



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA

FERNANDA LOPES DE MESQUITA VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL  
DE PAU-ROSA (*ANIBA ROSIODORA*) PELA TÉCNICA DE  
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ASSOCIADA À  
QUIMIOMETRIA**

Brasília-DF

2023

**FERNANDA LOPES DE MESQUITA VIEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL  
DE PAU-ROSA (*ANIBA ROSIODORA*) PELA TÉCNICA DE  
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ASSOCIADA À  
QUIMIOMETRIA**

Dissertação apresentada à  
Universidade de Brasília, como parte das  
exigências do Programa de Pós-Graduação  
em Química, para obtenção do título de  
Mestre em Química.

Orientador: Profa. Dra. Aline Lima de  
Oliveira Paterno

Coorientador: Prof. Dr. Jez Willian Batista  
Braga

BRASÍLIA-DF

2023

**FERNANDA LOPES DE MESQUITA VIEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE PAU-ROSA (*ANIBA ROSIODORA*) PELA TÉCNICA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ASSOCIADA À QUIMIOMETRIA.**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para obtenção do título de Mestre em Química.

Brasília- DF 05 de setembro de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Aline Lima de Oliveira Paterno

---

Prof. Dr. Ângelo Henrique de L. Machado

---

Dr. Adriano Otávio Maldaner

---

Dr. Divino Eterno Teixeira

Dedico esse trabalho aos meus pais, meu noivo, minhas cachorras, meus amigos e toda minha família, por todo amor e companhia que sempre me proporcionam.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me guiar e me dar forças para perseverar nos meus sonhos e objetivos.

Aos meus pais, Janette das Graças Lopes Mesquita e Wellington de Mesquita Vieira, por sempre estarem presentes e não medirem esforços para me apoiarem.

Ao meu noivo Vinícius Vieira Evangelista por estar sempre me incentivando e acreditando no meu potencial.

Às minhas cachorras, Molly e Malu, por serem meu refúgio e distração.

Aos meus amigos, por vivenciarem esse momento da minha vida comigo.

Aos meus orientadores Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aline Lima de O. Paterno e Prof. Dr. Jez Willian B. Braga que me acompanham desde a graduação e agora me auxiliaram no mestrado e no meu crescimento como pessoa e como Química.

Aos professores e funcionários do IQ/UnB, que contribuíram para minha formação desde a graduação até a pós-graduação.

Ao técnico do LRMN e colega, Luiz Eduardo Celino Benedito, pelo auxílio na parte experimental e nas discussões.

Ao Alessandro C. de Oliveira Moreira, por todo apoio em relação às amostras e análises do CG-EM.

À Tereza Cristina M. Pastore e todo seu grupo de pesquisa, pelas amostras cedidas e todo apoio prestado.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia, ao CNPq e à CAPES pelo apoio à Ciência e disponibilização de bolsa, à FINEP pelo apoio financeiro na compra do equipamento de Ressonância Magnética Nuclear, ao LPF e ao programa CTSP da CITES pelo financiamento do projeto S544.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Este trabalho estudou o óleo essencial (OE) da espécie *Aniba rosiodora*, mais conhecido com OE de pau-rosa, amplamente usado na indústria de cosméticos devido ao seu *bouquet* de substâncias, que imprime uma fragrância característica muito apreciada. Seu composto majoritário é o linalol, que é um fixador muito utilizado em perfumes. Pelo alto valor agregado ao OE de pau-rosa e sua exploração predatória ao longo dos anos, seu comércio e exploração tiveram que ser regulamentados. Como se trata de um produto natural e de alto valor a sua adulteração é recorrente. A adulteração do OE, além de prejudicar a economia local e causar uma concorrência desleal, expõe o consumidor a produtos não autênticos e que não exprimem segurança da composição. Por isso, se faz necessário um controle de autenticidade dos óleos essenciais de pau-rosa comercializados. A presente pesquisa propõe a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) associada a métodos Quimiométricos de análise de dados univariada e multivariada (PCA, HCA e PLS-DA). O uso dessas técnicas associadas apresenta resultados com muita relevância nas pesquisas de produtos naturais e metabólica, para identificação de marcadores, classificação por origem, determinação da autenticidade de diversos produtos, inclusive no caso de OE de pau-rosa. O método proposto foi aplicado a 135 amostras extraídas ou adquiridas pelo Laboratório de Produtos Florestais (LPF) e permitiu a discriminação desses óleos em autênticos e não autênticos por meio das análises quimiométricas associadas à quantificação de componentes por meio da técnica de RMNq de  $^1\text{H}$ . Assim, pela razão das áreas dos sinais de linalol e benzoato de benzila, um composto minoritário dos OE de pau-rosa, combinada com a condição de que a razão da área da região entre 4,90 e 2,90 ppm e da área do sinal do linalol em 5,90 ppm deve ser inferior a 1,0, foi possível diferenciar praticamente todas as amostras em autênticas e não autênticas. A comparação entre as amostras autênticas brasileiras e amostras obtidas no Peru revelaram um agrupamento das amostras peruanas com as oriundas da cidade de Maués/AM e que o benzoato de benzila é composto minoritário mais influente nas amostras obtidas no Brasil.

