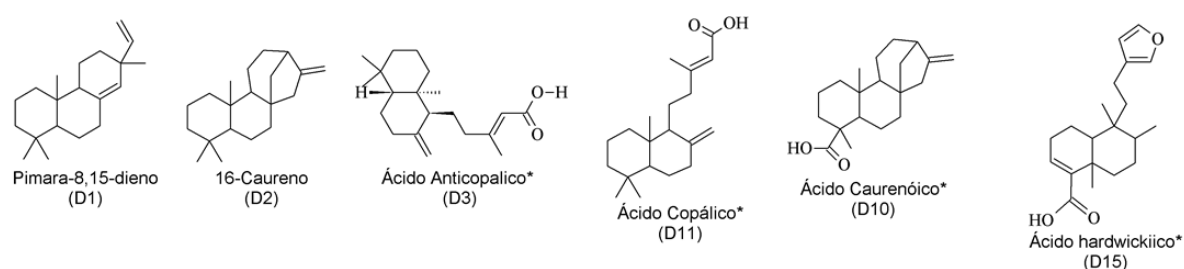


Figura 5-7 - Compostos diterpênicos detectados nas amostras de óleo de copaíba submetidas à estresse térmico.* Ácidos detectados como ésteres metílicos.

Os outros 31 compostos identificados eram sesquiterpenos conforme ilustrado na Figura 5-8.

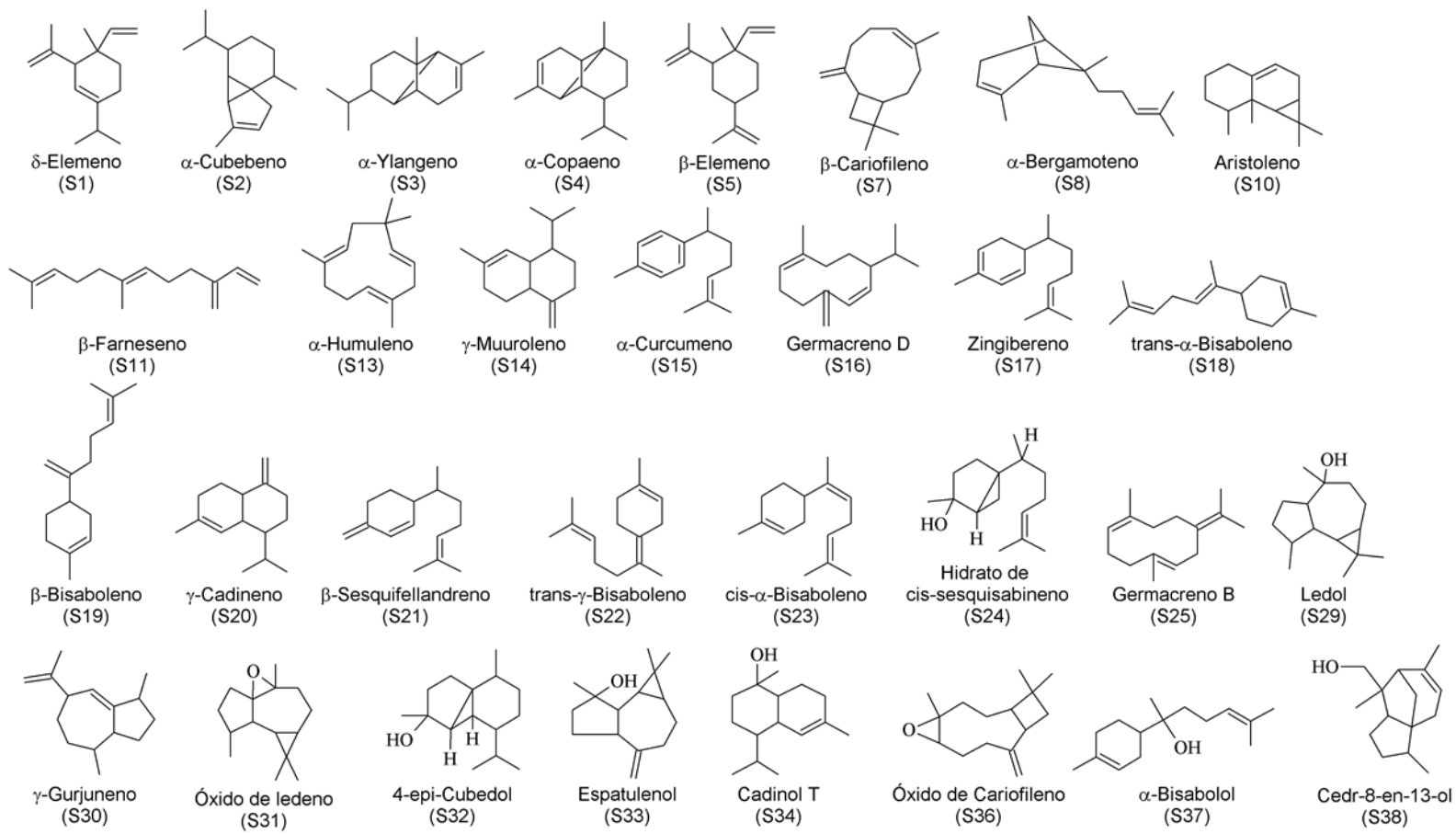


Figura 5-8 - Compostos sesquiterpênicos detectados nas amostras de óleo de copaíba submetidas à estresse térmico.

5.2.2.1 Modelo PCA desenvolvido a partir dos espectros no infravermelho próximo (NIR)

A utilização da espectroscopia do infravermelho próximo (NIR), é uma técnica que tem sido muito utilizada no desenvolvimento de modelos quimiométricos principalmente na quantificação de analitos [36, 78, 139, 140].

Foram realizados vários modelos PCA baseado em espectros NIR, variando o tipo de pré-processamento e o número de componentes principais. Todavia, nenhum modelo apresentou uma distribuição das amostras de óleo de copaíba em grupos em função do tratamento submetido. O resultado de um desses modelos é apresentado na Figura 5-9. Ao se observar os escores e pesos do melhor modelo desenvolvido com os espectros da técnica NIR, pré-processados com padronização normal de sinal (SNV), primeira derivada e dados centrados na média, não foi possível separar eficientemente as amostras por condições de armazenagem.

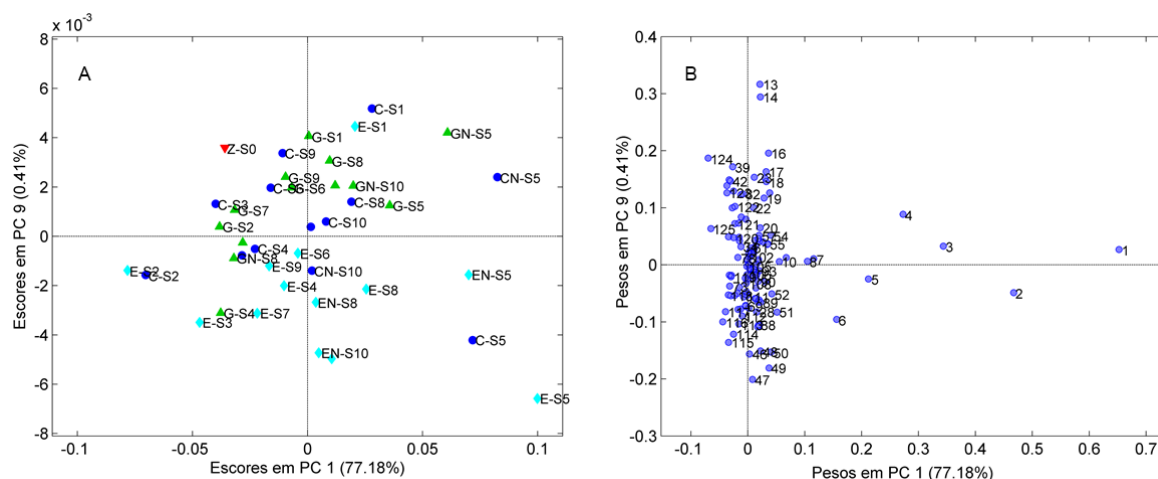


Figura 5-9 - (A) Gráfico de escores PC1 x PC2 de escores, (B) Gráfico de pesos PC1 x PC2 do modelo NIR

Apesar da espectroscopia NIR ser muito versátil sobretudo quando se utiliza aparelho portáteis [140], Pasquini (2003) relatou que esta técnica espectroscópica não é muito sensível e em geral seu limite de detecção em análises quantitativas é

em torno de 0,1% (massa / massa) [102]. Portanto, a não observação da formação de grupos sugere que os tratamentos térmicos não causaram mudanças na composição do óleo superiores a 0,1% na concentração de seus componentes.

5.2.2.2 Modelo PCA desenvolvido para dados médios dos compostos detectados em CG-EM

O desenvolvimento deste modelo de Análise de Componentes Principais (PCA) teve como base os teores relativos médios dos compostos detectados por cromatografia gasosa com detecção de espectro de massas (CG-EM), cujos valores estão relacionados no Anexo IV.

Os modelos testados usaram como pré-processamentos a centragem na média e autoescalamento. Para estabelecer o número de componentes principais, em todos os modelos testados foi realizada uma validação cruzada do tipo “deixar um de fora”, do inglês *leave one out*, que consiste em realizar validações internas com as amostras utilizadas para a criação do modelo PCA, onde a cada iteração nessa validação cruzada, uma amostra é retirada e calculada raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV). As amostras anômalas foram consideradas quando os valores dos parâmetros de T^2 de Hotelling e resíduos Q para essas amostras apresentavam-se acima dos seus respectivos limites a um nível de confiança estatística de 99%.

O modelo pré-processado com centragem na média apresentou os melhores resultados, tendo sido selecionadas 7 PC's que explicam 98,64% da variância do modelo, RMSEC e RMSECV os quais foram respectivamente 0,01 e 0,88, não sendo detectada nenhuma amostra anômala.

As PC1 e PC2 deste modelo, explicam juntas 76,78% da variância do modelo, e ao analisar o gráfico PC1 x PC2 (Figura 5-10), observou-se que as amostras estocadas na estufa se distanciaram do agrupamento geral das demais amostras do estudo, à medida que ficaram mais tempo neste ambiente. Considerando-se que a partir da 2ª semana de ensaio as amostras estocadas na estufa

apresentaram um comportamento de tendência a migrar para a parte negativa da PC2, a amostra da 7ª semana (E-S7), foi a única em que a variação em relação as demais foi um pouco mais acentuada.

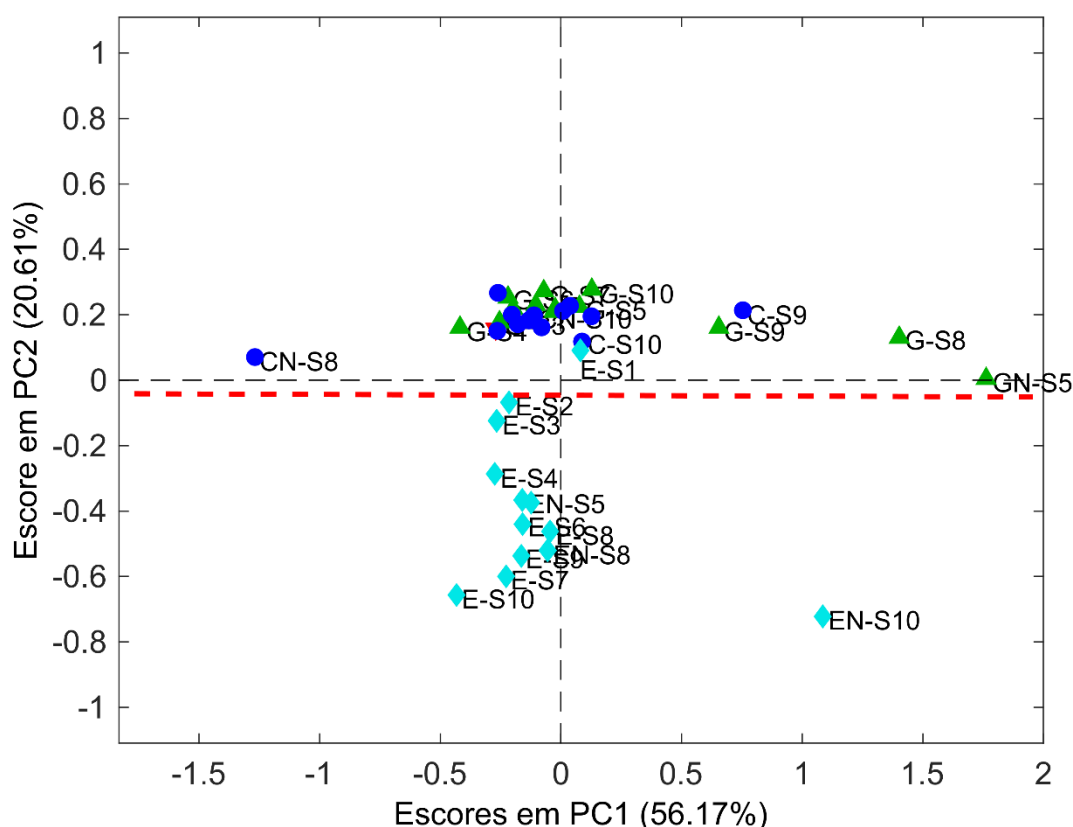


Figura 5-10 - Gráfico de escores de PC1xPC2 para as amostras de óleo de copaíba pré-processadas com centragem na média. (◆) Estufa, (▲) Geladeira e (●) Câmara Climatizada.

A influência dos pesos das variáveis (*loadings*), que representam os compostos, na separação das amostras em PC1 x PC2 pode ser observada na Figura 5-11, onde os compostos S1 (δ -Elemeno), S19 (β -Bisaboleno), S36 (Óxido de cariofileno) e D10 (Éster metílico do Ácido Caurênico) tiveram uma forte influência na separação das amostras acondicionadas em estufa em relação as demais. A influência do óxido de cariofileno (S36), nas amostras estocadas na estufa é perfeitamente justificada considerando que tal composto é um indicador de degradação oxidativa do óleo de copaíba [123]. Com relação aos compostos δ -

Elemeno, β -Bisaboleno e o éster metílico do Ácido Caurênico, não há explicação neste momento, para que as mesmas influenciassem a separação das amostras submetidas a uma temperatura mais alta das demais amostras estocadas à temperaturas mais amenas.

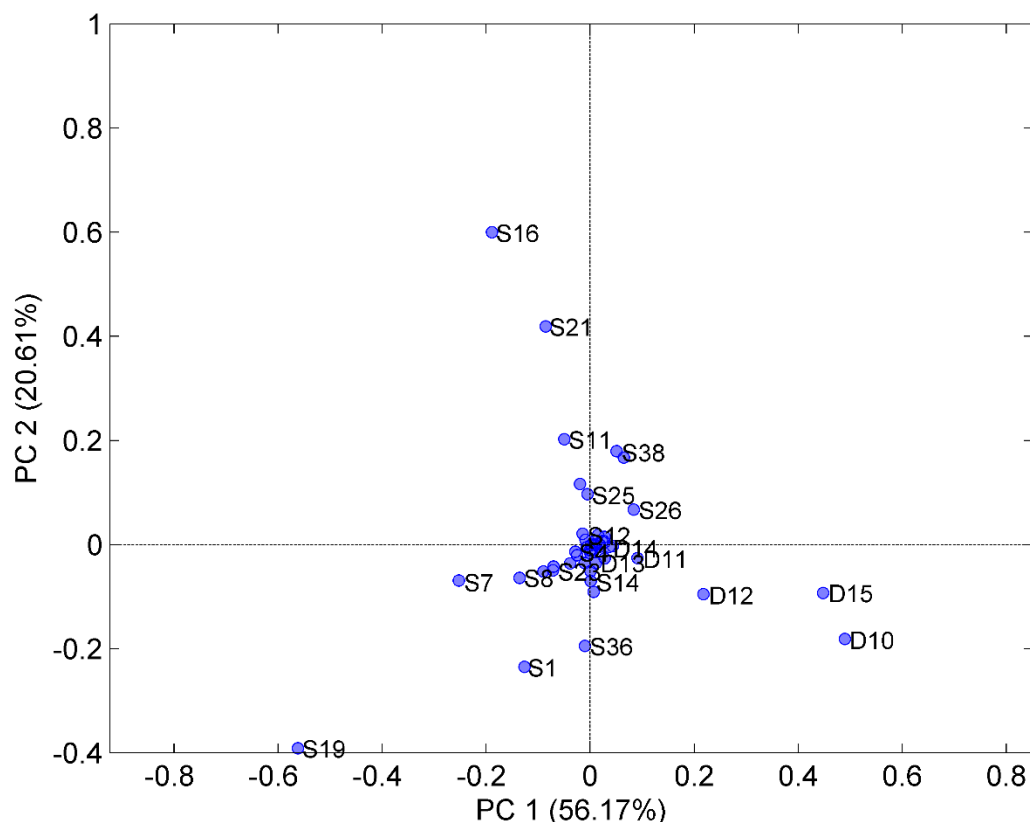


Figura 5-11 - Influência dos pesos dos compostos no agrupamento de amostras em PC1 x PC2

Para avaliar a evolução das áreas relativas normalizadas dos compostos S1, S19, S36 e D10 durante as 10 semanas para o ambiente de estufa, aplicou-se uma normalização das áreas relativas dos compostos. O óxido de cariofileno (S36) foi dentre esses compostos, o único que teve uma evolução partindo de 0,00 e

evoluindo fortemente para uma área relativa normalizada de 0,8⁹ nas duas primeiras semanas, continuando a tendência de aumento desse valor até o final da décima semana. Este mesmo comportamento não pôde ser observado nos compostos S1, S19 e D10 para as mesmas condições de temperatura, conforme pode ser observado na Figura 5-12.

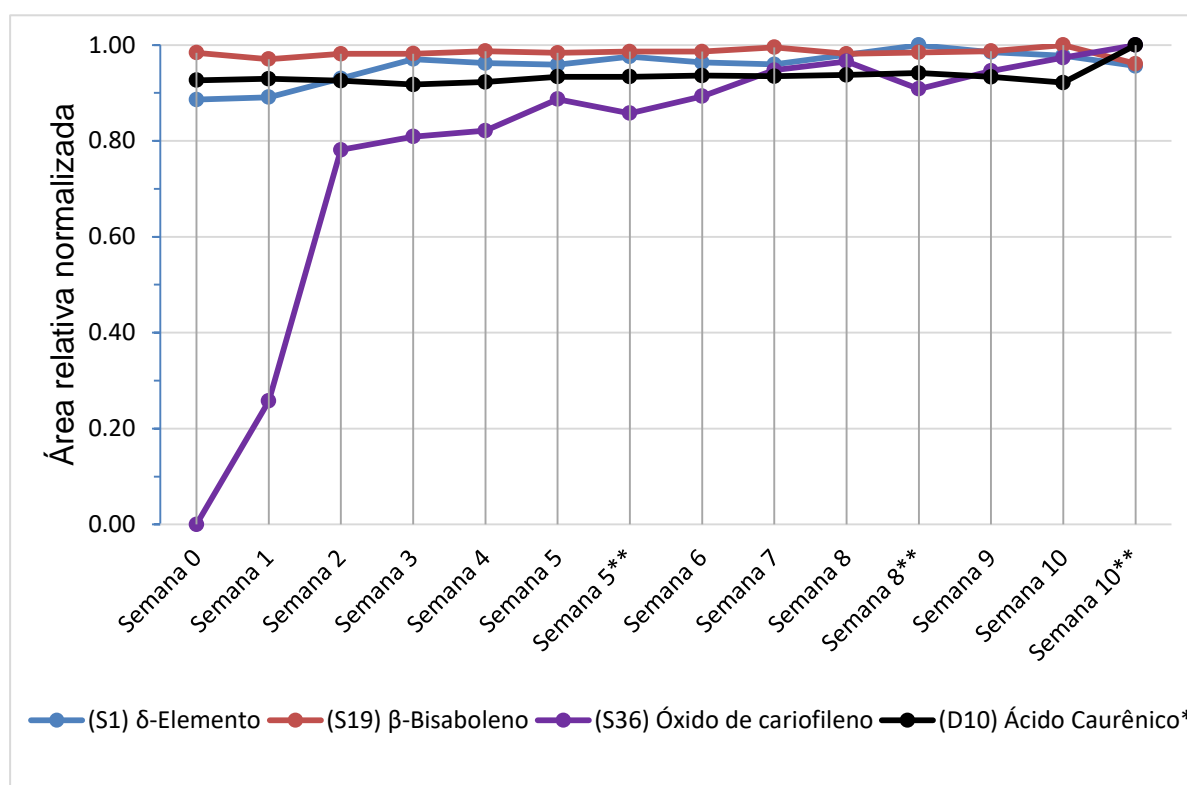


Figura 5-12 - Variação dos valores normalizados das áreas relativas dos compostos S1 - δ-Elemento, S19 - β-Bisaboleno, S36 – Óxido de Cariofileno e D10 – Ácido Caurênico* (* detectado como um éster metílico) em ambiente estufa ao longo das 10 semanas do estudo.** amostras de óleo de copaíba em atmosfera de nitrogênio.

⁹ O valor da área normalizada é uma unidade adimensional, pois a normalização realizada é a razão entre o valor percentual do composto na semana do ensaio e o maior valor exibido pelo mesmo composto durante as 10 semanas do ensaio.

5.2.2.3 Modelo PCA desenvolvido a partir dos dados de CG-EM

A cromatografia (CG) gasosa é uma técnica analítica de grande importância, sendo a mais utilizada na separação e detecção de compostos voláteis de matrizes complexas. Com grande sensibilidade e detectabilidade a CG pode detectar compostos com concentrações tão baixas quanto 10^{-16} mol L⁻¹ [141].

Devido à sua grande sensibilidade e detectabilidade, o uso desta técnica pode indicar as mais sutis alterações no produto analisado. No entanto, a utilização de cromatogramas como fonte de dados para realizar uma discriminação entre amostras é uma tarefa árdua, pois a identificação de diferenças entre esses cromatogramas nem sempre é possível via inspeção visual. Desta forma, a utilização de métodos quimiométricos para a identificação de diferenças na composição das amostras muito similares é possível através de diversas ferramentas multivariadas, dentre elas a Análise de Componentes Principais - PCA [142].

Para o desenvolvimento deste modelo, inicialmente os cromatogramas foram alinhados pelo algoritmo *icoshift* [53]. A Figura 5-13-a ilustra os cromatogramas antes do alinhamento, onde o através de um fragmento aumentado (na cor vermelho) desses cromatogramas é possível observar um desalinhamento entre os picos. Na Figura 5-13-b observa-se que após o uso do *icoshift* os cromatogramas foram devidamente alinhados, vide fragmento ampliado (na cor azul) dos cromatogramas.

5 –Aplicação de análise de componentes principais (PCA) na identificação de alterações em óleo de copaíba submetido ao envelhecimento forçado por estresse térmico

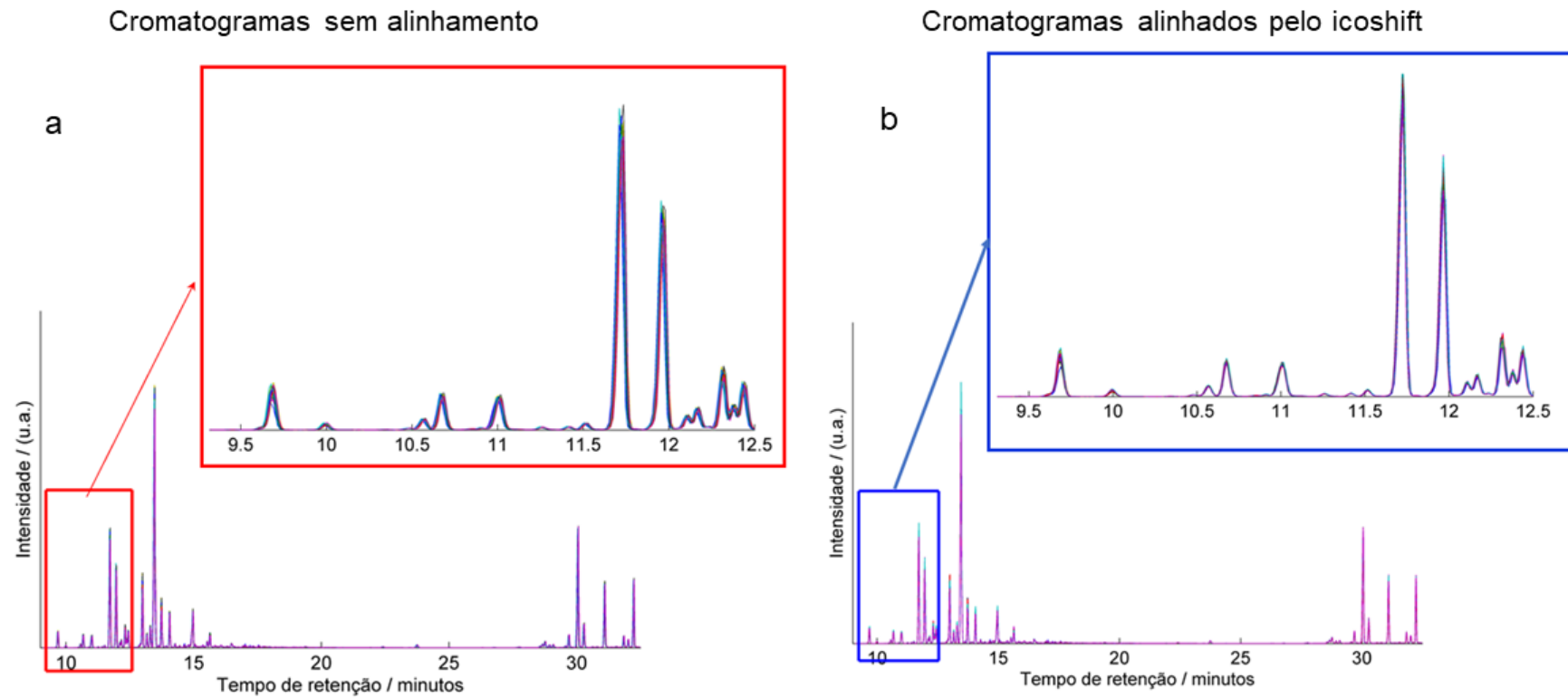


Figura 5-13 - Cromatogramas médios das amostras de óleo de copaíba submetidas à estresse térmico. a – cromatogramas sem alinhamento; b - cromatogramas alinhados pelo icoshift.

Após o alinhamento dos cromatogramas os mesmos foram submetidos aos pré-processamentos normalização pelo pico mais intenso, centragem na média e autoescalamiento.

Os pré-processamentos Normalização (isoladamente) e Normalização acrescido de autoescalamiento, não foram capazes de evidenciar separação de grupos específicos para a segregação de amostras por condição aplicada no tratamento das amostras. No entanto, os pré-processamentos, centragem na média (isoladamente), autoescalamiento (isoladamente) e a combinação de normalização e centragem na média, foram capazes de discriminar amostras em razão do tratamento submetido, cujos parâmetros para a escolha do melhor modelo, estão elencados na Tabela 5-9 e Figura 5-14.

Tabela 5-9 - Parâmetros auxiliares de escolha de modelo PCA por pré-processamento.

Modelo	Pré-processamento	Número de PC's	Variância explicada	RMSEC	RMSECV
1	Centragem na média	9	99,48 %	$6,474 \times 10^3$	$1,138 \times 10^7$
2	Autoescalamiento Normalização +	9	95,11 %	0,2184	213,4
3	centragem na média	5	97,18 %	0,001	1,018

5 –Aplicação de análise de componentes principais (PCA) na identificação de alterações em óleo de copaíba submetido ao envelhecimento forçado por estresse térmico

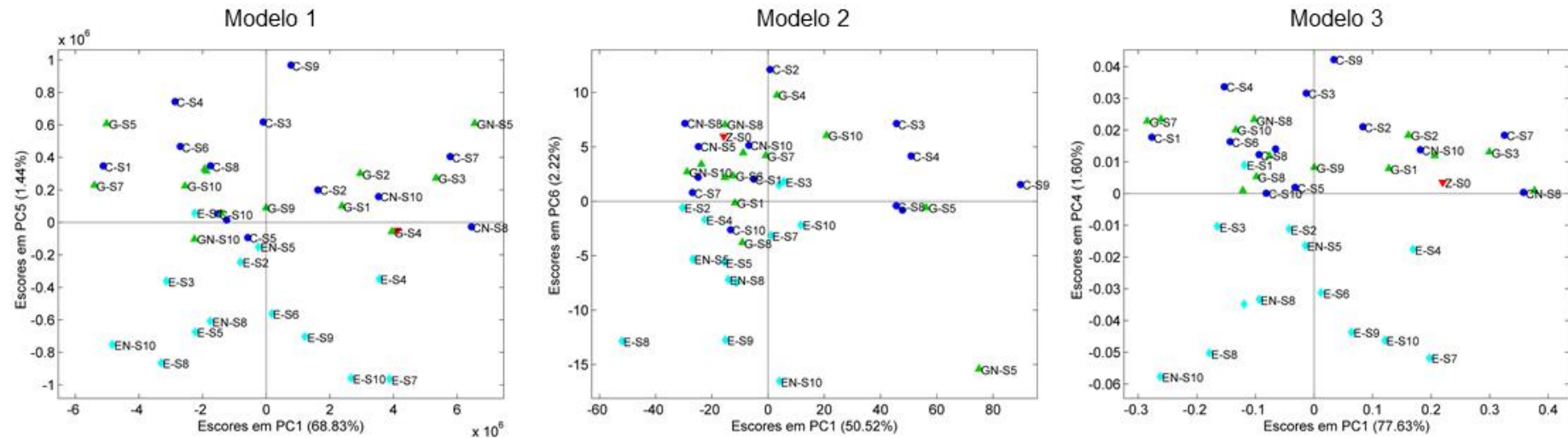


Figura 5-14 - Comparação dos gráficos de distribuição de escores entre duas PC's ortogonais na discriminação das amostras submetidas à estresse térmico.

O modelo 3 foi escolhido por apresentar uma menor razão entre RMSECV e RMSEC e por conseguir explicar mais que 95% da variância dos dados com apenas 5 PC's. Os resultados desse modelo revelaram que as amostras estocadas na estufa se diferenciavam das amostras estocadas nas outras condições.

A utilização de cromatogramas complexos e muito congestionados e sem uma boa definição dos picos, torna a identificação das variáveis que estão influenciando nos agrupamentos, uma tarefa muito difícil. De uma forma geral, para se identificar as variáveis que influenciam os agrupamentos e/ou separações de amostras em PCA, quando se utiliza um cromatograma como base de dados, ou se conhece os compostos presentes naquela amostra, como acontece frequentemente em publicações que utilizam este tipo de classificação não supervisionada [116, 143, 144], ou se usa como variáveis picos muito bem delimitados [145, 142].

Considerando que a PC 4 do modelo 3 (Figura 5-14) foi a que explicou a separação das amostras acondicionadas na estufa na região de escores negativos dessa PC, as variáveis mais importantes nessa separação são aquelas que possuem os pesos mais negativos de PC 4. O gráfico de Pesos (PC4) x tempo de retenção (Figura 5-15) permite identificar que os compostos que mais influenciaram na separação das amostras estocadas em estufa foram o δ -Elemeno, α -Cubebeno, β -Bisaboleno, Ledol, Óxido de Cariofileno, Éster metílico do Ácido Caurênico, Éster metílico do Ácido Hardwickiico e mais dois compostos que não foram identificados pelo banco de dados NIST. É importante salientar que no modelo desenvolvido no item 5.2.2.2 deste capítulo os compostos δ -Elemeno, β -Bisaboleno, Óxido de Cariofileno e o Éster metílico do Ácido Caurênico, também foram identificados como responsáveis pelas amostras estocadas na estufa.

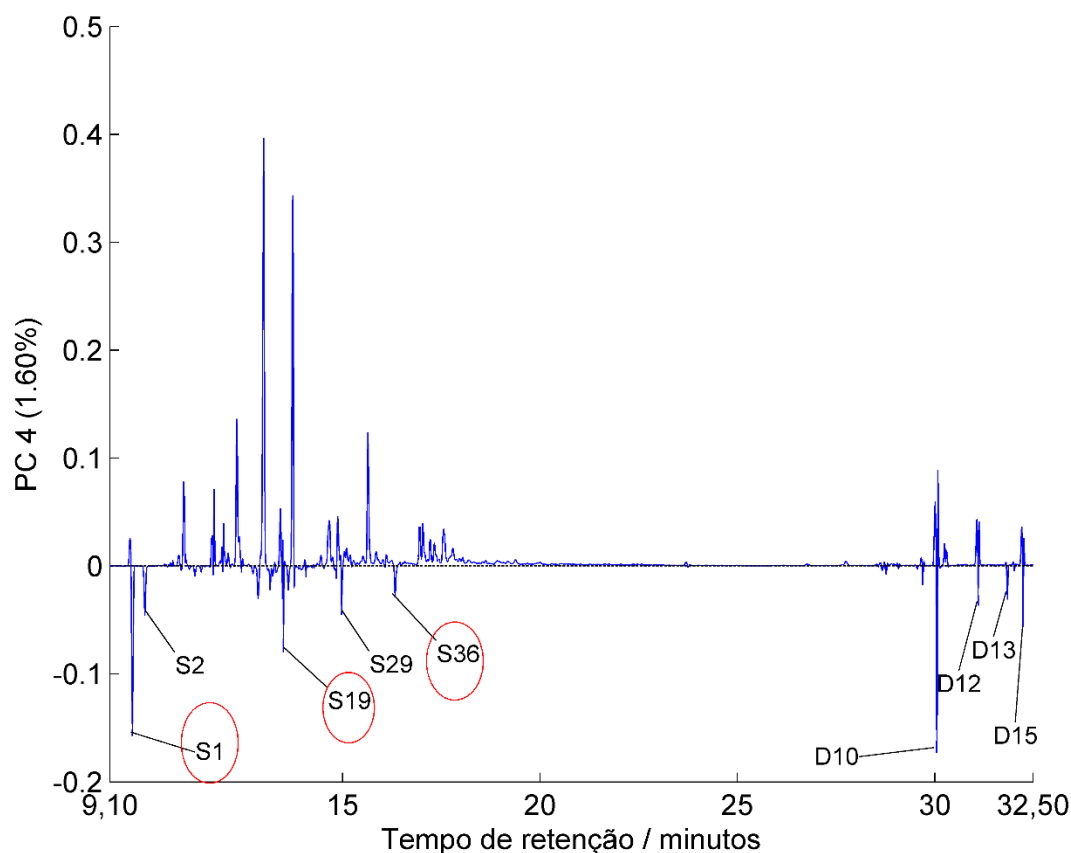


Figura 5-15 - Pesos do PC 4 x tempo de retenção do modelo 3. S1: δ -Elemeno, S2: α -Cubebeno, S19: β -Bisaboleno, S29: Ledol, S36: Óxido de Cariofileno, D10: éster metílico do Ácido Caurênico, D12: N.I., D13: N.I., D15: éster metílico do Ácido Hardwickiico.

5.3 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de modelos de Análise de Componentes Principais – PCA, para a avaliação das mudanças ocorridas nas amostras de óleo de copaíba submetidas a processos de estocagem em ambientes com temperaturas distintas, se mostrou promissor a medida que das três estratégias duas se mostraram eficientes para detectar mudanças sutis entre as amostras.

A PCA desenvolvida com as áreas normalizadas dos 53 compostos detectados e identificados por CG-EM possibilitou identificar os compostos que tiveram a maior influência na separação e/ou agrupamento das amostras,

indicando principalmente o Óxido de cariofileno como um possível indicador de degradação do óleo com relação à temperatura.

A utilização dos cromatogramas brutos como base de dados para o desenvolvimento do método em PCA, se mostrou de igual maneira hábil. Há de se considerar, que mesmo que não se possa conhecer todos os compostos presentes na amostra, o desenvolvimento de uma PCA via *fingerprints* para esta tal finalidade é perfeitamente possível.

A técnica empregada utilizando os espectros NIR aliado não se mostrou promissora nos limites impostos pelos tratamentos a que foram submetidas as amostras de óleo de copaíba. O que provavelmente ocorreu por não ter sido observada uma degradação expressiva do OC que pudesse ser detectada pelo NIR.

O estudo de envelhecimento forçado por estresse térmico do óleo de copaíba, indica que esse produto um elevado tempo de vida de prateleira, mesmo quando sujeito à altas temperaturas na estocagem, como frequentemente ocorre em feiras pelo país.

CAPÍTULO 6

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA IDENTIFICAR A AUTENTICIDADE DE ÓLEOS DE COPAÍBA, COM O USO DE ESPECTROSCOPIA NIR E DD-SIMCA

6 DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA IDENTIFICAR A AUTENTICIDADE DE ÓLEOS DE COPAÍBA, COM O USO DE ESPECTROSCOPIA NIR E DD-SIMCA

O aumento da demanda por óleo de copaíba (OC) devido à sua utilização para diversas finalidades, que vão desde o uso *in natura* na medicina popular, assim como na formulação de tintas e vernizes, cosméticos, fármacos e etc [2, 6, 10, 14, 26, 29], exerce uma grande pressão sobre a produção desse produto florestal não madeireiro (PFNM), que apesar de existirem no Brasil plantios experimentais, a fonte comercial desse insumo ainda é exclusivamente nativa [146].

A grande variabilidade de composição química dos óleos de copaíba e sua miscibilidade com outros óleos, impõe dificuldades para a realização do seu controle de qualidade de diversas maneiras, onde podem se destacar como principais as seguintes [11, 17, 23, 25, 26, 108]:

- a impossibilidade prática da criação de um padrão analítico de referência único, mesmo que seja por espécie, pois a origem geográfica e outros fatores bióticos e abióticos tem grande influência na variação da composição química do óleo [17, 23, 108];
- análises com cromatografias gasosas com detecção de espectro de massas, são capazes de identificar os compostos existentes no óleo analisado [1, 5, 22, 35]. No entanto o alto custo das análises, tende a inviabilizar este procedimento pelos pequenos comerciantes e cooperativas;
- Os métodos não cromatográficos até agora apresentados na literatura, não demonstraram grande eficiência, pois podem apresentar erros tanto falso positivo como negativos devido a variabilidade do óleo ou baixa sensibilidade das técnicas empregadas [3, 9, 18].

O controle de qualidade de produtos é uma preocupação dos consumidores, produtores e dos órgãos de controle, sejam esses produtos medicamentos [85, 94, 147], alimentos [88, 148, 149], bebidas [150, 151], combustíveis [152], dentre outros. As referências citadas neste parágrafo utilizaram técnicas analíticas diversas, produzindo dados multivariados, que associadas a técnicas quimiométricas, têm obtido bons resultados analíticos, notadamente nas autenticações que visam discriminar a procedência geográfica [153], identificar falsificações/adulterações [36, 85], identificação de maturação [115], entre uma infinidade de outros objetivos.

Quando se tem o objetivo de realizar a autenticação de produtos, as mais diversas técnicas quimiométricas de classificação supervisionada têm sido utilizadas, tais como o SIMCA [154, 155], PLS-DA [115, 156, 157], LDA [158, 159], e o DD-SIMCA (do inglês, *data driven – soft independent modeling of class analogy*) [85, 94, 148].

Entre os modelos citados anteriormente, o DD-SIMCA é baseado em classificadores de classe única – OCC (do inglês, *one class classification*), na qual o modelo procura modelar uma classe alvo de forma a conseguir identificar quando amostras podem ser consideradas como pertencentes a essa classe ou como amostras externas (que podem fazer parte de uma ou várias outras classes diferentes da classe alvo), independentemente de se ter conhecimento ou não dos fatores que causam tais diferenças [84, 85, 147, 148]. Essa característica tem feito com que o DD-SIMCA seja recomendado para o desenvolvimento de métodos de autenticação, razão pela qual foi escolhido para o desenvolvimento do método para óleos de copaíba (OC) neste capítulo. O processo consiste em construir um modelo onde a classe alvo é caracterizada por um conjunto representativo de amostras autênticas de OC. Após o desenvolvimento, o método deve ser validado para comprovar sua capacidade de diferenciar amostras não conformes (que tenham sido adulteradas de alguma forma), assim como de amostras de OC não pertencentes à classe alvo (ex. amostras obtidas de espécies que não foram incluídas no desenvolvimento do método).

A utilização de equipamentos portáteis, sobretudo para a técnica NIRS associada à quimiometria, tem sido preferida quando há a possibilidade de se realizar autenticações nos mais diversos locais, é ambientalmente amigável, não gerando resíduos na análise, além de ser uma técnica não destrutiva [36, 94, 140]. Desta forma, neste capítulo da tese é proposto o desenvolvimento de um método de classificação utilizando um espectrômetro NIR portátil (MicroNIR 1700) associado ao DD-SIMCA para determinação da autenticidade/conformidade de amostras de OC.