Palavras-chave: RMN, Linalol, Óleo de pau-rosa, Quimiometria, RMNq

## ABSTRACT

This study focused on the essential oil (EO) of *Aniba rosaeodora*, commonly known as rosewood EO, which is widely used in the cosmetics industry due to its bouquet of substances that imprint a widely appreciated characteristic fragrance. Its major component is linalool, a fixative commonly employed in perfumes. Due to the high value of rosewood EO and its predatory exploitation over the years, its trade and exploitation had to be regulated. As it is a natural and high value product, its adulteration is recurrent. Tampering of the EO, in addition to harming the local economy and causing unfair competition, exposes consumers to non-authentic products that do not express safety in their composition. Therefore, it is necessary to control the authenticity of the essential oils of rosewood marketed. This research proposes the use of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) technique associated with chemometric methods of univariate and multivariate data analysis (PCA, HCA, and PLS-DA). These uses of associated techniques have been presented very relevant results in research on natural products and metabolomics, for the identification of markers, classification by origin, determination of authenticity of various products, including in the case of rosewood EO. The proposed method was applied to 135 samples extracted or acquired by the Laboratory of Forest Products (LPF/Brazilian Forest Service) and allowed the discrimination of these oils into authentic and non-authentic by chemometric analyzes associated with the quantification of components through  $^1\text{H}$ -qNMR technique. Thus, by the ratio of the signal areas of linalool and benzyl benzoate, a minor compound in rosewood EOs, combined with the condition that the ratio of the area of the region between 4.90 and 2.90 ppm and the area of the signal of linalool in 5.90 ppm must be less than 1.0 it was possible to differentiate practically all samples into authentic and non-authentic. The comparison between authentic brazilian samples and samples obtained in Peru revealed a clustering of peruvian samples with those from Maués/AM and that benzyl benzoate is the most influential minority compound in the samples obtained in Brazil.

Keywords: NMR, Linalool, Rosewood oil, Chemometrics, qNMR

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas das moléculas de isopreno, IPP e DMAPP, intermediários presentes na biossíntese de terpenos.....	5
Figura 2. Estrutura básica do fenilpropanóides. ....	5
Figura 3. Estrutura com carbonos enumerados do linalol, com nome IUPAC 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol. ....	6
Figura 4. Estrutura dos enantiômeros do linalol, coriandrol (A) e licareol (B). ....	7
Figura 5. Gráfico dos valores FOB em USD por quilograma litro de óleo com o passar dos anos.....	9
Figura 6. Momento magnético resultante (M) dos prótons alinhados ao campo magnético $B_0$ .....	13
Figura 7. Movimento de Precessão. ....	14
Figura 8. Excitação dos prótons alinhados ao campo $B_0$ no eixo z que se deslocam em direção plano xy. ....	14
Figura 9. Deslocamento do momento magnético resultante devido ao pulso de excitação. ....	19
Figura 10. Espectros de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) das 130 amostras de OE de pau-rosa definidos como não autênticos (verde) e autênticos (vermelho) .....	38
Figura 11. Dendrograma da Análise Hierárquica de Clusteres (HCA) para amostras de OE de pau-rosa (A). Para melhor visualização das classes, o dendrograma ampliado está apresentado em (B) (vermelho e classes identificadas com A) amostras de OE de pau-rosa de definidos como autênticos e (verde e classes identificadas com B) amostras não autênticas.....	40
Figura 12. Escores de PC1 no eixo X (44,86% de variância explicada) e PC2 no eixo Y (28,38% de variância explicada). (A, vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (U, verde) amostras não autênticas (A). Para melhor visualização dos agrupamentos em PC1 e PC2 das amostras autênticas (B).	42
Figura 13. Gráfico de pesos da PC1 dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ com pré-processamento <i>mean center</i> . Regiões destacadas em vermelho indicam os sinais do composto linalol.....	44
Figura 14. Gráfico de pesos da PC2 dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ com pré-processamento <i>mean center</i> . Regiões destacadas em vermelho indicam os sinais do composto linalol.....	45