6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1 Equipamentos, vidrarias, acessórios e solventes

- Espectrômetro portátil MicroNir 1700, VIAVI Solutions;
- Suporte adaptador para MicroNIR 1700 e cubeta;
- Cubetas de Quartzo de 10 mm de caminho óptico, capacidade de 3,5 mL;
- Pipeta de Pasteur em plástico, capacidade de 3,0 mL;
- 2-Propanol pureza 99,5 %, marca Sigma-Aldrich;
- N-Hexano pureza 95 %, marca Tedia.

6.1.2 Escolha e preparação das amostras para o desenvolvimento do modelo

Foram reunidas 278 amostras de óleo de copaíba, dentre amostras autênticas, amostras submetidas a estresse térmico (conforme descrição na seção 5.1.3 do capítulo 5), amostras comerciais com e sem adulteração (adquiridas no comércio nos estados do Acre, Pará, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás e no Distrito Federal) e amostras autênticas adulteradas em laboratório, conforme descritos no Anexo II e no Anexo VIII. A distribuição das amostras para a fase de treinamento e validação do método estão especificadas na Tabela 6-1.

6 – Desenvolvimento de um método para identificar a autenticidade de Óleos de Copaíba, com o uso de espectroscopia NIR E DD-SIMCA.

Tabela 6-1 – Conjuntos de amostras de óleo de copaíba utilizadas no desenvolvimento do método DD-SIMCA.

Quantidade	Conjunto	Subconjunto	Marcador	Origem das amostras
70	Treinamento	OCTR	★	17 amostras distintas de óleo de <i>Copaifera langsdorffii</i> , 9 amostras comerciais sem adulteração com triacilgliceróis, 28 misturas binárias, 13 misturas ternárias, 3 amostras utilizadas como referências no ensaio de estresse térmico;
10	Validação	OCSC	★	Amostras autênticas constituídas de 6 misturas binárias e 4 ternárias, pertencentes à classe alvo e que não estavam inseridas na fase de treinamento;
117	Validação	OCET	★	Amostras submetidas a estresse térmico;
7	Validação	OCCP	●	Amostras comerciais de espécies desconhecidas e sem adulteração por triacilgliceróis;
19	Validação	OCCA	●	Amostras comerciais de espécies desconhecidas em que se constatou adulteração com triacilgliceróis por CG-EM;
6	Validação	OCAD	◇	Amostras da classe alvo adulteradas com azeite de dendê ¹⁰ ;
6	Validação	OCAO	◇	Amostras da classe alvo adulteradas com azeite de oliva ¹⁰ ;
6	Validação	OCOG	◇	Amostras da classe alvo adulteradas com óleo de girassol ¹⁰ ;
6	Validação	OCOL	◇	Amostras da classe alvo adulteradas com óleo de coco licuri ¹⁰ ;
31	Validação	OCOS	◇	Amostras adulteradas com óleo de soja.

¹⁰ Adulterações realizadas em laboratório com teores de adulterantes de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 %(v/v)

6 – Desenvolvimento de um método para identificar a autenticidade de Óleos de Copaíba, com o uso de espectroscopia NIR E DD-SIMCA.

O significado das siglas dos subconjuntos de Treinamento e Validação estão relacionados na Tabela 6-2.

Tabela 6-2 – Definição das siglas empregadas nos subconjuntos de treinamento e validação utilizados na Tabela 6-1.

Subconjunto	Significado
OCTR	Amostras puras autênticas de Óleo de Copaíba utilizadas no Treinamento do modelo;
OCSC	Amostras puras de Óleo de Copaíba Sob Controle;
OCET	Amostras puras de Óleo de Copaíba submetidas à Estresse Térmico;
OCCP	Amostras de Óleo de Copaíba Comerciais Puros;
OCCA	Amostras de Óleo de Copaíba Comerciais Adulterados;
OCAD	Amostras de Óleo de Copaíba adulterados com Azeite de Dendê;
OCAO	Amostras de Óleo de Copaíba adulterados com Azeite de Oliva;
OCOG	Amostras de Óleo de Copaíba adulterados com Óleo de Girassol;
OCOL	Amostras de Óleo de Copaíba adulterados com Óleo de coco Licuri;
OCOS	Amostras de Óleo de Copaíba adulterados com Óleo de Soja.

Desta forma, 70 amostras foram utilizadas na fase de treinamento da classe alvo e 208 amostras foram utilizadas na fase de validação. O conjunto de amostras de validação foi composto de nove subconjuntos: dois pertencentes à classe alvo (OCSC e OCET), dois de amostras externas comerciais não pertencentes à classe alvo (OCCP e OCCA) e cinco subgrupos pertencentes à classe alvo e adulteradas em laboratório (OCAD, OCAO, OCOG, OCOL, OCOS).

As divisões das misturas binárias e ternárias para os conjuntos de treinamento e validação foram realizadas separadamente para cada tipo de mistura, utilizando o algoritmo Kennard Stone, que é baseado na seleção de amostras que representem toda a variabilidade do conjunto de dados através da distância euclidiana [160, 161, 162, 163]. As amostras mais externas em relação à média dos conjuntos de dados,

6 – Desenvolvimento de um método para identificar a autenticidade de Óleos de Copaíba, com o uso de espectroscopia NIR E DD-SIMCA.

para cada grupo de mistura, foram escolhidas para o conjunto de treinamento e as demais amostras utilizadas como as amostras autênticas de validação.

Para as amostras comerciais sem adulteração, a escolha para que compusessem o conjunto de treinamento ou validação se deu de forma aleatória.

6.1.3 Aquisição dos espectros das amostras no infravermelho próximo (NIR)

Os espectros de infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near Infrared*), foram coletados pelo princípio da transfectância em espectrofotômetro portátil MicroNir 1700, com o auxílio de adaptador para leitura das amostras em cubetas de quartzo. O procedimento de aquisição foi idêntico ao utilizado nos Capítulos 4 e 5 desta tese.

Os espectros das amostras foram medidos em triplicata para minimizar as variações instrumentais, utilizando-se a média desses espectros para comporem os conjuntos de treinamento e validação utilizados no desenvolvimento do modelo (Figura 6-1).

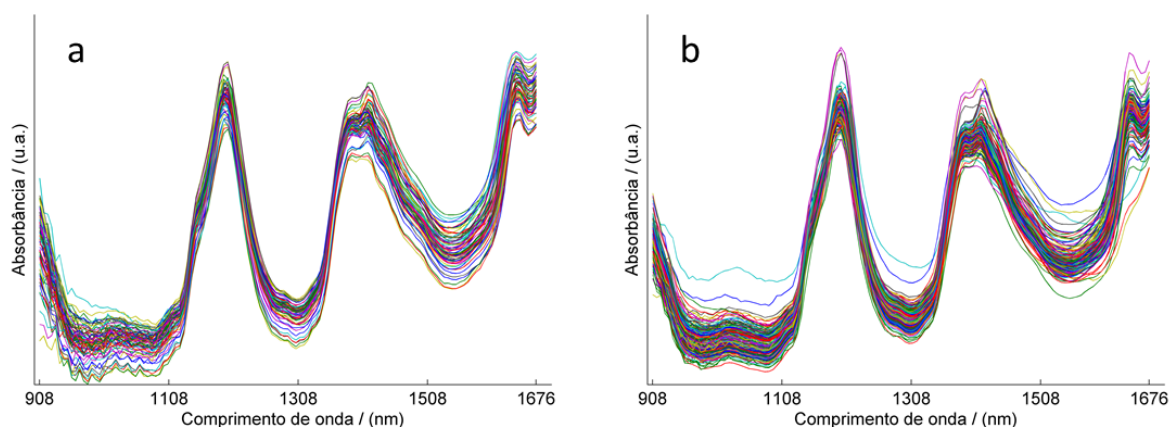


Figura 6-1 - Espectros brutos médios NIR dos conjuntos de amostras de óleo de copaíba de treinamento (a), e validação (b).

6.1.4 Desenvolvimento do modelo DD-SIMCA

A escolha do número de componentes principais que foram utilizados no desenvolvimento do modelo DD-SIMCA foi feita com base na avaliação da raiz quadrada da média quadrática dos erros da validação cruzada (RMSECV) calculados na PCA, cuja validação interna utilizada foi do tipo, deixar uma amostra de fora (loo - do inglês, *leave one out*), onde uma amostra do conjunto treinamento era retirada do conjunto de amostras e o modelo calculado com o restante e então validado com essa amostra e o processo repetido até todas amostras passarem por esse processo.

Foram testados nesta modelagem os seguintes pré-processamentos: SNV + centragem na média, SNV + primeira derivada + centragem na média e SNV + segunda derivada + centragem na média. As derivadas foram suavizadas com o algoritmo Savitzky Golay, com tamanho de janela de 9 pontos e polinômios de 2ª ordem (1ª derivada) e 3ª ordem (2ª derivada).

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros NIR das amostras de treinamento e de validação normalizadas por SNV (Figura 6-2) apresentaram diferenças observáveis de intensidade na região de 1420 nm, esta região está relacionada com o primeiro sobretom de estiramento da ligação O-H presentes nos ácidos diterpênicos e nos possíveis ácidos graxos livres nos óleos de copaíba adulterados [36, 105, 106]. A banda de 1650 nm é referente ao primeiro sobretom de estiramento da ligação C-H que está associada a uma dupla ligação entre carbono de um grupo vinílico e que podem ser encontradas nos compostos β -Elemeno, δ -Elemeno, β -Farneseno, γ -Gurjuneno e Pimara-8,15-dieno, todos eles encontrados nas amostras de óleo de copaíba. Este estiramento C-H em 1650 nm também pode ser relacionado com sua associação com ligações duplas entre carbono (C=C) presentes em uma estrutura cíclica [105, 106], que podem ser abundantemente encontradas nos compostos terpênicos presentes no

6 – Desenvolvimento de um método para identificar a autenticidade de Óleos de Copaíba, com o uso de espectroscopia NIR E DD-SIMCA.

óleo de copaíba com pode ser observado na Figura 5-7 e na Figura 5-8 da seção 5.2.2 do capítulo 5 desta tese.

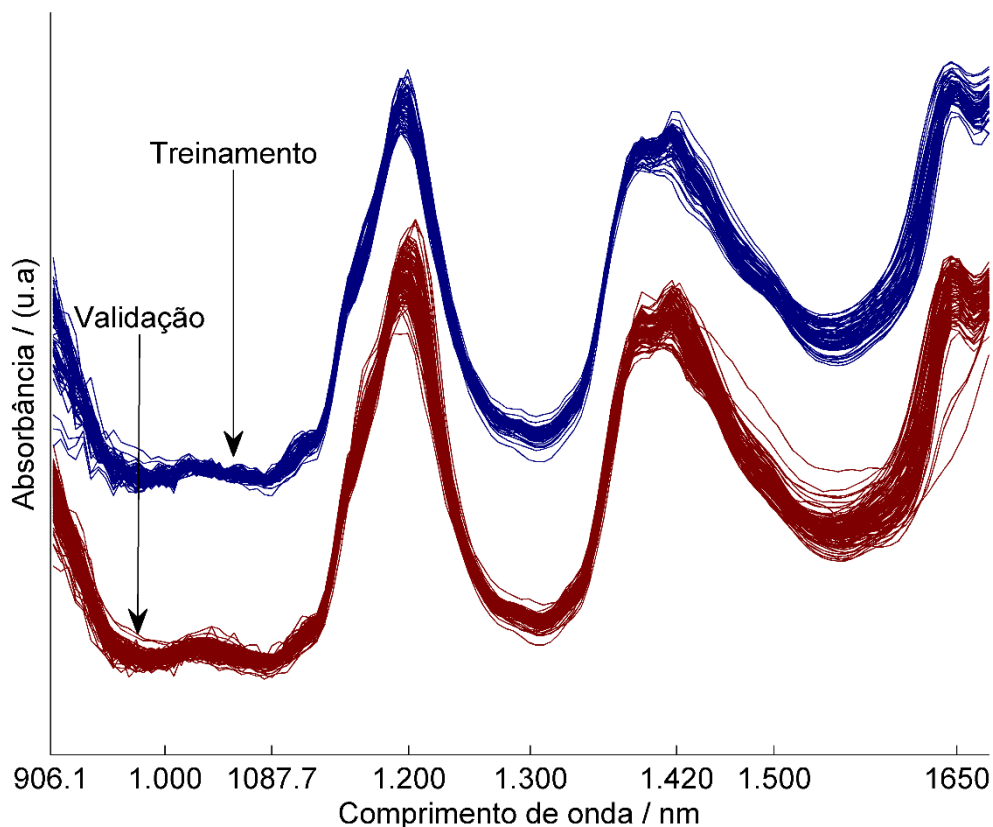


Figura 6-2 - Espectros NIR das amostras de treinamento e validação. Foi adicionado um deslocamento positivo na linha de base das amostras de treinamento para facilitar a visualização e comparação dos espectros.

Os modelos desenvolvidos com os pré-processamentos SNV + centragem na média e 2ª derivada + SNV + centragem na média não apresentaram modelos satisfatórios. No pré-processamento 1ª derivada + SNV + centragem na média os números de componentes principais (CP) utilizados para os testes dos modelos, foram 8, 10, 15 e 17 CP's, que foram selecionados conforme foi identificada a ocorrência de um patamar ou uma menor inclinação entre o nº de CP selecionado e o CP subsequente no gráfico de RMSECV, conforme ilustrado na Figura 6-3.

6 – Desenvolvimento de um método para identificar a autenticidade de Óleos de Copaíba, com o uso de espectroscopia NIR E DD-SIMCA.

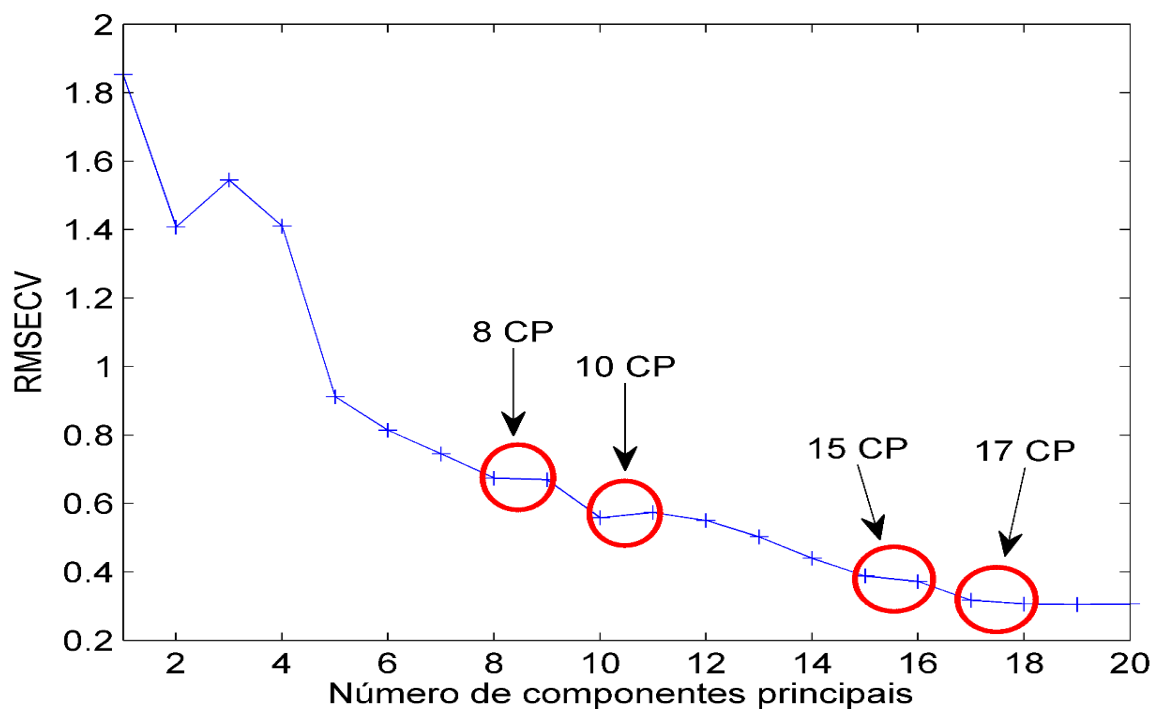


Figura 6-3 - Valores da Raiz da Média Quadrática dos Erros de Validação Cruzada (RMSECV) versus nº de Componentes Principais

Para a definição do número de componentes principais, inicialmente adotou-se como critério a escolha do número que fornecesse o modelo que englobasse todas as amostras do conjunto de treinamento dentro da área de aceitação, considerando um nível de confiança de 99,0%. No entanto, nenhum modelo atendeu a esse critério, sendo o modelo com 15 componentes principais o que mais se aproximou, deixando apenas uma amostra fora da área de aceitação. Desta forma, foram escolhidos 15 componentes principais e o nível de confiança do modelo foi ajustado para 99,6% para que todas as amostras estivessem dentro da área de aceitação, como pode ser observado na Figura 6-4.

6 – Desenvolvimento de um método para identificar a autenticidade de Óleos de Copaíba, com o uso de espectroscopia NIR E DD-SIMCA.

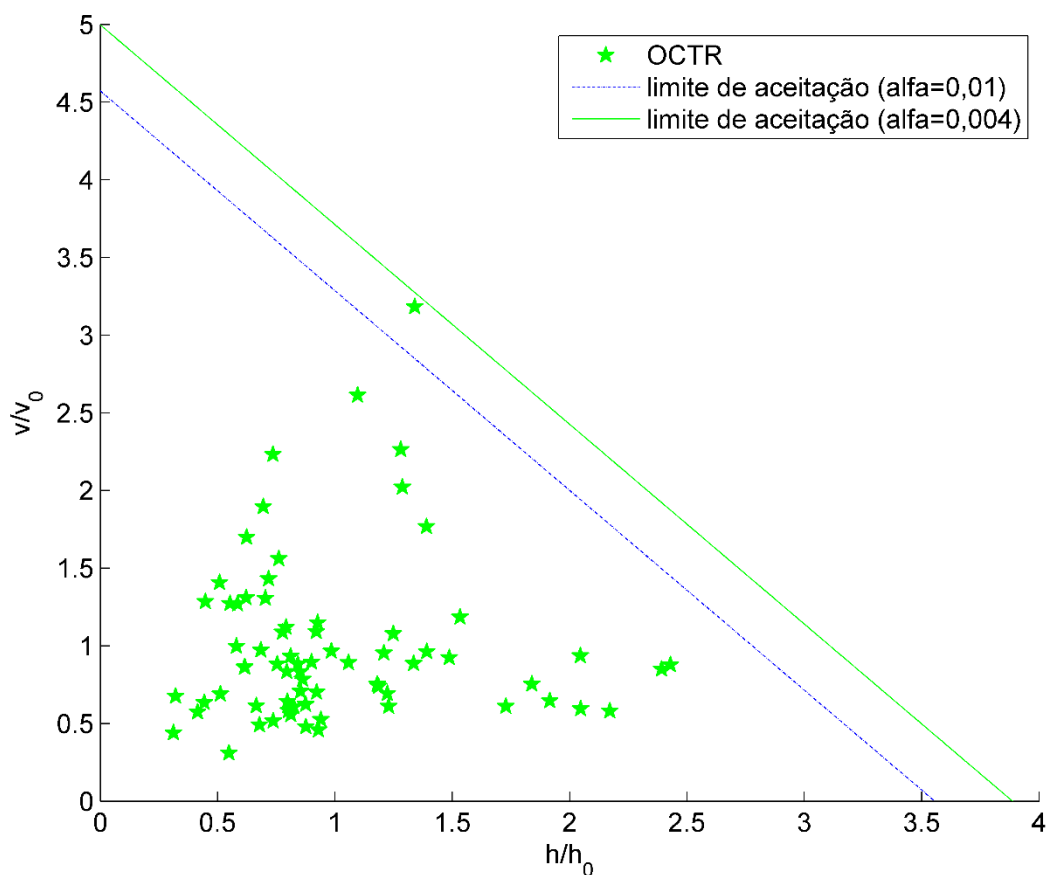


Figura 6-4 - Comparação entre os limites de aceitação do modelo para um nível de aceitação de 99 % (alfa = 0,01) e 99,6 % (alfa = 0,004).

O gráfico que demonstra a eficiência do modelo otimizado para a classe alvo descreve uma área triangular, cujo limite de aceitação é a hipotenusa e os catetos são os eixos $\frac{h}{h_0}$ e $\frac{v}{v_0}$ (Figura 6-5 a), todavia, no intuito de facilitar a visualização geral das amostras do conjunto de validação, e a relação destas com a área de aceitação, foi utilizada uma transformação logarítmica nos eixos das distâncias calculadas (Figura 6-5 b). Observa-se nestas figuras que todas as amostras de treinamento foram corretamente incluídas dentro da área de aceitação para a classe alvo, constituída por óleo de copaíba autênticos.

6 – Desenvolvimento de um método para identificar a autenticidade de Óleos de Copaíba, com o uso de espectroscopia NIR E DD-SIMCA.

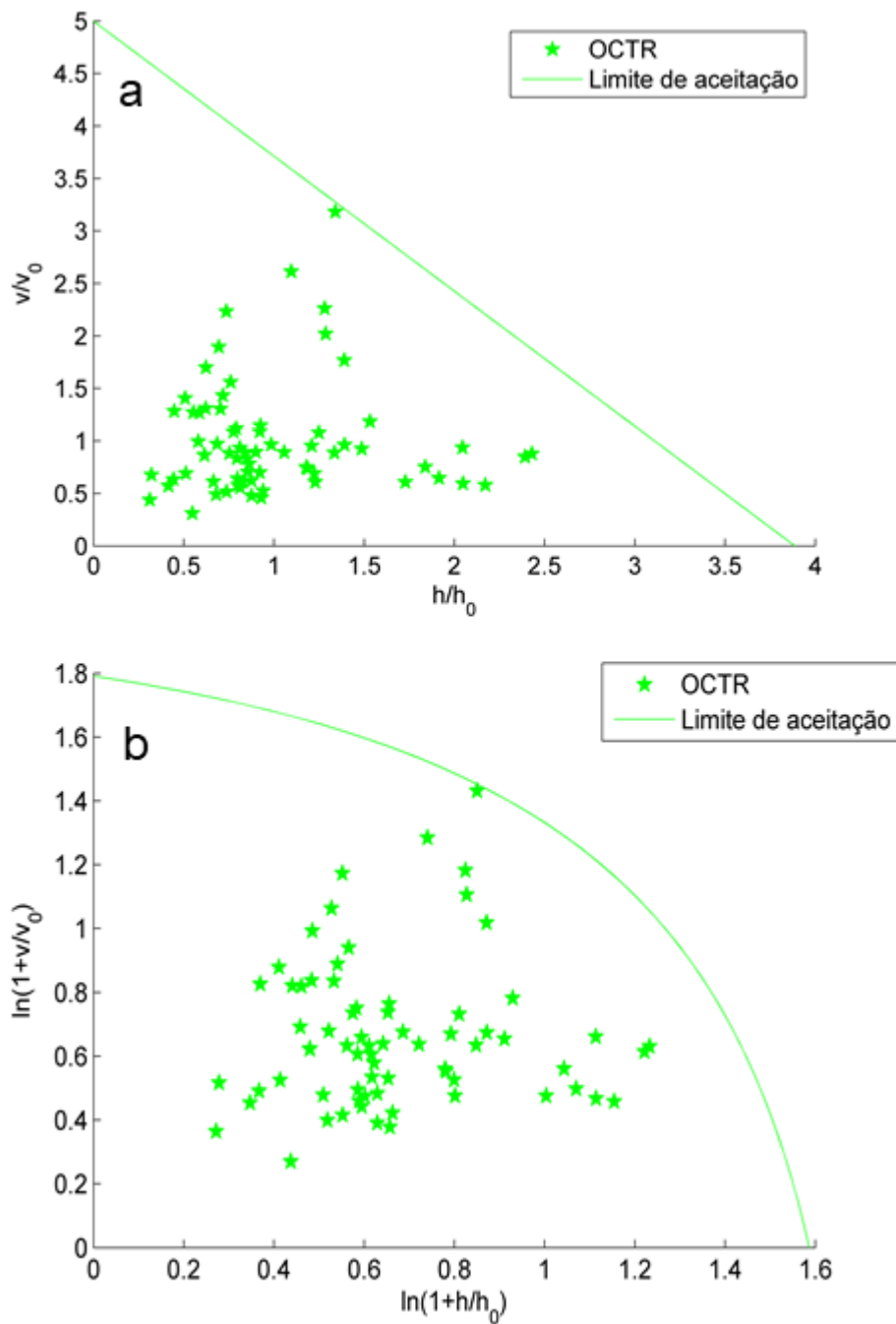


Figura 6-5 - Modelo classificador de classe única para óleos de copaíba autênticos

A distribuição das amostras de validação no modelo de classificação de óleos de copaíba autênticos desenvolvido pode ser observada no plano cartesiano $(\ln(1+h/h_0), \ln(1+v/v_0))$ da Figura 6-6. Como o esperado, as amostras do subconjunto

6 – Desenvolvimento de um método para identificar a autenticidade de Óleos de Copaíba, com o uso de espectroscopia NIR E DD-SIMCA.

(★ OCSC), foram todas classificadas como pertencentes à classe de amostras autênticas (OCTR) e se posicionaram dentro da área de aceitação do modelo. Por outro lado, a grande maioria das amostras adulteradas foram observadas fora da área de aceitação, demonstrando a eficiência do método.

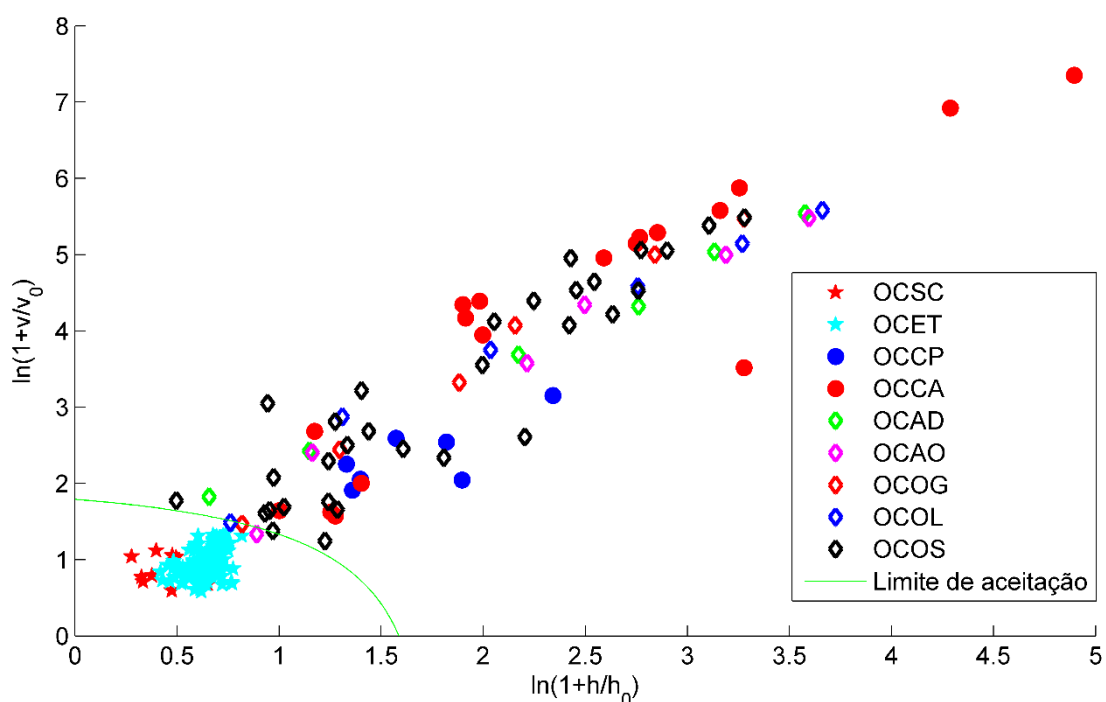


Figura 6-6 – Distribuição das amostras do conjunto de validação e suas relações com o modelo de classificação de óleos de copaíba autênticos desenvolvido.

As figuras de mérito utilizadas para a validação do método foram a taxa de sensibilidade – TST, que é a taxa de classificação correta de amostras pertencentes à classe alvo, a taxa de especificidade - TSP, que indica a taxa de classificar amostras não autênticas como não pertencentes à classe alvo e a taxa de eficiência - TEF, que mede a eficiência do método considerando os erros do tipo I (FN) e erros do tipo II (FP), cujos valores são apresentados na Tabela 6-3.

6 – Desenvolvimento de um método para identificar a autenticidade de Óleos de Copaíba, com o uso de espectroscopia NIR E DD-SIMCA.

Tabela 6-3 - Figuras de mérito do método desenvolvido para a classificação de óleos de copaíba autênticos.

Amostras	VP	FN	VN	FP	TST*	TSP*	TFP*	TFN*	TEF*
★ OCSC	10	0	-	-	100.0	-	-	0.0	-
★ OCET	117	0	-	-	100.0	-	-	0.0	-
● OCCP	0	7	-	-	0.0	-	-	100.0	-
Geral puros	127^a	7^a	-	-	94.8	-	-	5.2	-
● OCCA	-	-	19	0	-	100.0	0.00	-	-
◇ OCAD	-	-	6	0	-	100.0	0.00	-	-
◇ OCAO	-	-	5	1	-	83.3	0.00	-	-
◇ OCOG	-	-	5	1	-	83.3	0.00	-	-
◇ OCOL	-	-	5	1	-	83.3	0.00	-	-
◇ OCOS	-	-	31	0	-	100.0	0.00	-	-
Geral adulterados	-	-	71^a	3^a	-	95.9	4.1	-	-
Total Geral	127^a	7^a	71^a	3^a	-	-	4.1	5.2	90.7

* Valores expressos em (%), VP = verdadeiro positivo, FN = falso negativo, VN = verdadeiro negativo, FP = falso positivo, TST = taxa de seletividade, TSP = taxa de seletividade, TFP = taxa de falso positivo, TFN = taxa de falso negativo, TEF = taxa de eficiência, (-) a variável não existe ou não pode ser calculada. ^a Valores obtidos pela soma dos valores da coluna.

As amostras de OCET (★) também foram classificadas como pertencentes à classe de amostras autênticas (OCTR) apresentando uma TST de 100 %. Tal constatação está em concordância com o fato dessas terem sido produzidas por uma mistura de amostras integrantes do conjunto de treinamento, mas que passaram por um processo de estresse que não provocou mudanças perceptíveis pela espectroscopia NIR, conforme discutido no Capítulo 5.

No que se refere ao subconjunto (● OCCP), nenhuma das suas amostras foi classificada como pertencente à classe de amostras autênticas (todas ficaram fora da área de aceitação), apesar das amostras não apresentarem adulteração por triacilgliceróis. É importante recordar que essas amostras não fizeram parte das amostras de treinamento e nem contribuíram na elaboração das misturas binárias,

ternárias ou de adulterações no laboratório e por terem sido obtidas no comércio não se tem conhecimento da espécie de *Copaifera* que produziu o óleo. Tendo em vista a já confirmada variabilidade de composição do óleo de copaíba na literatura e que foi demonstrada no Capítulo 2. A conclusão de “não conformidade” obtida pelo fato dessas amostras não se encontrarem dentro da área de aceitação, sugere que essas amostras possuem composição distinta das utilizadas para o desenvolvimento do método. É importante observar que, se por um lado esse resultado pode ser interpretado como um erro, também revela que o método foi capaz de identificar OC com composição distinta dos óleos utilizados na fase de treinamento, o que pode ser empregado para identificar OC de outras regiões ou espécies de *Copaiferas*. Por fim, caso amostras com essas características forem incluídas na fase de treinamento, estas tenderão a serem identificadas dentro da área de aceitação.

De forma geral, as amostras pertencentes aos subconjuntos (OCSC, OCET e OCCP), apresentaram uma boa performance de acordo com as figuras de mérito avaliadas apresentando uma taxa de sensibilidade conjunta de aproximadamente 95 % de classificação correta.

Na avaliação dos subconjuntos não pertencentes à classe alvo e que estavam adulteradas com teores distintos e adulterantes conhecidos (◊ OCAD, ◊ OCAO, ◊ OCOG, ◊ OCOL e ◊ OCOS), apenas 3 amostras com menor nível de adulteração apresentaram um erro falso positivo (vide Tabela 6-3 e Figura 6-6), o que resultou em uma taxa de especificidade para o modelo de aproximadamente 96 %. Foi observado ainda que o distanciamento da área de aceitação, indicado pela seta na cor preta na Figura 6-7, estava diretamente relacionado com o aumento do teor de adulterante, independentemente do tipo de óleo usado na adulteração.

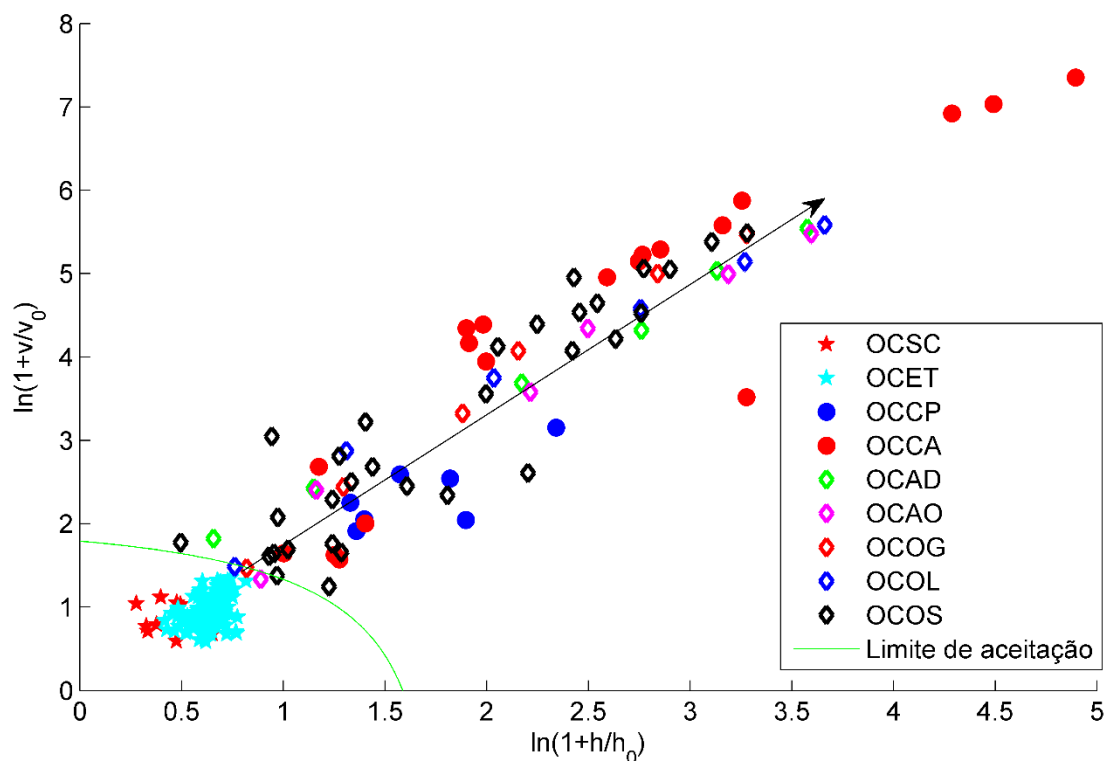


Figura 6-7 - Identificação de tendência no posicionamento espacial das amostras adulteradas em laboratório, indicado pela seta na cor preta.

No que se refere ao subconjunto de amostras comerciais adulteradas (● OCCA), todas as amostras foram identificadas como adulteradas com triacilgliceróis por CG-EM e pelo método por NIR e DD-SIMCA. Não são conhecidos os triacilgliceróis utilizados para tal fim, assim como seus teores de adulteração, pois não foram realizadas quantificações por CG-EM. Desta forma, não é possível afirmar que as amostras desse subconjunto, tendem a ter seu teor de adulteração aumentado à medida que as mesmas se distanciam do limite de aceitação.

6.3 CONCLUSÕES

O método se mostrou eficiente e com sensibilidade e especificidade suficientes para a sua aplicação em cooperativas e controles de qualidade.

6 – Desenvolvimento de um método para identificar a autenticidade de Óleos de Copaíba, com o uso de espectroscopia NIR E DD-SIMCA.

A não classificação das amostras OCCP como pertencentes à classe alvo, indica que o método apresenta sensibilidade para diferenciar amostras genuínas de espécies diferentes ou com origem geográfica distinta, sugerindo que é possível utilizar modelos para regiões de coleta diferentes.

As cooperativas de extrativistas que comercializam o óleo de copaíba, assim como os grandes compradores comerciais desse óleo, são potenciais utilizadores dessa tecnologia de classificação, o que pode minimizar a compra de amostras adulteradas por cooperativas, assim como pela população de modo geral.

7 CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos realizados nessa tese resultaram na proposta de dois métodos distintos, um para determinação da pureza e outro para identificar a autenticidade de OC, que se mostraram muito eficientes para aplicação em controle de qualidade por cooperativas e órgãos de fiscalização. Esses métodos empregaram a espectroscopia NIR, que consiste de uma instrumentação com custo aproximado de US\$ 12.000,00, que é muito inferior ao custo de um CG-EM (US\$ 120.000,00). Além disso, os métodos são consideravelmente mais rápidos que os que empregam cromatografia, não requerem preparo de amostra e não geram resíduos químicos para o meio ambiente.

Além dos métodos citados no parágrafo anterior, foi constatada uma grande estabilidade do OC frente a estresse induzido por temperatura ao longo de dez semanas. Esse resultado indica que os óleos de copaíba autênticos que sejam normalmente vendidos à população em feiras, não devem sofrer degradação por exposição ao sol em um período curto de tempo. O que contribui para o aumento da segurança da população e do comércio desses óleos.

O uso da quimiometria aliada às técnicas NIRS e CG-EM se mostrou muito eficiente e promissor no propósito de auxiliar o controle de qualidade do óleo de copaíba, cujo Brasil é um grande produtor.

7.1 Perspectivas futuras

Como perspectivas futuras para este tipo de controle, há a necessidade de aumentar a diversidade dos óleos de copaíba inseridos na calibração/treinamento dos métodos desenvolvidos, visando sempre a ampliação da robustez dos mesmos.

Fazer a divulgação dos métodos desenvolvidos nesta tese, para as cooperativas, compradores, exportadores e órgãos de controle, no sentido

disponibilizar os métodos desenvolvidos, ampliando o controle de qualidade do óleo copaíba, aumentando a segurança dos consumidores finais.

Pesquisar e testar outras técnicas e instrumentos analíticos que associados à quimiometria possam melhorar este controle e reduzir ainda mais os custos das análises do óleo de copaíba.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] V. F. Veiga Jr., M. L. Patitucci e A. C. Pinto, “CONTROLE DE AUTENTICIDADE DE ÓLEOS DE COPAÍBA COMERCIAIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO,” *Quim. Nova*, vol. 20, nº 6, pp. 612-615, 1997.
- [2] I. D. v. d. Werf, K. J. v. d. Berg, S. Schmitt e J. J. Boon, “Molecular Characterization of Copaiba Balsam as Used in Painting Techniques and Restoration Procedures,” *Studies in Conservation*, vol. 45, nº 1, pp. 1-18, 2000.
- [3] A. F. F. d. Vasconcelos e O. E. S. Godinho, “Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaiba,” *Quim. Nova*, vol. 25, nº No. 6B, pp. 1057-1060, 2002.
- [4] M. R. R. Tappin, J. F. G. Pereira, L. A. Lima, A. C. Siani, J. L. Mazzei e M. F. S. Ramos, “ANÁLISE QUÍMICA QUANTITATIVA PARA A PADRONIZAÇÃO DO ÓLEO DE COPAÍBA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO,” *Quim. Nova*, vol. 27, nº 2, pp. 236-240, 2004.
- [5] V. Veiga Jr. e A. Pinto, “Utilização do Monitoramento Seletivo de Íons como Ferramenta para a Detecção de Adulterações em Óleos de Copaíba,” *Revista Fitos*, vol. 1, nº 1, pp. 52-55, 2005.
- [6] V. F. Veiga Jr. e A. C. Pinto, “O GÊNERO *Copaifera* L.,” *Quim. Nova*, vol. 25, pp. 273-286, 2002.
- [7] JBRJ, “Flora do Brasil 2020,” [Online]. Available: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. [Acesso em 01 03 2018].
- [8] T. M. Rodrigues, S. d. P. Teixeira e S. R. Machado, “The oleoresin

- secretory system in seedlings and adult plants of copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae-Caesalpinioideae),” *Flora*, vol. 206, pp. 585-594, 2011.
- [9] M. W. Biavatti, D. Dossin, F. C. Deschamps e M. d. P. Lima, “Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para seu controle de qualidade,” *Braz. J. Pharmacogn.*, vol. 16, nº 2, pp. 230-235, 2006.
- [10] F. Pieri, M. Mussi e M. Moreira, “Óleo de coapíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais,” *Rev. Bras. Pl. Med.*, vol. 11, nº 4, pp. 465-472, 2009.
- [11] K. d. S. Barbosa e V. V. Scudeller, “Distribuição das espécies do gênero *Copaifera* L. na Amazônia Legal e aspectos morfológicos de *C. multijuga* Hayne da Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé, Manaus-Am,” em *Biotupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central*, vol. 2, Manaus, AM: UEA Edições, 2009, pp. 135-142.
- [12] A. C. M. d. Carvalho, M. L. M. Freitas, S. M. B. Moraes, M. L. T. d. Moraes, V. Stranghetti, A. L. Alzate-Marin e A. M. Sebbenn, “Diversidade genética, endogâmica e fluxo gênico em pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii*,” *Revista Brasil. Bot.*, vol. 33, nº 4, pp. 599-606, 2010.
- [13] Missouri Botanical Garden, “<<http://www.tropicos.org/Name/13008408>>,” Missouri Botanical Garden, 2016. [Online]. [Acesso em 25 maio 2016].
- [14] M. N. d. S. Rios e F. Pastore Jr., “Plantas da Amazônia : 450 espécies de uso geral,” Brasília, 2011.
- [15] R. B. d. Sousa, R. A. O. Silva, L. G. A. Marques, L. S. Morais, M. R. d.

- M. C. Santos e C. d. Ó. Pessoa, “Aplicações do Óleo Resina de *Copaífera* L. na Medicina Popular: Uma Prospecção Tecnológica,” vol. 3, nº 1, pp. 144-155, 2012.
- [16] A. Pinto, P. Amaral, C. Gaia e W. d. Oliveira, *Boas práticas para manejo florestal e agroindustrial de produtos florestais não madeireiros: açaí, andiroba, babaçu, castanha-do-brasil, copaíba e unha-de-gato*, Manaus - AM: Imazon, 2010, pp. 122-139.
- [17] K. d. S. BARBOSA, V. V. SCUDELLER e A. L. ROSA, “Potencial de produção de óleo resina de *Copaífera multijuga* Hayne nos dois períodos climáticos amazônicos na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé, Manaus-AM,” em *Biotupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central volume 2*, Manaus, AM: UEA Edições, 2009, pp. 143-153.
- [18] K. d. S. Barbosa, M. Yoshida e V. V. Scudeller, “Detection of adulterated copaiba (*Copaífera multijuga* Hayne) oil-resins by refractive index and thin layer chromatography,” *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, pp. 57-60, Jan./Mar. 2009.
- [19] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, “Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA,” IBGE, 2016. [Online]. Available: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pevs/default.asp?o=30&i=P>. [Acesso em 10 Novembro 2017].
- [20] P. C. S. Barbosa, L. S. M. Wiedemann, R. d. S. Medeiros, P. d. T. B. Sampaio, G. Vieira e V. F. d. Veiga-Junior, “Phytochemical Fingerprints of Copaiba Oils (*Copaífera multijuga* Hayne) Determined by Multivariate Analysis,” *Chemistry & Biodiversity*, vol. 10, pp. 1350-1360, 2013.
- [21] O. C. Rigamonte-Azevedo, P. G. S. Wadt e L. H. d. O. Wadt, *Copaíba:*

Ecologia e produção de óleo-resina, Rio Branco - AC, 2004, p. 28p..

- [22] J. P. B. Sousa, A. P. Brancalion, A. B. Souza, I. C. Turatti, S. R. Ambrósio, . N. A. Furtado, . N. P. Lopes e J. K. Bastos, "Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 54, pp. 653-659, 2011.
- [23] P. C. S. Barbosa, R. S. Medeiros, P. T. B. Sampaio, G. Vieira, L. S. M. Wiedemann e V. F. Veiga-Junior, "Influence of Abiotic Factors on the Chemical Composition of Copaiba Oil (*Copaifera multijuga* Hayne): Soil Composition, Seasonality and Diameter at Breast Height," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 23, nº 10, pp. 1823-1833, 2012.
- [24] R. Lama, B. Zhong, D. G. Kulman e B. Su, "Bioassay guided identification of small chaperone proteins α -crystallin and Hsp27 inhibitors from Copaiba oil," *Phytochemistry Letters*, vol. 10, pp. 65-75, 2014.
- [25] V. Cascon e B. Gilbert, "Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne," *Phytochemistry*, vol. 55, pp. 773-778, 2000.
- [26] V. Veiga Junior, E. Rosas, M. Carvalho, M. Henriques e A. C. Pinto, "Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 112, p. 248–254, 2007.
- [27] A. G. Barreto Júnior, E. C. Biscaia Júnior, V. F. d. Veija Jr., A. C. Pinto, S. F. d. Carvalhaes e M. A. M. Maciel, "Cromatografia de troca-ionica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e da sacaca (*Croton cajucara*)," *Quim. Nova*, vol. 28, nº 4, pp. 719-722, 2005.

- [28] E. d. C. Rodrigues, A. M. Ferreira, J. C. Vilhena, F. B. Almeida, R. A. Cruz, A. C. Florentino, R. N. Souto, J. C. Carvalho e C. P. Fernandes, "Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin," *Rev Bras Farmacogn*, vol. 24, pp. 699-705, 2014.
- [29] D. K. R. Bardají, J. J. M. d. Silva, T. C. Bianchi, D. d. S. Eugênio, P. F. d. Oliveira, L. F. Leandro, H. L. G. Rogez, R. C. S. Venezianni, S. R. Ambrosio, D. C. Tavares, J. K. Bastos e C. H. G. Martins, "Copaifera reticulata oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens," *Anaerobe*, vol. 40, pp. 18-27, 2016.
- [30] V. R. d. A. Borges, J. H. d. Silva, S. S. Barbosa, L. E. Nasciutti, L. M. Cabral e V. P. d. Sousa, "Development and pharmacological evaluation of in vitro nanocarriers composed of lamellar silicates containing copaiba oil-resin for treatment of endometriosis," *Materials Science and Engineering C*, vol. 64, pp. 310-317, 2016.
- [31] C. A. Marangon, V. C. Martins, P. M. Leite, D. A. Santos, M. Nitschke e A. M. G. Plepis, "Chitosan/gelatin/copaiba oil emulsion formulation and its potential on controlling the growth of pathogenic bacteria," *Industrial Crops and Products*, vol. 99, pp. 163-171, 2017.
- [32] D. A. Skoog, F. J. Holler e T. A. Nieman, *Princípios de ANÁLISE INSTRUMENTAL*, 5ª ed., São Paulo, SP: BOOKMAN, 2002.
- [33] A. L. G. Degani, Q. B. Cass e P. C. Vieira, "Cromatografia um breve ensaio," *Química Nova na Escola*, nº nº 7, pp. 21-25, 1998.
- [34] L. Hartman e R. C. Lago, *Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids*, 1973, pp. 475-476.

- [35] G. Steigenberger e C. Herm, "Natural resins and balsams from an eighteenth-century pharmaceutical collection analysed by gas chromatography/mass spectrometry," *Anal Bioanal Chem*, nº 401, p. 1771–1784, 2011.
- [36] K. N. Basri, M. N. Hussain, J. Bakar, Z. Sharif, M. F. A. Khir and A. S. Zoolfakar, "Classification and quantification of palm oil adulteration via portable NIR spectroscopy," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 173, pp. 335-342, 2017.
- [37] S. Laroussi-Mezghani, P. Vanloot, J. Molinet, N. Dupuy, M. Hammami, N. Grati-Kamoun e J. Artaud, "Authentication of Tunisian virgin olive oils by chemometric analysis of fatty acid compositions and NIR spectra. Comparison with Maghrebian and French virgin olive oils," *Food Chemistry*, vol. 173, pp. 122-132, 2015.
- [38] E. M. Paiva, J. J. R. Rohwedder, C. Pasquini, M. F. Pimentel and C. F. Pereira, "Quantification of biodiesel and adulteration with vegetable oils in diesel/biodiesel blends using portable near-infrared spectrometer," *Fuel*, vol. 160, pp. 57-63, 2015.
- [39] G. B. d. Costa, D. D. S. Fernandes, A. A. Gomes, V. E. d. Almeida e G. Veras, "Using near infrared spectroscopy to classify soybean oil according to expiration date," *Food Chemistry*, vol. 196, p. 539–543, 2016.
- [40] S. Lafhal, P. Vanloot, I. Bombarda, J. Kister e N. Dupuy, "Chemometric analysis of French lavender and lavandin essential oils by near infrared spectroscopy," *Industrial Crops and Products*, vol. 80, pp. 156-164, 2016.
- [41] M. M. C. Ferreira, *Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações*, Campinas: Editora da Unicamp, 2015.
- [42] R. E. Bruns e J. F. G. Faigle, "Quimiometria," *Quim. Nova*, vol. 8, nº 2,

pp. 84-89, 1985.

- [43] B. d. B. Neto, I. S. Scarmínio e R. E. Bruns, “25 Anos de Quimiometria no Brasil,” *Quim. Nova*, vol. 29, nº 6, 2006.
- [44] A. L. Pomerantsev, *Chemometrics in Excel*, New Jersey: Wiley, 2014.
- [45] R. J. Poppi e A. M. d. Souza, “EXPERIMENTO DIDÁTICO DE QUIMIOMETRIA PARA ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS: UM TUTORIAL, PARTE I,” *Quim. Nova*, vol. 35, nº 1, pp. 223-229, 2012.
- [46] D. J. Bartholomew, F. Steele, I. Moustaki e J. I. Galbraith, “Analysis of multivariate social science data,” em *Analysis of multivariate social science data*, Second Edition ed., Boca Raton, CRC Press, 2008.
- [47] E. R. Pereira Filho, *Planejamento fatorial em química*, São Carlos - SP: EduUfSCar, 2017.
- [48] E. Szymanska, J. Gerretzen, J. Engel, B. Geurts, L. Blanchet e L. M. Buydens, “Chemometrics and qualitative analysis have a vibrant relationship,” *Trends in Analytical Chemistry*, nº 69, pp. 34-51, 2015.
- [49] M. H. Ahmad, M. Nache, S. Waffenschmidt e B. Hitzmann, “A fluorescence spectroscopic approach to predict analytical, rheological and baking parameters of wheat flours using chemometrics,” *Journal of Food Engineering*, nº 182, pp. 65-71, 2016.
- [50] S. Abou-el-karam, J. Ratel, N. Kondjoyan, C. Truan e E. Engel, “Marker

- discovery in volatolomics based on systematic alignment of GC-MS signals: Application to food authentication,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 991, pp. 58-67, 2017.
- [51] N.-P. V. Nielsen, J. M. Carstensen e J. Smedsgaard, “Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised,” *Journal of Chromatography A*, vol. 805, pp. 17-35, 1998.
- [52] G. Tomasi, F. van den Berg e C. Andersson, “Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data,” *JOURNAL OF CHEMOMETRICS*, vol. 18, pp. 231-241, 2004.
- [53] G. Tomasi, F. Savorani e S. B. Engelsen, “Icoshift: An effective tool for the alignment of chromatographic data,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, p. 7832–7840, 2011.
- [54] A. M. d. Souza e R. J. Poppi, “EXPERIMENTO DIDÁTICO DE QUIMIOMETRIA PARA ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS: UM TUTORIAL, PARTE I,” *Quim. Nova*, vol. 35, nº 1, pp. 223-229, 2012.
- [55] B. M. Wise, N. B. Gallagher, R. Bro, J. M. Shaver, W. Windig e R. S. Koch, *Chemometrics Tutorial for PLS_Toolbox and Solo*, Wenatchee, WA: Eigenvector Research, Inc., 2006, p. 414.
- [56] W. Windig, J. Shaver e R. Bro, “Loopy MSC: A Simple Way to Improve Multiplicative Scatter,” *Applied Spectroscopy*, vol. 62, nº 10, pp. 1153-1159, 2008.
- [57] T. Isaksson e T. Naes , “The Effect of Multiplicative Scatter Correction

- (MSC) and Linearity Improvement in NIR Spectroscopy,” *Applied Spectroscopy*, vol. 42, nº 7, pp. 1273-1284, 1988.
- [58] C. J. G. Colares, *Estudo da homogeneidade e discriminação de madeiras através de espectroscopia de imagens, imagens digitais e ferramentas quimiométricas*, Brasília: Universidade de Brasília - UnB, 2016, p. 159.
- [59] J. P. A. Martins e M. M. C. Ferreira, “QSAR MODELING: UM NOVO PACOTE COMPUTACIONAL OPEN SOURCE PARA GERAR E VALIDAR MODELOS QSAR,” *Quim. Nova*, vol. 36, nº 04, pp. 554-560, 2013.
- [60] P. J. Gemperline, K. S. Booksh, J. H. Kalivas, S. D. Brown, B. K. Lavine, C. E. Davidson, M. Maeder, A. de Juan, Y.-M. Neuhold, K. Stoyanov, R. Tauler, M. Hubert e A. D. Walmsley, *Practical guide to chemometrics*, 2ª ed., P. J. Gemperline, Ed., Boca Raton, FL: CRC Press, 2006, pp. 69-104.
- [61] S. N. Thennadil, M. Dewar, C. Herdsman, A. Nordon e E. Becker, “Automated weighted outlier detection technique for multivariate data,” *Control Engineering Practice*, vol. 70, pp. 40-49, 2018.
- [62] P. J. Rousseeuw, M. Debruyne, S. Engelen e M. Hubert, “Robustness and Outlier Detection in Chemometrics,” *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 36, pp. 221-242, 2006.
- [63] R. A. Johnson e D. W. Wichern, *Applied Multivariate Statistical Analysis*, 6ª ed., Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2007, p. 773.
- [64] A. Borin e R. J. Poppi, “Multivariate Quality Control of Lubricating Oils Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy,” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 15, nº 4, pp. 570-576, 2004.
- [65] A. R. Martins, *Desenvolvimento de método para discriminação entre*

marcas de uísque e identificação de adulteração por espectroscopia UV-Vis e PLS-DA, Brasília: Universidade de Brasília - UnB, 2015.

- [66] D. Garcia-Alvarez e M. Fuente, “Estudio comparativo de técnicas de detección de fallos basadas en el Análisis de Componentes Principales (PCA),” *Revista Iberoamericana de Automática e Informática industrial*, vol. 8, pp. 182-195, 2011.
- [67] M. M. Ferreira, A. M. Antunes, M. S. Melgo e P. L. Volpe, “QUIMIOMETRIA I: CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA, UM TUTORIAL,” *Quim. Nova*, vol. 25, nº 5, pp. 724-731, 1999.
- [68] A. P. d. Cunha Jr, V. d. P. P. d. Cunha, L. Silveira Jr e A. A. Martin, “MODELO DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METILMETACRILATO EM SOLUÇÃO AQUOSA UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA,” *Quim. Nova*, vol. 26, nº 6, pp. 850-854, 2003.
- [69] R. F. Teófilo, *Métodos Quimiométricos: Uma Visão Geral - Conceitos básicos de quimiometria*, vol. 1, Viçosa: UFV, 2013.
- [70] M. Pérez-Rodríguez, I. Horák-Terra, L. Rodríguez-Lado e A. M. Cortizas, “Modelling mercury accumulation in minerogenic peat combining FTIR-ATR spectroscopy and partial least squares (PLS),” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 168, p. 65–72, 2016.
- [71] A. J. Fernández-Espinosa, “Combining PLS regression with portable NIR spectroscopy to on-line monitor quality parameters in intact olives for determining optimal harvesting time,” *Talanta*, vol. 148, pp. 216-228, 2016.
- [72] M. M. C. Ferreira, “Multivariate QSAR,” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 13, nº 6, pp. 742-753, 2002.

- [73] N. Nagata, M. I. M. S. Bueno e P. G. Peralta-Zamora, "MÉTODOS MATEMÁTICOS PARA CORREÇÃO DE INTERFERÊNCIAS ESPECTRAIS E EFEITOS INTERELEMENTOS NA ANÁLISE QUANTITATIVA POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X," *Quim. Nova*, vol. 24, nº 4, pp. 531-539, 2001.
- [74] R. G. Brereton, *Chemometrics : data analysis for the laboratory and chemical plant*, University of Bristol, UK, 2003.
- [75] J. Ferré, R. Boqué, B. Fernández-Band, M. Larrechi e F. Rius, "Figures of merit in multivariate calibration. Determination of four pesticides in water by flow injection analysis and spectrophotometric detection," *Analytica Chimica Acta*, vol. 348, pp. 167-175, 1997.
- [76] A. A. d. Santos Junior, *Determinação de parâmetros de óleos lubrificantes de motores do ciclo Otto e ciclo Diesel através da espectroscopia no infravermelho, métodos multivariados e cartas de controle*, Brasília: Universidade de Brasília - UnB, 2011.
- [77] J. W. B. Braga, A. A. d. Santos Junior e I. S. Martins, "Determination of viscosity index in lubricant oils by infrared spectroscopy and PLSR," *Fuel*, vol. 120, pp. 171-178, 2014.
- [78] J. W. B. Braga e R. J. Poppi, "VALIDAÇÃO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA: UMA APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE PUREZA POLIMÓRFICA DE CARBAMAZEPINA POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO," *Quim. Nova*, vol. 27, nº 6, pp. 1004-1011, 2004.
- [79] T. S. Grobério, J. J. Zacca, M. Talhavini and J. W. Braga, "Quantification of Cocaine Hydrochloride in Seized Drug Samples by Infrared Spectroscopy and PLSR," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 25, pp. 1696-1703,

- 2014.
- [80] M. Ortiz, L. Sarabia, A. Herrero, M. Sánchez, M. Sanz, M. Rueda, D. Giménez and M. Meléndez, "Capability of detection of an analytical method evaluating false positive and false negative (ISO 11843) with partial least squares," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 69, pp. 21-33, 2003.
- [81] ISO 11843, *Capability of Detection*, Geneva, 2000.
- [82] I. García, L. A. Sarabia e M. C. Ortiz, "Detection capability of tetracyclines analysed by a fluorescence technique: comparison between bilinear and trilinear partial least squares models," *Analytica Chimica Acta*, vol. 501, pp. 193-203, 2004.
- [83] J. Riu e F. X. Rius, "Method comparison using regression with uncertainties in both axes," *trends in analytical chemistry*, vol. 16, nº 4, pp. 211-216, 1997.
- [84] Y. Zontov, O. Rodionova, S. Kucheryavskiy e A. Pomerantsev, "DD-SIMCA – A MATLAB GUI tool for data driven SIMCA approach," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 167, pp. 23-28, 2017.
- [85] O. Rodionova, K. Balyklova, A. Titova e A. Pomerantsev, "Quantitative risk assessment in classification of drugs with identical API content," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 98, pp. 186-192, 2014.
- [86] A. L. Pomerantsev e O. Y. Rodionova, "Concept and role of extreme objects in PCA/SIMCA," *Journal of Chemometrics*, vol. 28, p. 429–438, 2014.
- [87] A. L. Pomerantsev, "Acceptance areas for multivariate classification derived by projection methods," *Journal of Chemometrics*, vol. 22, pp. 601-

- 609, 2008.
- [88] O. Y. Rodionova, P. Oliveri e A. L. Pomerantsev, "Rigorous and compliant approaches to one-class classification," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 159, pp. 89-96, 2016.
- [89] Y. Zontov, "Github," [Online]. Available: <https://github.com/yzontov/dd-simca>.
- [90] L. Pieszczek, H. Czarnik-Matusewicz e M. Daszykowski, "Identification of ground meat species using near-infrared spectroscopy and class modeling techniques – Aspects of optimization and validation using a one-class classification model," *Meat Science*, vol. 139, pp. 15-24, 2018.
- [91] P. Oliveri, "Class-modelling in food analytical chemistry: Development, sampling, optimisation and validation issues e A tutorial," *Analytica Chimica Acta*, vol. 982, pp. 9-19, 2017.
- [92] J. S. d. Souza e M. F. Ferrão, "Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I : Dosagem por regressão multivariada," *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, vol. 42, nº 3, pp. 437-445, jul./set. 2006.
- [93] L. M. Kandpal, J. Tewari, N. Gopinathan, J. Stolee, R. Strong, P. Boulas e B.-K. Cho, "Quality assessment of pharmaceutical tablet samples using Fourier transform near infrared spectroscopy and multivariate analysis".
- [94] Y. Zontov, K. Balyklova, A. Titova, O. Rodionova and A. Pomerantsev, "Chemometric aided NIR portable instrument for rapid assessment of medicine quality," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 131, pp. 87-93, 2016.

- [95] E. J. N. Marques, S. T. d. Freitas and M. F. Pimentel, "Rapid and non-destructive determination of quality parameters in the 'Tommy Atkins' mango using a novel handheld near infrared spectrometer," *Food Chemistry*, vol. 197, pp. 1207-1214, 2016.
- [96] J. Zhong e X. Qin, "Rapid Quantitative Analysis of Corn Starch Adulteration in Konjac Glucomannan by Chemometrics-Assisted FT-NIR Spectroscopy," *Food Anal. Methods*, vol. 9, pp. 61-67, 2016.
- [97] M.-T. Sánchez, D. Pérez-Marín, I. Torres, B. Gil, A. Garrido-Varo e M.-J. D. I. Haba, "Use of NIRS technology for on-vine measurement of nitrate content and other internal quality parameters in intact summer squash for baby food production," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 125, pp. 122-128, 2017.
- [98] O. M. Lutz, G. K. Bonn, B. M. Rode and C. W. Huck, "Reproducible quantification of ethanol in gasoline via a customized mobile near-infrared spectrometer," *Analytica Chimica Acta*, vol. 826, pp. 61-68, 2014.
- [99] S. P. Nunes, "Produção e consumo de óleos vegetais no Brasil," 2007.
- [100] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, EN ISO 5509: animal and vegetable fats and oils: preparation of methyl esters of fatty acids, London: International Organization for Standardization, 1978.
- [101] M. C. Milinsk, M. Matsushita, J. V. Visentainer, C. C. d. Oliveira e N. E. d. Souza, "Comparative Analysis of Eight Esterification Methods in the Quantitative Determination of Vegetable Oil Fatty Acid Methyl Esters (FAME)," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 19, nº 8, pp. 1475-1483, 2008.

-
- [102] C. Pasquini, "Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 14, nº 2, pp. 198-219, 2003.
- [103] M. Blanco e M. Romero, "Near infrared transfectance spectroscopy Determination of dexketoprofen in a hydrogel," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 30, p. 467–472, 2002.
- [104] M. V. Cruz, M. C. Sarraguça, F. Freitas, J. A. Lopes e M. A. Reis, "Online monitoring of P(3HB) produced from used cooking oil with near-infrared spectroscopy," *Journal of Biotechnology*, vol. 194, pp. 1-9, 2015.
- [105] J. Workman Jr., *The Handbook of Organic Compounds - Functional groupings and calculated locations in nanometers (nm) for NIR spectroscopy*, vol. 1, San Diego: Academic Press, 2001, pp. 183-191.
- [106] J. Workman Jr. and L. Weyer, "Alkenes and Alkynes," in *Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretative Near-Infrared Spectroscopy*, Second ed., Boca Raton, FL, CRC Press, 2012, pp. 33-37.
- [107] J. Ma, H. Zhang, T. Tuchida, Y. Miao and J. Y. Chen, "Rapid Determination of Degradation of Frying Oil Using Near-Infrared Spectroscopy," *Food Science and Technology Research*, vol. 20, no. 2, pp. 217-223, 2014.
- [108] E. OLIVEIRA, O. LAMEIRA e M. ZOGHBI, "Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA," *Rev. Bras. Pl. Med.*, vol. 8, nº 3, pp. 14-23, 2006.
- [109] M. F. d. S. Ramos, *Desenvolvimento de microcapsulascontendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica*, Ribeirão Preto, São Paulo, 2006.

- [110] F. S. Panero, M. F. P. Vieira, Â. M. F. Cruz, M. F. V. Moura e H. E. B. da Silva, “Aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco,” *Ecl. Quim.*, vol. 34, nº 3, pp. 33-40, 2009.
- [111] Y. Huo, G. M. Kamal, J. Wang, H. Liu, G. Zhang, Z. Hu, F. Anwar e H. Du, “¹H NMR-based metabolomics for discrimination of rice from different geographical origins of China,” *Journal of Cereal Science*, vol. 76, pp. 243-252, 2017.
- [112] L. M. d. Souza, R. R. Rodrigues, H. Santos, H. B. Costa, B. B. Merlo, P. R. Filgueiras, R. J. Poppi, B. G. Vaz e W. Romão, “A survey of adulterants used to cut cocaine in samples seized in the Espírito Santo State by GC–MS allied to chemometric tools,” *Science and Justice*, vol. 56, nº 2, pp. 73-79, 2016.
- [113] V. d. M. Prata, E. S. Emídio e H. S. Dórea, “APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS NA CARACTERIZAÇÃO DE CHARUTOS UTILIZANDO EXTRAÇÃO POR DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS,” *Quim. Nova*, vol. 34, nº 1, pp. 53-58, 2011.
- [114] R. M. Correia, F. Tosato, E. Domingos, R. R. Rodrigues, L. F. M. Aquino, P. R. Filgueiras, V. Lacerda Jr. e W. Romão, “Portable near infrared spectroscopy applied to quality control of Brazilian coffee,” *Talanta*, vol. 176, pp. 59-68, 2018.
- [115] Q. Peng, X. Xu, W. Xing, B. Hu, C. Shen, R. Tian, X. Li, Q. Xu, J. Chen, F. Chen, H. Zou e G. Xie, “Ageing status characterization of Chinese spirit using scent characteristics combined with chemometric analysis,” *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 44, pp. 212-216, 2017.

- [116] H. H. Gan, B. Yan, R. S. Linforth e I. D. Fisk, "Development and validation of an APCI-MS/GC-MS approach for the classification and prediction of Cheddar cheese maturity," *Food Chemistry*, vol. 190, pp. 442-447, 2016.
- [117] F. d. Santos, P. E. Trani, P. F. Medina e J. J. D. Parisi, "TESTE DE ENVELHECIMENTO ACELERADO PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SEMENTES DE ALFACE E ALMEIRÃO," *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 33, nº 2, pp. 322-323, 2011.
- [118] W. M. Nascimento, R. A. d. Freitas, E. M. L. Gomes e A. S. Aline SSoares, "Metodologia para o teste de envelhecimento acelerado em sementes de ervilha," *Hortic. bras.*, vol. 25, nº 2, pp. 205-209, 2007.
- [119] A. C. A. MIGUEL, S. ALBERTINI e M. H. F. SPOTO, "Cinética da degradação de gelejada de morango," *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, vol. 29, nº 1, pp. 142-147, 2009.
- [120] Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, *Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos*, Brasília: Anvisa, 2004.
- [121] Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, *Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade de produtos farmacêuticos*, Brasília: Anvisa, 2004.
- [122] H.-S. Choi e M. Sawamura, "Effects of Storage Conditions on the Composition of Citrus tamurana Hort. ex Tanaka (Hyuganatsu) Essential Oil," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 66 (2), pp. 439-443, 2002.
- [123] M. F. d. S. Ramos, *Desenvolvimento de microcapsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica*, Ribeirão Preto, São Paulo: USP, 2006.

- [124] A. M. K. PEDRO, *DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO MULTIVARIADO ACELERADO PARA DETERMINAÇÃO DO PRAZO DE VALIDADE DE PRODUTOS UNINDO QUIMIOMETRIA E CINÉTICA QUÍMICA*, Campinas: Unicamp, 2009.
- [125] Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Farmacopéia Brasileira*, vol. 1, Brasília, 2010.
- [126] D. T. Oliveira, "Determinação de misturas líquidas binárias através do viscosímetro capilar de Cannon-Fenske," *Revista de Ciências Exatas e Tecnológicas*, vol. 7, nº 7, pp. 85-96, 2012.
- [127] R. Berg e J. Bergman, "Synthesis of thieno[2,3-b]indole-2,3-diones and their ring expansions induced by diazomethane," *Tetrahedron*, vol. 73, pp. 5654-5658, 2017.
- [128] F. Caruso, S. Orecchio, M. G. Cicero e C. Di Stefano, "Gas chromatography–mass spectrometry characterization of the varnish and glue of an ancient 18th century double bass," *Journal of Chromatography A*, vol. 1147, pp. 206-212, 2007.
- [129] U. Baumer, P. Dietemann e J. Koller, "Identification of resinous materials on 16th and 17th century reverse-glass objects by gas chromatography/mass spectrometry," *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 284, pp. 131-141, 2009.
- [130] A. H. El-Hamdy e W. W. Christie, "Preparation of methyl esters of fatty acids with trimethylsulphonium hydroxide - an appraisal," *Journal of Chromatography*, vol. 630, pp. 438-441, 1993.
- [131] W. Butte, "Rapid method for the determination of fatty acid profiles from fats and oils using trimethylsulphonium hydroxide for transesterification," *Journal of Chromatography A*, vol. 261, pp. 142-145, 1983.

- [132] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, *ISO 12966-3:2016 - Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters - Part 3: Preparation of methyl esters using trimethylsulfonium hydroxide (TMSH)*, Geneva: International Organization for Standardization, 2016.
- [133] G. Steigenberger, *The Vigani Cabinet – Analysis of historical resinous materials by gas chromatography - mass spectrometry and infrared spectroscopy*, Dresden: University of Dresden, 2013.
- [134] M. Sköld, A.-T. Karlberg, M. Matura e A. Börje, “The fragrance chemical b-caryophyllene—air oxidation and skin sensitization,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 44, pp. 538-545, 2006.
- [135] H.-S. Choi e M. Sawamura, “Effects of Storage Conditions on the Composition of Citrus tamurana Hort. ex Tanaka (Hyuganatsu) Essential Oil,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 66 (2), pp. 439-443, 2002.
- [136] A. v. Eijck, T. Opatz, D. Taraborrelli, R. Sander e T. Hoffmann, “New tracer compounds for secondary organic aerosol formation from b-caryophyllene oxidation,” *Atmospheric Environment*, vol. 80, pp. 122-130, 2013.
- [137] A.-T. KARLBERG e A. DOOMS-GOOSSENS, “Contact allergy to oxidized d-limonene among dermatitis patients,” *Contact Dermatitis*, vol. 36, pp. 201-206, 1997.

- [138] N. Gopalakrishnan, "Studies on the Storage Quality of CO₂-Extracted Cardamom and Clove Bud Oils," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 42, pp. 796-798, 1994.
- [139] M. L. F. Simeone, R. A. Parrella, R. E. Schaffert, C. M. Damasceno, M. C. Leal e C. Pasquini, "Near infrared spectroscopy determination of sucrose, glucose and fructose in sweet sorghum juice," *Microchemical Journal*, vol. 134, pp. 125-130, 2017.
- [140] A. C. d. O. Moreira, Â. H. d. L. Machado, F. V. d. Almeida e J. W. B. Braga, "Rapid Purity Determination of Copaiba Oils by a Portable NIR Spectrometer and PLSR," *Food Analytical Methods*, 2017.
- [141] J. C. P. Penteado, D. Magalhães e J. C. Masini, "Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental," *Quim. Nova*, vol. 31, nº 8, pp. 2190-2193, 2008.
- [142] M. Esteki, B. Farajmand, S. Amanifar, R. Barkhordari, Z. Ahadiyan, E. Dashtaki, M. Mohammadlou e Y. V. Heyden, "Classification and authentication of Iranian walnuts according to their geographical origin based on gas chromatographic fatty acid fingerprint analysis using pattern recognition methods," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 171, pp. 251-258, 2017.
- [143] D. Luo, Y. Liu, Y. Wang, X. Zhang, L. Huang e B. Duan, "Rapid identification of *Fritillariae Cirrhosae* Bulbus and its adulterants by UPLC-ELSD fingerprint combined with chemometrics methods," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 76, pp. 46-51, 2018.
- [144] S. Cui, J. Wang, L. Yang, J. Wu e X. Wang, "Qualitative and quantitative analysis on aroma characteristics of ginseng at different ages using E-nose and GC-MS combined with chemometrics," *Journal of*

Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 102, pp. 64-77, 2015.

- [145] R. Dong, J. Su, H. Nian, H. Shen, X. Zhai, H. Xin, L. Qin e T. Han, “Chemical fingerprint and quantitative analysis of flavonoids for quality control of Sea buckthorn leaves by HPLC and UHPLC-ESI-QTOF-MS,” *Journal of Functional Foods*, vol. 37, pp. 513-522, 2017.
- [146] Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, *Sub-rede de Dermocosméticos na Amazônia a partir do uso sustentável de sua biodiversidade com enfoques para as cadeias produtivas da: castanha-do-pará e dos óleos de andiróba e copaíba: 2007.*, Brasília, 2007.
- [147] O. Y. Rodionova, A. V. Titova e A. L. Pomerantsev, “Discriminant analysis is an inappropriate method of authentication,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 78, pp. 17-22, 2016.
- [148] M. Fidelis, J. S. Santos, A. L. K. Coelho, O. Y. Rodionova, A. Pomerantsev e D. Granato, “Authentication of juices from antioxidant and chemical perspectives: A feasibility quality control study using chemometrics,” *Food Control*, vol. 73, nº Part: B, pp. 796-805, 2017.
- [149] R. Rodríguez-Bermúdez, M. López-Alonso, M. Miranda, R. Fouz, I. Orjales e C. Herrero-Latorre, “Chemometric authentication of the organic status of milk on the basis of trace element content,” *Food Chemistry*, vol. 240, p. 686–693, 2018.
- [150] A. R. Martins, M. Talhavini, M. L. Vieira, J. J. Zacca e J. W. B. Braga, “Discrimination of whisky brands and counterfeit identification by UV–Vis spectroscopy and multivariate data analysis,” *Food Chemistry*, vol. 229, p. 142–151, 2017.

- [151] D. Yucesoy e B. Ozen, "Authentication of a Turkish traditional aniseed flavoured distilled spirit, raki," *Food Chemistry*, vol. 141, p. 1461–1465, 2013.
- [152] V. H. J. dos Santos, A. S. Ramos, J. P. Pires, P. d. M. Engelmann, R. V. Lourega, J. M. Ketzer e L. F. Rodrigues, "Discriminant analysis of biodiesel fuel blends based on combined data from Fourier Transform Infrared Spectroscopy and stable carbon isotope analysis," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 161, pp. 70-78, 2017.
- [153] P. Wang e Z. Yu, "Species authentication and geographical origin discrimination of herbal medicines by near infrared spectroscopy: A review," *Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 5, nº 5, pp. 277-284, 2015.
- [154] Á. D. Morales, A. C. Osorio, R. F. Fernández e E. L. Dennes, "Desarrollo de un modelo simca para la clasificación de kerosinas mediante el empleo de la espectroscopía infrarroja," *Quim. Nova*, vol. 31, nº 6, pp. 1573-1576,, 2008.
- [155] C. Mees, F. Souard, C. Delporte, E. Deconinck, P. Stoffelen, C. Stévigny, J.-M. Kauffmann e K. D. Braekeleer, "Identification of coffee leaves using FT-NIR spectroscopy and SIMCA," *Talanta*, vol. 177, pp. 4-11, 2018.
- [156] M. R. Almeida, C. H. Fidelis, L. E. Barata e R. J. Poppi, "Classification of Amazonian rosewood essential oil by Raman spectroscopy and PLS-DA with reliability estimation," *Talanta*, vol. 117, pp. 305-311, 2013.
- [157] L. F. Soares, D. C. d. Silva, M. C. J. Bergo, V. T. R. Coradin, J. W. B. Braga e T. C. M. Pastore, "AVALIAÇÃO DE ESPECTRÔMETRO NIR PORTÁTIL E PLS-DA PARA A DISCRIMINAÇÃO DE SEIS ESPÉCIES SIMILARES DE MADEIRAS AMAZÔNICAS," *Quim. Nova*, vol. 40, nº 4, pp. 418-426, 2017.

- [158] M. Pavlinek e V. Podgorelec, "Text classification method based on self-training and LDA topic models," *Expert Systems with Applications*, vol. 80, pp. 83-93, 2017.
- [159] Z.-L. He, J.-T. Xiong, R. Lin, X. Zou, L.-Y. Tang, Z.-G. Yang, Z. Liu e G. Song, "A method of green litchi recognition in natural environment based on improved LDA classifier," *Computers and Electronics in Agriculture*, vol. 140, pp. 159-167, 2017.
- [160] R. W. Kennard e L. A. Stone, "Computer Aided Design of Experiments," *Technometrics*, vol. 11, nº 1, pp. 137-148, 1969.
- [161] F. A. Honorato, B. d. Barros Neto, M. N. Martins, R. K. H. Galvão e M. F. Pimentel, "TRANSFERÊNCIA DE CALIBRAÇÃO EM MÉTODOS MULTIVARIADOS," *Quim. Nova*, vol. 30, nº 5, pp. 1301-1312, 2007.
- [162] L. C. d. Sousa, J. L. Gomide, F. R. Milagres e D. P. d. Almeida, "DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO NIRS PARA MINIMIZAÇÃO DAS ANÁLISES DE MADEIRAS DE *Eucalyptus* spp," *Ciência Florestal*, vol. 21, nº 3, pp. 591-599, 2011.
- [163] X. Li, W. Kong, W. Shi e Q. Shen, "A combination of chemometrics methods and GC-MS for the classification of edible vegetable oils," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 155, pp. 145-150, 2016.
- [164] J. F. Ribeiro e B. M. T. Walter, "Bioma Cerrado," EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, [Online]. Available: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_58_911200585234.html. [Acesso em 02 fevereiro 2018].

Anexo I – Dados da obtenção das amostras de óleo de *Copaifera langsdorffii* Desf.

Amostra	Volume	Data de coleta	Origem
CO-01	36 mL	Setembro/2015	Coletado <i>in situ</i> ¹
CO-02	22 mL	Setembro/2015	Coletado <i>in situ</i> ¹
CO-03	22 mL	Setembro/2015	Coletado <i>in situ</i> ¹
CO-04	20 mL	Setembro/2015	Coletado <i>in situ</i> ¹
CO-05	25 mL	Setembro/2015	Coletado <i>in situ</i> ¹
CO-06	20 mL	Setembro/2015	Coletado <i>in situ</i> ¹
CO-07	20 mL	Setembro/2015	Coletado <i>in situ</i> ¹
CO-08	23 mL	Setembro/2015	Coletado <i>in situ</i> ¹
CO-09	26 mL	2014	Adquirido diretamente de extrativista no distrito de Santa Rosa, Formosa-GO
CO-10	200 mL	2014/2015	Adquirido diretamente de extrativista no distrito de JK, Formosa-GO
CO-11	30 mL	Indefinida	Oriundo da cidade de Buritis – MG
CO-12	120 mL	Indefinida	Oriundo da cidade de Cabeceiras – GO
CO-13	100 mL	Indefinida	Oriundo de Planaltina – DF
CO-14	1000 mL	Indefinida	Oriundo da cidade de São Domingos – GO
CO-15	1000 mL	Indefinida	Oriundo da cidade de São Domingos – GO
CO-16	30 mL	2015	Adquirido diretamente de extrativista no distrito de Santa Rosa, Formosa-GO
CO-17	20 mL	2014/2015	Adquirido diretamente de extrativista no distrito de JK, Formosa-GO

¹ Amostras coletadas diretamente dos troncos das copaibeiras na região de Santa Rosa, no município de Formosa – GO.

Anexo II - Protocolo de adulteração de óleo de copaíba com óleo de soja

➤ Amostras para calibração

- **AC1 - Amostra 1%:** Transferir 100µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (20-200µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AC2 - Amostra 2%:** Transferir 200µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AC3 - Amostra 3%:** Transferir 300µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AC4 - Amostra 4%:** Transferir 400µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AC5 - Amostra 5%:** Transferir 500µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AC6 - Amostra 7,5%:** Transferir 750µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AC7 - Amostra 10%:** Transferir 1000µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AC8 - Amostra 12,5%:** Transferir 1000µL + 250µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medidos em micropipeta de (200-1000µL),

para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;

- **AC9 - Amostra 15%:** Transferir 1000 μ L + 500 μ L de óleo de soja (mistura de duas marcas), medidos em micropipeta de (200-1000 μ L), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AC10 - Amostra 20%:** Transferir 2mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AC11 - Amostra 25%:** Transferir 2,5mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AC12 - Amostra 30%:** Transferir 3mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AC13 - Amostra 35%:** Transferir 3,5mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AC14 - Amostra 40%:** Transferir 4mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AC15 - Amostra 45%:** Transferir 4,5mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AC16 - Amostra 50%:** Transferir 5mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;

➤ **Amostras para validação**

- **AV1 - Amostra 1,5%:** Transferir 150µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (20-200µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AV2 - Amostra 2,5%:** Transferir 250µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AV3 - Amostra 3,5%:** Transferir 350µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AV4 - Amostra 4,5%:** Transferir 450µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AV5 - Amostra 5,5%:** Transferir 550µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AV6 - Amostra 8,75%:** Transferir 875µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AV7 - Amostra 11,25%:** Transferir 1000µL + 125µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipetas de (200-1000µL) e (20-200µL) respectivamente, para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **AV8 - Amostra 13,75%:** Transferir 1000µL + 375µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;

-
- **AV9 - Amostra 17,5%:** Transferir 1000 μ L + 750 μ L de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000 μ L), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
 - **AV10 - Amostra 22,5%:** Transferir 2,25mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
 - **AV11 - Amostra 27,5%:** Transferir 2,75mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
 - **AV12 - Amostra 32,5%:** Transferir 3,25mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
 - **AV13 - Amostra 37,5%:** Transferir 3,75mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
 - **AV14 - Amostra 42,5%:** Transferir 4,25mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
 - **AV15 - Amostra 47,5%:** Transferir 4,75mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;

Anexo III - Protocolo para preparação de curva de calibração de Óleo de Copaíba adulterado com óleo de soja, para uso em cromatógrafo gasoso.

➤ **Preparação das soluções para a curva de calibração:**

- **P1 1%:** Transferir 100µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (20-200µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **P2 3%:** Transferir 300µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **P3 5%:** Transferir 500µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **P4 10%:** Transferir 1000µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **P5 15%:** Transferir 1000µL + 500µL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medidos em micropipeta de (200-1000µL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **P6 20%:** Transferir 2mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **P7 30%:** Transferir 3mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;

- **P8 40%:** Transferir 4mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;
- **P9 50%:** Transferir 5mL de óleo de soja (mistura de duas marcas), medido em micropipeta de (1-10mL), para balão volumétrico de 10mL e completar os 10mL com óleo de Copaíba puro;

Pesar 1,0000g de cada uma das misturas acima em balões volumétricos de 10mL, completar o balão até a marca de calibração com n-Hexano PA, agitar manualmente para solubilização da amostra, transferir a solução para um tubo de ensaio com tampa de ~70mL, adicionar 0,5mL de uma solução de NaOH a $2,0 \text{ molL}^{-1}$ em Metanol PA, agitar por 20 segundos em vortex a 2500 rpm. Após a separação das fases, pipetar 100uL do sobrenadante de cada amostra em balão volumétrico de 10mL e completar com n-Hexano PA, homogeneizar, injetar em Cromatógrafo gasoso em ordem crescente de concentração e preparar a curva de calibração conforme manual do equipamento.

Anexo IV - Resultados das análises em CG-EM das amostras utilizadas na construção do modelo PLSR.

Composto	TR	CO-01*	CO-02*	CO-03*	CO-04*	CO-05*	CO-06*	CO-07*	CO-08*
δ-Elemeno	9,80	0,74	0,77	0,77	0,92	1,00	3,64	0,93	1,68
N.I.	10,11	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Ylangeno	10,66	0,61	0,57	0,64	0,66	0,62	0,42	0,58	0,61
α-Copaeno	10,78	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Elemeno	11,10	-	-	-	-	-	1,14	-	0,34
α-Cubebeno	11,21	-	-	-	-	-	-	-	-
N.I.	11,38	-	-	-	-	-	0,58	-	-
β-Cariofileno	11,78	18,68	18,79	18,71	19,87	20,84	37,98	21,42	23,40
α-Bergamoteno	12,01	11,83	11,54	11,63	11,42	11,28	5,12	10,96	9,93
α-Guaieno	12,11	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Sesquifelandreno	12,16	0,52	0,60	0,59	0,47	0,49	-	-	0,34
N.I.	12,23	-	-	-	-	-	0,57	-	0,16
α-Muuroleno	12,36	2,86	2,97	3,02	2,69	2,68	1,35	2,74	2,43
N.I.	12,44	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Humuleno	12,49	2,38	2,44	2,43	2,51	2,67	4,93	2,72	2,60
N.I.	12,63	-	-	-	-	-	-	-	-
Aloaromadendreno	12,89	-	0,55	0,59	0,52	0,67	1,53	0,70	0,79
β-Cubebeno	13,03	9,69	8,87	9,05	9,43	9,23	10,91	8,60	10,26
β-Selineno	13,18	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Himachaleno	13,30	3,48	3,69	3,72	3,39	3,39	1,84	3,40	3,08
β-Bisaboleno	13,44	38,96	38,51	37,19	36,75	36,30	19,34	36,85	33,06
γ-Cadineno	13,61	-	-	-	0,37	-	0,83	-	0,31
Calameneno	13,76	2,69	2,73	2,83	2,68	2,73	2,83	2,87	2,48
Cubedol	13,90	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Bisaboleno	14,03	4,91	5,04	5,05	4,65	4,51	1,71	4,49	3,78
Hidrato de Sesquisabineno	14,26	-	-	-	-	-	-	-	-
N.I.	14,42	-	-	-	-	-	-	-	-
Óxido de Cariofileno	14,88	-	-	-	0,48	0,70	1,43	-	0,59
N.I.	15,00	-	-	-	-	-	-	-	-
Lanceol	15,15	-	-	-	-	-	-	-	-
Epóxido de Humuleno II	15,30	-	-	-	-	-	-	-	-
(-)-Cubenol	15,36	-	-	-	-	-	-	-	-
Humulane-1,6-dien-3-ol	15,47	-	-	-	-	-	-	-	-
(-)-Spatulenol	15,56	-	-	-	-	-	-	-	-
Caudinol T	15,74	-	-	-	-	-	0,84	-	0,26
Aromadendrano	15,87	-	-	-	-	-	-	-	-
N.I.	15,98	-	-	-	-	-	1,01	-	1,01
γ-Elemeno	16,07	-	-	-	-	-	-	-	-
Cariofilenol-II	16,21	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Bisabolol	16,35	-	-	-	0,45	-	-	-	-
N.I.	16,45	-	-	-	-	-	-	-	-
Juniper camphor	16,64	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexadecanoato de Metila	19,45	-	-	-	-	-	-	-	-
16-Kaureno	21,16	0,64	0,65	0,96	0,68	0,74	-	0,92	0,75
N.I.	22,26	-	-	-	-	-	-	-	-
Octadec-9-enoato de metila	21,48	-	-	-	-	-	-	-	-
N.I.	22,26	-	-	-	-	-	-	-	-
N.I.	22,68	-	-	-	-	-	-	-	-

Composto	TR	CO-01*	CO-02*	CO-03*	CO-04*	CO-05*	CO-06*	CO-07*	CO-08*
Pimara-7,15-dien-3-ona	23,57	2,02	2,28	2,83	2,09	2,15	1,36	2,82	2,14
N.I.	24,31	-	-	-	-	-	0,65	-	-
N.I.	24,49	-	-	-	-	-	-	-	-
Hardwickiato de metila	25,09	-	-	-	-	-	-	-	-

TR: Tempo de retenção em minutos, *valores expressos em percentual (%) de área normalizada total dos 53 picos cromatográficos.

Resultados das análises em CG-EM das amostras utilizadas na construção do modelo PLSR. (continuação)

Composto	TR	CO-09*	CO-10*	CO-11*	CO-12*	CO-13*	CO-14*	CO-15*	CO-16*	CO-17*
δ-Elemeno	9,80	2,22	1,93	1,25	2,14	0,76	1,43	2,85	1,40	0,64
N.I.	10,11	-	-	-	-	1,03	-	-	-	-
α-Ylangeno	10,66	0,59	-	0,43	0,43	-	-	0,55	0,84	1,63
α-Copaeno	10,78	-	-	-	-	8,81	1,69	1,52	-	-
β-Elemeno	11,10	1,37	1,03	2,98	1,31	2,32	1,68	1,85	-	0,56
α-Cubebeno	11,21	-	-	-	-	-	-	-	-	1,46
N.I.	11,38	-	-	-	-	0,44	-	-	-	-
β-Cariofileno	11,78	23,67	33,47	11,93	35,16	34,71	13,08	12,45	12,36	7,08
α-Bergamoteno	12,01	6,84	5,16	8,98	9,35	10,94	10,64	9,28	6,61	8,44
α-Guaieno	12,11	0,50	-	2,27	-	-	-	-	-	-
β-Sesquifellandreno	12,16	-	-	-	-	0,54	-	0,55	-	-
N.I.	12,23	0,82	0,84	1,53	0,39	-	0,88	1,02	1,09	-
α-Muuroleno	12,36	1,65	1,57	1,22	1,25	0,37	2,61	2,67	2,47	0,82
N.I.	12,44	-	-	-	-	-	0,95	0,88	-	-
α-Humuleno	12,49	2,87	4,65	1,49	4,24	5,21	1,63	1,63	1,60	0,95
N.I.	12,63	-	-	-	0,21	0,62	-	-	-	-
Aloaromadendreno	12,89	1,02	-	1,14	0,54	2,04	-	-	-	-
β-Cubebeno	13,03	5,93	4,59	3,14	9,84	6,29	7,92	8,74	2,55	1,16
β-Selineno	13,18	1,43	-	4,22	-	2,18	1,41	2,12	0,68	-
α-Himachaleno	13,30	2,33	1,12	4,96	1,96	3,10	2,38	2,62	1,68	0,79
β-Bisaboleno	13,44	24,49	23,44	28,67	19,15	4,95	37,75	34,27	34,00	29,88
γ-Cadineno	13,61	0,64	-	0,60	0,75	1,39	-	-	-	8,94
Calameneno	13,76	2,12	-	1,89	1,60	4,95	5,34	5,69	1,28	1,14
Cubedol	13,90	0,14	-	-	-	-	-	-	-	3,04
α-Bisaboleno	14,03	2,13	1,83	2,17	1,69	1,07	3,65	3,47	2,51	1,57
Hidrato de Sesquisabineno	14,26	-	-	-	-	-	-	0,40	-	-
N.I.	14,42	-	-	-	1,44	1,09	-	-	-	-
Óxido de Cariofileno	14,88	3,44	9,42	3,07	1,47	-	4,66	4,03	6,45	14,61
N.I.	15,00	-	0,41	0,39	-	-	-	-	-	-
Lanceol	15,15	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00
Epóxido de Humuleno II	15,30	-	0,69	-	-	-	-	-	-	1,90
(-)-Cubenol	15,36	-	-	-	-	-	-	-	-	1,71
Humulano-1,6-dien-3-ol	15,47	6,35	4,27	0,21	2,07	0,59	-	0,37	16,13	-
Espatuleno	15,56	0,46	1,99	0,72	-	-	1,31	0,69	-	2,27
Caudinol T	15,74	1,92	-	6,14	0,36	0,80	-	-	-	-
Aromadendrano	15,87	-	-	-	-	1,13	-	-	-	-
N.I.	15,98	1,00	0,77	0,88	0,36	0,53	-	0,33	1,14	1,04
γ-Elemeno	16,07	-	-	0,66	-	-	-	-	-	-
Cariofileno-II	16,21	-	-	-	-	-	-	-	-	1,32
α-Bisabolol	16,35	-	-	0,42	-	-	-	0,46	-	-
N.I.	16,45	-	-	-	-	-	-	-	-	0,83

Composto	TR	CO-09*	CO-10*	CO-11*	CO-12*	CO-13*	CO-14*	CO-15*	CO-16*	CO-17*
Juniper camphor	16,64	0,33				0,46	-	-	0,89	-
Hexadecanoato de Metila	19,45						-	-	-	0,26
16-Caureno	21,16	2,10	0,93	2,19	0,98		-	0,37	3,91	1,31
N.I.	22,26	-	-	0,16	-	-	-	-	-	-
Octadec-9-enoato de metila	21,48	-	-	-	-	-	-	-	-	2,21
N.I.	22,26	-	-	-	-	-	-	-	-	0,43
N.I.	22,68	-	-	0,34	-	-	-	-	-	0,87
Pimara-7,15-dien-3-ona	23,57	2,53	1,38	4,50	3,32	-	0,99	1,19	2,40	0,63
N.I.	24,31	0,35	-	-	-	-	-	-	-	0,85
N.I.	24,49	0,74	0,52	1,44	-	-	-	-	-	0,67
Hardwickiato de metila	25,09	-	-	-	-	3,68	-	-	-	-

TR: Tempo de retenção em minutos, *valores expressos em percentual (%) de área normalizada total dos 53 picos cromatográficos.

Anexo V - Ordem de sorteio das amostragens semanais para os ensaios de Estresse térmico.

Semana	Geladeira	Geladeira (N ₂)	Câmara Climatizada	Câmara Climatizada (N ₂)	Estufa	Estufa (N ₂)
Semana 1	G14		C3		E10	
	G21	-	C10	-	E19	-
	G25		C16		E22	
Semana 2	G1		C4		E2	
	G3	-	C25	-	E14	-
	G26		C27		E17	
Semana 3	G10		C7		E4	
	G17	-	C23	-	E11	-
	G27		C30		E20	
Semana 4	G15		C1		E7	
	G20	-	C2	-	E13	-
	G930		C19		E15	
Semana 5	G7	GN3	C8	CN1	E9	EN1
	G12	GN5	C15	CN3	E16	EN4
	G16	GN6	C29	CN8	E24	EN8
Semana 6	G11		C9		E6	
	G13	-	C20	-	E27	-
	G18		C24		E28	
Semana 7	G19		C13		E12	
	G22	-	C17	-	E18	-
	G23		C26		E30	
Semana 8	G9	GN1	C14	CN2	E1	EN2
	G24	GN4	C18	CN5	E3	EN3
	G29	GN8	C21	CN7	E5	EN5
Semana 9	G2		C5		E8	
	G4	-	C6	-	E21	-
	G5		C11		E25	
Semana 10	G6	GN2	C12	CN4	E23	EN6
	G8	GN7	C22	CN6	E26	EN7
	G28	GN9	C28	CN9	E29	EN9

Anexo VI - Resultados das análises em CG-EM das amostras submetidas à estresse térmico.

	TR	Comp.	Z S0*	G S1*	C S1*	E S1*	G S2*	C S2*	E S2*	G S3*	C S3*	E S3*	G S4*	C S4*	E S4*	G S5*	GN S5*	C S5*	CN S5*	E S5*	EN S5*
1	9,68	S1	1,37	1,32	1,33	1,38	1,38	1,41	1,44	1,43	1,29	1,51	1,39	1,23	1,49	1,18	0,99	1,41	1,33	1,49	1,51
2	9,98	S2	0,17	0,16	0,17	0,17	0,16	0,16	0,19	0,16	0,16	0,19	0,16	0,17	0,20	0,17	0,18	0,17	0,17	0,22	0,21
3	10,55	S3	0,33	0,34	0,34	0,34	0,33	0,33	0,34	0,33	0,34	0,34	0,33	0,33	0,34	0,34	0,32	0,33	0,33	0,34	0,34
4	10,66	S4	1,09	1,10	1,10	1,11	1,10	1,08	1,10	1,09	1,10	1,11	1,09	1,09	1,10	1,11	1,04	1,09	1,09	1,11	1,10
5	11,00	S5	1,26	1,30	1,28	1,27	1,24	1,26	1,23	1,27	1,27	1,24	1,27	1,27	1,22	1,26	1,23	1,26	1,26	1,19	1,20
6	11,50	S6	0,19	0,18	0,18	0,19	0,19	0,19	0,20	0,19	0,19	0,19	0,19	0,18	0,19	0,19	0,18	0,19	0,18	0,19	0,19
7	11,71	S7	9,72	9,69	9,72	9,72	9,74	9,70	9,74	9,76	9,84	9,81	9,75	9,73	9,83	9,78	9,32	9,68	9,81	9,80	9,79
8	11,95	S8	6,55	6,54	6,54	6,58	6,52	6,54	6,55	6,54	6,65	6,58	6,54	6,58	6,62	6,64	6,36	6,50	6,58	6,59	6,57
9	12,10	S9	0,40	0,40	0,40	0,41	0,42	0,39	0,41	0,39	0,42	0,41	0,41	0,42	0,41	0,44	0,39	0,42	0,40	0,41	0,41
10	12,16	S10	0,59	0,58	0,59	0,59	0,57	0,58	0,59	0,59	0,57	0,59	0,58	0,55	0,60	0,55	0,50	0,58	0,57	0,59	0,58
11	12,31	S11	1,72	1,72	1,71	1,69	1,75	1,70	1,68	1,71	1,77	1,68	1,73	1,74	1,64	1,77	1,58	1,74	1,72	1,62	1,60
12	12,37	S12	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,61	0,60	0,60	0,60	0,60	0,61	0,57	0,60	0,60	0,59	0,59
13	12,43	S13	1,28	1,28	1,29	1,29	1,25	1,30	1,29	1,30	1,28	1,30	1,28	1,25	1,30	1,25	1,19	1,25	1,25	1,30	1,27
14	12,86	S14	0,16	0,16	0,16	0,17	0,17	0,16	0,18	0,16	0,16	0,19	0,16	0,15	0,19	0,17	0,15	0,17	0,16	0,21	0,20
15	12,90	S15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
16	12,99	S16	5,58	5,51	5,54	5,44	5,58	5,59	5,42	5,62	5,56	5,42	5,57	5,48	5,32	5,42	4,99	5,53	5,56	5,20	5,25
17	13,16	S17	1,09	1,05	1,06	1,06	1,09	1,11	1,12	1,08	1,01	1,12	1,09	0,96	1,10	0,95	0,79	1,09	1,03	1,10	1,09
18	13,29	S18	1,77	1,74	1,75	1,75	1,77	1,78	1,79	1,76	1,74	1,82	1,77	1,68	1,80	1,71	1,58	1,76	1,75	1,78	1,78
19	13,45	S19	24,53	24,26	24,37	24,20	24,32	24,51	24,48	24,45	24,40	24,48	24,56	24,28	24,61	24,21	23,45	24,28	24,43	24,52	24,59
20	13,62	S20	0,20	0,20	0,19	0,19	0,19	0,18	0,20	0,19	0,19	0,21	0,20	0,18	0,22	0,19	0,18	0,20	0,18	0,22	0,22
21	13,73	S21	3,56	3,52	3,52	3,44	3,55	3,57	3,41	3,56	3,59	3,40	3,58	3,50	3,34	3,49	3,32	3,51	3,52	3,28	3,27
22	13,91	S22	0,24	0,24	0,24	0,23	0,24	0,23	0,24	0,22	0,21	0,25	0,25	0,19	0,25	0,22	0,20	0,25	0,22	0,25	0,24
23	14,05	S23	2,49	2,48	2,47	2,49	2,48	2,52	2,50	2,48	2,47	2,51	2,50	2,41	2,52	2,42	2,29	2,49	2,45	2,50	2,49
24	14,27	S24	0,32	0,32	0,32	0,31	0,32	0,31	0,32	0,29	0,30	0,32	0,32	0,29	0,32	0,32	0,31	0,33	0,31	0,32	0,32
25	14,45	S25	0,13	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,13	0,14	0,14	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,14	0,13	0,13	0,13
26	14,65	S26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,17	0,00	0,20	0,38	0,00	0,11	0,00	0,05
27	14,75	S27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28	14,79	S28	0,15	0,15	0,16	0,16	0,15	0,13	0,15	0,09	0,15	0,14	0,15	0,14	0,15	0,21	0,20	0,15	0,13	0,16	0,15
29	14,96	S29	3,47	3,53	3,52	3,52	3,51	3,49	3,52	3,46	3,53	3,50	3,51	3,49	3,52	3,57	3,50	3,49	3,47	3,53	3,46
30	15,05	S30	0,17	0,20	0,20	0,18	0,18	0,17	0,17	0,17	0,22	0,16	0,18	0,19	0,18	0,19	0,20	0,17	0,20	0,16	0,19

	TR	Comp.	Z S0*	G S1*	C S1*	E S1*	G S2*	C S2*	E S2*	G S3*	C S3*	E S3*	G S4*	C S4*	E S4*	G S5*	GN S5*	C S5*	CN S5*	E S5*	EN S5*	
31	15,36	S31	0,14	0,15	0,14	0,14	0,14	0,13	0,14	0,13	0,14	0,13	0,14	0,15	0,14	0,16	0,17	0,14	0,14	0,14	0,14	0,13
32	15,52	S32	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,48	0,46	0,47	0,46	0,47	0,47	0,47	0,47	0,46	0,46	0,46	0,47
33	15,63	S33	1,11	1,15	1,14	1,12	1,12	1,08	1,06	1,07	1,17	1,02	1,10	1,19	1,01	1,24	1,32	1,08	1,13	1,02	1,00	
34	15,84	S34	0,16	0,16	0,16	0,17	0,17	0,16	0,16	0,16	0,19	0,16	0,16	0,19	0,16	0,21	0,25	0,16	0,18	0,16	0,17	
35	16,07	S35	0,22	0,23	0,23	0,23	0,22	0,21	0,22	0,22	0,23	0,21	0,22	0,24	0,21	0,25	0,27	0,22	0,22	0,22	0,21	
36	16,33	S36	0,00	0,05	0,05	0,05	0,00	0,00	0,16	0,05	0,00	0,16	0,10	0,00	0,17	0,05	0,05	0,15	0,05	0,18	0,17	
37	16,47	S37	0,47	0,47	0,46	0,47	0,46	0,46	0,47	0,46	0,47	0,47	0,46	0,48	0,46	0,48	0,49	0,46	0,46	0,47	0,47	
38	16,95	S38	0,14	0,15	0,14	0,14	0,13	0,13	0,08	0,13	0,12	0,00	0,14	0,17	0,00	0,19	0,24	0,13	0,15	0,00	0,04	
39	22,40	D1	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,15	0,14	0,14	0,14	0,14	
40	23,73	D2	0,38	0,39	0,39	0,38	0,38	0,38	0,38	0,37	0,38	0,38	0,39	0,38	0,38	0,39	0,41	0,38	0,38	0,39	0,38	
41	28,56	D3	0,18	0,19	0,19	0,18	0,18	0,17	0,17	0,18	0,16	0,17	0,17	0,19	0,16	0,17	0,19	0,19	0,18	0,18	0,18	
42	28,66	D4	0,42	0,45	0,42	0,40	0,47	0,42	0,45	0,44	0,41	0,40	0,43	0,43	0,39	0,43	0,48	0,43	0,43	0,42	0,44	
43	28,76	D5	0,70	0,69	0,70	0,66	0,71	0,66	0,70	0,68	0,62	0,64	0,68	0,69	0,61	0,65	0,73	0,71	0,68	0,69	0,70	
44	28,93	D6	0,28	0,29	0,29	0,28	0,28	0,29	0,28	0,29	0,27	0,28	0,28	0,29	0,27	0,27	0,31	0,29	0,28	0,28	0,28	
45	29,06	D7	0,35	0,36	0,36	0,34	0,35	0,34	0,35	0,35	0,32	0,33	0,34	0,36	0,32	0,33	0,39	0,36	0,35	0,35	0,36	
46	29,55	D8	0,15	0,16	0,15	0,15	0,15	0,16	0,15	0,16	0,14	0,15	0,15	0,15	0,14	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	
47	29,68	D9	1,07	1,11	1,10	1,05	1,07	1,04	1,06	1,08	0,98	1,03	1,04	1,07	0,99	0,98	1,14	1,10	1,06	1,07	1,08	
48	30,04	D10	10,97	10,99	10,99	11,01	11,02	10,89	10,96	10,93	10,81	10,87	10,79	11,17	10,93	10,99	12,15	10,94	10,99	11,06	11,06	
49	30,27	D11	1,96	2,02	1,99	2,08	1,97	2,03	1,98	2,01	2,03	2,04	1,97	2,06	2,05	2,06	2,24	2,00	2,00	2,02	2,03	
50	31,08	D12	5,20	5,31	5,22	5,50	5,21	5,36	5,22	5,29	5,37	5,41	5,23	5,39	5,46	5,40	5,84	5,29	5,26	5,34	5,32	
51	31,83	D13	0,90	0,90	0,90	0,90	0,92	0,89	0,91	0,90	0,85	0,91	0,89	0,85	0,89	0,84	0,86	0,91	0,88	0,91	0,91	
52	32,01	D14	0,63	0,63	0,64	0,61	0,62	0,61	0,63	0,64	0,58	0,59	0,61	0,64	0,58	0,58	0,70	0,65	0,61	0,64	0,64	
53	32,22	D15	4,85	4,87	4,86	4,93	4,90	4,87	4,86	4,85	4,83	4,85	4,78	4,91	4,88	4,91	5,40	4,88	4,86	4,89	4,90	

TR = Tempo de retenção em minutos; * expresso em percentual (%) de área normalizada do pico.

Resultados das análises em CG-EM das amostras submetidas à estresse térmico (continuação).

	TR	Comp.	G S6*	C S6*	E S6*	G S7*	C S7*	E S7*	G S8*	GN S8*	C S8*	CN S8*	E S8*	EN S8*	G S9*	C S9*	E S9*	G S10*	GN S10*	C S10*	G S6*	CN S10*	E S10*	EN S10*	
1	9,68	S1	1,39	1,23	1,49	1,37	1,42	1,49	1,34	1,48	1,20	1,45	1,52	1,55	1,33	1,11	1,53	1,38	1,42	1,27	1,39	1,42	1,52	1,48	
2	9,98	S2	0,16	0,17	0,22	0,16	0,16	0,23	0,16	0,16	0,17	0,11	0,23	0,23	0,16	0,16	0,23	0,15	0,16	0,17	0,16	0,16	0,16	0,24	0,25
3	10,55	S3	0,33	0,34	0,34	0,34	0,34	0,33	0,31	0,33	0,34	0,33	0,34	0,34	0,32	0,32	0,34	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,34	0,33	
4	10,66	S4	1,10	1,10	1,11	1,10	1,09	1,10	1,03	1,09	1,10	1,11	1,11	1,11	1,05	1,06	1,12	1,10	1,09	1,09	1,10	1,09	1,11	1,08	
5	11,00	S5	1,29	1,27	1,21	1,27	1,25	1,16	1,21	1,25	1,27	1,29	1,15	1,19	1,24	1,23	1,17	1,25	1,25	1,27	1,29	1,27	1,17	1,14	
6	11,50	S6	0,18	0,19	0,19	0,19	0,18	0,20	0,18	0,18	0,19	0,13	0,20	0,19	0,18	0,19	0,19	0,19	0,19	0,18	0,18	0,19	0,20	0,19	
7	11,71	S7	9,74	9,77	9,84	9,75	9,75	9,79	9,25	9,77	9,78	9,99	9,79	9,81	9,46	9,58	9,79	9,68	9,69	9,64	9,74	9,72	9,88	9,47	
8	11,95	S8	6,53	6,63	6,61	6,56	6,53	6,60	6,21	6,53	6,63	6,72	6,61	6,59	6,36	6,54	6,62	6,53	6,49	6,51	6,53	6,53	6,68	6,45	
9	12,10	S9	0,41	0,40	0,39	0,42	0,39	0,41	0,38	0,41	0,40	0,41	0,43	0,41	0,40	0,41	0,40	0,41	0,42	0,42	0,41	0,40	0,40	0,37	
10	12,16	S10	0,57	0,57	0,59	0,58	0,59	0,59	0,57	0,57	0,57	0,59	0,57	0,58	0,56	0,54	0,61	0,59	0,57	0,56	0,57	0,58	0,59	0,58	
11	12,31	S11	1,75	1,68	1,58	1,72	1,70	1,59	1,64	1,76	1,68	1,77	1,61	1,56	1,70	1,70	1,57	1,74	1,75	1,72	1,75	1,72	1,58	1,48	
12	12,37	S12	0,60	0,60	0,58	0,60	0,60	0,59	0,57	0,60	0,61	0,61	0,59	0,58	0,59	0,60	0,62	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,58	0,56	
13	12,43	S13	1,26	1,26	1,32	1,27	1,30	1,29	1,20	1,27	1,26	1,32	1,26	1,29	1,24	1,26	1,29	1,29	1,25	1,25	1,26	1,28	1,32	1,29	
14	12,86	S14	0,16	0,15	0,20	0,16	0,16	0,21	0,15	0,17	0,15	0,11	0,23	0,22	0,16	0,16	0,22	0,17	0,17	0,17	0,16	0,17	0,22	0,22	
15	12,90	S15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
16	12,99	S16	5,59	5,48	5,18	5,59	5,61	5,10	5,36	5,66	5,48	5,71	5,11	5,13	5,47	5,37	5,08	5,56	5,57	5,40	5,59	5,57	5,07	4,78	
17	13,16	S17	1,09	0,96	1,08	1,08	1,09	1,07	1,05	1,12	0,98	1,11	1,11	1,12	1,07	0,88	1,10	1,09	1,09	1,04	1,09	1,10	1,10	1,01	
18	13,29	S18	1,77	1,71	1,77	1,76	1,77	1,78	1,70	1,80	1,71	1,79	1,81	1,78	1,73	1,64	1,80	1,78	1,77	1,73	1,77	1,77	1,79	1,71	
19	13,45	S19	24,30	24,28	24,59	24,21	24,38	24,82	23,51	24,34	24,25	25,11	24,47	24,55	23,97	23,89	24,61	24,06	24,21	24,23	24,30	24,28	24,94	23,96	
20	13,62	S20	0,19	0,18	0,21	0,18	0,20	0,23	0,19	0,19	0,18	0,14	0,23	0,22	0,18	0,17	0,23	0,19	0,19	0,20	0,19	0,20	0,24	0,23	
21	13,73	S21	3,55	3,51	3,23	3,54	3,55	3,24	3,42	3,56	3,50	3,66	3,25	3,22	3,50	3,47	3,21	3,52	3,54	3,46	3,55	3,54	3,24	3,05	
22	13,91	S22	0,24	0,21	0,23	0,23	0,24	0,25	0,23	0,24	0,21	0,14	0,25	0,24	0,24	0,19	0,24	0,24	0,25	0,24	0,24	0,24	0,22	0,23	
23	14,05	S23	2,49	2,43	2,50	2,48	2,49	2,50	2,41	2,50	2,43	2,54	2,51	2,50	2,45	2,39	2,52	2,49	2,48	2,47	2,49	2,49	2,55	2,46	
24	14,27	S24	0,32	0,31	0,31	0,31	0,32	0,32	0,31	0,32	0,31	0,29	0,33	0,32	0,32	0,30	0,33	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,31	
25	14,45	S25	0,14	0,13	0,08	0,14	0,14	0,00	0,13	0,14	0,13	0,09	0,08	0,04	0,09	0,13	0,08	0,14	0,14	0,13	0,14	0,14	0,04	0,00	
26	14,65	S26	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
27	14,75	S27	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	
28	14,79	S28	0,15	0,19	0,15	0,15	0,14	0,16	0,14	0,14	0,20	0,09	0,28	0,16	0,15	0,19	0,20	0,15	0,15	0,21	0,15	0,14	0,11	0,21	
29	14,96	S29	3,52	3,53	3,53	3,49	3,48	3,52	3,44	3,47	3,54	3,59	3,58	3,50	3,48	3,57	3,57	3,53	3,48	3,56	3,52	3,50	3,55	3,57	
30	15,05	S30	0,20	0,18	0,18	0,21	0,17	0,16	0,18	0,19	0,20	0,12	0,20	0,17	0,19	0,22	0,19	0,20	0,17	0,19	0,20	0,19	0,16	0,17	

	TR	Comp.	G S6*	C S6*	E S6*	G S7*	C S7*	E S7*	G S8*	GN S8*	C S8*	CN S8*	E S8*	EN S8*	G S9*	C S9*	E S9*	G S10*	GN S10*	C S10*	G S6*	CN S10*	E S10*	EN S10*	
31	15,36	S31	0,14	0,15	0,15	0,14	0,13	0,14	0,14	0,08	0,16	0,09	0,13	0,13	0,14	0,16	0,14	0,14	0,14	0,14	0,16	0,14	0,14	0,14	0,16
32	15,52	S32	0,47	0,46	0,46	0,47	0,46	0,47	0,46	0,47	0,46	0,48	0,46	0,47	0,47	0,47	0,46	0,47	0,47	0,48	0,47	0,46	0,47	0,47	0,47
33	15,63	S33	1,10	1,21	1,03	1,13	1,08	1,01	1,10	1,05	1,22	1,11	1,03	0,99	1,13	1,28	1,03	1,12	1,09	1,18	1,10	1,08	1,02	1,02	1,02
34	15,84	S34	0,16	0,20	0,16	0,17	0,16	0,16	0,17	0,16	0,20	0,11	0,17	0,16	0,17	0,22	0,17	0,16	0,16	0,17	0,16	0,16	0,15	0,16	0,16
35	16,07	S35	0,23	0,24	0,22	0,23	0,21	0,21	0,22	0,22	0,25	0,14	0,22	0,21	0,23	0,26	0,23	0,23	0,22	0,24	0,23	0,22	0,22	0,22	0,24
36	16,33	S36	0,10	0,00	0,18	0,05	0,05	0,19	0,05	0,00	0,00	0,05	0,19	0,18	0,06	0,05	0,19	0,00	0,15	0,16	0,10	0,20	0,20	0,20	0,20
37	16,47	S37	0,47	0,48	0,47	0,47	0,46	0,48	0,46	0,45	0,48	0,48	0,48	0,47	0,47	0,49	0,48	0,47	0,46	0,47	0,47	0,47	0,48	0,49	0,49
38	16,95	S38	0,14	0,18	0,00	0,14	0,13	0,00	0,14	0,00	0,18	0,09	0,00	0,00	0,15	0,21	0,00	0,14	0,13	0,15	0,14	0,13	0,00	0,05	0,05
39	22,40	D1	0,14	0,15	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,10	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,14	0,14	0,14	0,15
40	23,73	D2	0,39	0,39	0,38	0,38	0,37	0,39	0,39	0,38	0,39	0,39	0,38	0,39	0,39	0,39	0,37	0,37	0,38	0,39	0,39	0,39	0,38	0,40	0,40
41	28,56	D3	0,19	0,18	0,18	0,18	0,18	0,17	0,20	0,18	0,18	0,12	0,17	0,19	0,18	0,16	0,18	0,17	0,19	0,19	0,19	0,18	0,15	0,20	0,20
42	28,66	D4	0,42	0,43	0,43	0,41	0,43	0,44	0,46	0,42	0,43	0,40	0,43	0,42	0,47	0,40	0,42	0,41	0,44	0,47	0,42	0,40	0,38	0,45	0,45
43	28,76	D5	0,69	0,68	0,69	0,69	0,69	0,68	0,74	0,66	0,67	0,66	0,66	0,69	0,71	0,62	0,68	0,64	0,72	0,72	0,69	0,65	0,60	0,73	0,73
44	28,93	D6	0,28	0,28	0,29	0,28	0,28	0,29	0,31	0,28	0,28	0,29	0,27	0,29	0,29	0,28	0,28	0,28	0,29	0,29	0,28	0,29	0,27	0,31	0,31
45	29,06	D7	0,36	0,35	0,35	0,35	0,35	0,34	0,39	0,35	0,35	0,34	0,33	0,35	0,36	0,33	0,35	0,34	0,36	0,36	0,36	0,34	0,32	0,38	0,38
46	29,55	D8	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,16	0,15	0,15	0,11	0,15	0,15	0,15	0,10	0,15	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,16	0,16
47	29,68	D9	1,09	1,06	1,09	1,08	1,09	1,04	1,17	1,08	1,05	1,06	1,02	1,09	1,08	1,00	1,08	1,04	1,07	1,11	1,09	1,03	0,98	1,17	1,17
48	30,04	D10	10,85	11,02	11,09	10,93	10,94	11,07	11,85	10,95	11,03	11,17	11,11	11,15	11,52	11,49	11,06	10,98	10,99	11,08	10,85	10,89	10,92	11,85	11,85
49	30,27	D11	2,00	2,05	2,03	2,02	2,00	2,04	2,20	2,02	2,05	2,09	2,02	2,04	2,07	2,18	2,01	2,08	2,00	1,99	2,00	2,05	2,06	2,18	2,18
50	31,08	D12	5,25	5,35	5,32	5,35	5,25	5,43	5,84	5,31	5,38	5,54	5,35	5,41	5,49	5,69	5,31	5,51	5,27	5,26	5,25	5,43	5,48	5,72	5,72
51	31,83	D13	0,90	0,85	0,90	0,90	0,90	0,89	1,00	0,91	0,85	0,91	0,93	0,93	0,95	0,83	0,91	0,91	0,91	0,90	0,90	0,90	0,89	0,97	0,97
52	32,01	D14	0,64	0,62	0,66	0,62	0,64	0,61	0,71	0,64	0,61	0,63	0,59	0,64	0,64	0,59	0,63	0,62	0,63	0,66	0,64	0,59	0,57	0,70	0,70
53	32,22	D15	4,79	4,87	4,88	4,86	4,85	4,91	5,40	4,86	4,86	3,30	4,92	4,92	5,13	5,07	4,89	4,94	4,91	4,90	4,79	4,86	4,85	5,27	5,27

TR = Tempo de retenção em minutos; * expresso em percentual (%) de área normalizada do pico.

Anexo VII – Planejamento de preparação de Misturas Binárias e Misturas Ternárias

Para a preparação das Misturas Binárias e Misturas Ternárias, foram utilizadas 17 amostras distintas de óleo de *Copaifera langsdorffii*, rotuladas de A à Q sequencialmente e 9 amostras comerciais de espécies desconhecidas e isentas de adulterações com triacilgliceróis e rotuladas sequencialmente de R à Z.

Para a preparação de 4,0 mL de cada uma das misturas binárias foram utilizados 2 mL de duas amostras distintas, conforme abaixo discriminado.

Mistura Binária	Fontes		Mistura Binária	Fontes	
MB01	A	B	MB18	M	N
MB02	A	S	MB19	M	R
MB03	A	U	MB20	M	X
MB04	A	Z	MB21	M	Y
MB05	B	Y	MB22	N	P
MB06	C	R	MB23	N	R
MB07	C	W	MB24	N	Y
MB08	E	J	MB25	O	P
MB09	E	W	MB26	P	R
MB10	F	G	MB27	P	T
MB11	F	V	MB28	P	V
MB12	F	Z	MB29	Q	R
MB13	J	T	MB30	S	V
MB14	J	X	MB31	S	U
MB15	K	L	MB32	U	V
MB16	L	S	MB33	X	W
MB17	L	Z	MB34	Y	Z

Para a preparação de 4,5 mL de cada uma das misturas ternárias foram utilizados 1,5 mL de três amostras distintas, conforme abaixo discriminado.

Misturas Ternárias	Fontes		
MT01	A	H	T
MT02	A	J	M
MT03	A	O	P
MT04	B	V	W
MT05	C	V	X
MT06	D	J	Z
MT07	E	H	R
MT08	E	N	S
MT09	E	Q	Z
MT10	J	L	Y
MT11	K	M	U
MT12	K	R	W
MT13	L	Q	Y
MT14	M	N	U
MT15	O	S	U
MT16	P	U	X
MT17	R	T	Y

Anexo VIII – Planejamento de adulterações de misturas binárias e ternárias de óleos de copaíba, com, Azeite de Dendê (AD), Azeite de Oliva (AO), Óleo de Girassol (OG) e Óleo de coco Licuri (OL).

Foram adulteradas 24 amostras de óleo de copaíba entre misturas binárias e ternárias, os teores de adulterantes nas amostras estão expressas em % (v / v). As fontes de óleos de copaíba utilizado nas misturas binárias ou ternárias, seguiram os mesmos procedimentos do Anexo VII.

- Amostras de óleo de copaíba adulteradas com Azeite de Dendê (OCAD)

Amostra	Fonte	Teor de adulterante
OCAD-05	Mistura Ternária : A / B / R	5 % (v / v)
OCAD-10	Mistura Binária: L / W	10 % (v / v)
OCAD-20	Mistura Ternária: C / L / N	20 % (v / v)
OCAD-30	Mistura Binária: T / U	30 % (v / v)
OCAD-40	Mistura Ternária: L / M / P	40 % (v / v)
OCAD-50	Mistura Binária: J / U	50 % (v / v)

- Amostras de óleo de copaíba adulteradas com Azeite de Oliva (OCAO)

Amostra	Fonte	Teor de adulterante
OCAO-05	Mistura Binária: X / Z	5 % (v / v)
OCAO-10	Mistura Ternária: T / V / Z	10 % (v / v)
OCAO-20	Mistura Binária: K / T	20 % (v / v)
OCAO-30	Mistura Ternária: E / R / Y	30 % (v / v)
OCAO-40	Mistura Binária: C / E	40 % (v / v)
OCAO-50	Mistura Ternária: J / K / V	50 % (v / v)

- Amostras de óleo de copaíba adulteradas com Óleo de Girassol (OCOg)

Amostra	Fonte	Teor de adulterante
OCOg-05	Mistura Binária: A / L	5 % (v / v)
OCOg-10	Mistura Ternária : C / K / Z	10 % (v / v)
OCOg-20	Mistura Binária: S / T	20 % (v / v)
OCOg-30	Mistura Ternária: R / S / X	30 % (v / v)
OCOg-40	Mistura Binária: E / X	40 % (v / v)
OCOg-50	Mistura Ternária: I / S / W	50 % (v / v)

- Amostras de óleo de copaíba adulteradas com Óleo de coco Licuri (OCOL)

Amostra	Fonte	Teor de adulterante
OCOL-05	Mistura Ternária : C / I / Q	5 % (v / v)
OCOL-10	Mistura Binária: W / Y	10 % (v / v)
OCOL-20	Mistura Ternária: N / T / W	20 % (v / v)
OCOL-30	Mistura Binária: H / J	30 % (v / v)
OCOL-40	Mistura Ternária: P / Q / X	40 % (v / v)
OCOL-50	Mistura Binária: M / W	50 % (v / v)