Figura 15. Escores de PC3 no eixo X (7,99% de variância explicada) e PC4 no eixo Y (5,90% de variância explicada). (A, vermelho) amostras de OE de paurosa autênticas e (U, verde) amostras não autênticas. ....	46
Figura 16. Gráfico de pesos da PC3 dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H com préprocessamento <i>mean center</i> . Regiões destacadas em vermelho indicam os sinais do composto linalol.....	47
Figura 17. Gráfico de pesos da PC4 dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H com pré-processamento <i>mean center</i> .....	48
Figura 18. Estrutura com carbonos enumerados do linalol. ....	49
Figura 19. Curva de calibração para a quantificação de linalol por CG-EM. ....	54
Figura 20. Diagrama de causa e efeito (Ishikawa) com as fontes de incerteza do método PULCON.....	60
Figura 21. Gráfico de treinamento de análise univariada em relação ao teor de linalol das amostras de OE de pau-rosa. (Vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (Verde) amostra não autênticas.....	64
Figura 22. Gráfico de treinamento de análise univariada em relação ao teor de linalol das amostras de OE de pau-rosa sem as amostras consideradas como outliers. (Vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (Verde) amostras não autênticas.....	66
Figura 23. Gráfico de validação de análise univariada em relação ao teor de linalol das amostras de OE de pau-rosa. (Vermelho) amostras de OE de paurosa autênticas e (Verde) amostras não autênticas.....	67
Figura 24. Estrutura com carbonos enumerados do benzoato de benzila.....	68
Figura 25. Gráfico de treinamento de análise univariada em relação a razão das áreas dos sinais do linalol (5,9 ppm) e do benzoato de benzila (8,07 ppm) das amostras de OE de pau-rosa (A). Gráfico de treinamento de análise univariada em relação a área da região entre 4,90 e 2,90 ppm das amostras de OE de pau-rosa (B). Zoom do gráfico apresentado em B (C) (Vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (Verde) amostras não autênticas .....	72
Figura 26. Gráfico de validação da análise univariada em relação a razão das áreas dos sinais do linalol (5,9 ppm) e do benzoato de benzila (8,07 ppm) das amostras de OE de pau-rosa (A). Gráfico de validação de análise univariada em relação a área da região entre 4,90 e 2,90 ppm das amostras de OE de pau-rosa (B). Zoom do gráfico apresentado em B (C) (Vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (Verde) amostras não autênticas .....	74
Figura 27. Gráfico de treinamento de análise multivariada com PLS-DA. (A, vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (U, verde) amostras não autênticas.....	76

Figura 28. Gráfico de validação de análise multivariada com PLS-DA. (A, vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (U, verde) amostras não autênticas.....	77
Figura 29. Espectros de RMN de <sup>1</sup> H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das amostras autênticas de OE de pau-rosa, inclusive as amostras obtidas do Peru .....	79
Figura 30. Dendrograma da Análise Hierárquica de Clusteres (HCA) para amostras de OE de pau-rosa autênticos. A1-11 são amostras do Brasil e AP são amostras do Peru .....	80
Figura 31. Escores de PC1 no eixo X (59,07% de variância explicada) e PC2 no eixo Y (15,37% de variância explicada). A1-11 são amostras do Brasil e AP são amostras do Peru .....	82
Figura 32. Gráfico de pesos da PC1 dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H somente das amostras autênticas e do Peru com pré-processamento <i>mean center</i> . A região destacada em vermelho indica o sinal do Benzoato de Benzila em 8,07 ppm (A). Ampliação da região destacada (B) .....	83
Figura 33. Gráfico de pesos da PC2 dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H somente das amostras autênticas e do Peru com pré-processamento <i>mean center</i> . Destaque em vermelho da região em que estão as variáveis mais influentes que diferenciam as amostras em PC2.....	84
Figura 34. Escores de PC3 no eixo X (9,35% de variância explicada) e PC4 no eixo Y (5,13% de variância explicada). A1-11 são amostras do Brasil e AP são amostras do Peru.....	86
Figura 35. Gráfico de pesos da PC3 dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H somente das amostras autênticas e do Peru com pré-processamento <i>mean center</i> . A região destacada em vermelho indica o sinal do Benzoato de Benzila em 8,07 ppm (A). Ampliação da região destacada (B) .....	87
Figura 36. Gráfico de pesos da PC4 dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H somente das amostras autênticas e do Peru com pré-processamento <i>mean center</i> . Destaque em vermelho referente a região do sinal do Benzoato de Benzila em 8,07 ppm e em verde região dos sinais de linalol (A). Ampliação da região destacada em vermelho (B) .....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados das amostras de óleo essencial de pau-rosa usados para análise.....	33
Tabela 2. Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....	33
Tabela 3. Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN bidimensionais.....	33
Tabela 4. Atribuição dos sinais de linalol e comparação com os dados da literatura (Hanneguelle, et al., 1992; Silva, 2011).....	50
Tabela 5. Teor médio de linalol e coeficiente de variação (CV) obtidos por meio da técnica de RMNq de $^1\text{H}$ para amostras de OE de pau-rosa autênticas (A) e não autênticas (U).....	52
Tabela 6. Teor médio de linalol obtidos por CG-EM e RMNq de $^1\text{H}$ .....	54
Tabela 7. Teor médio de linalol obtidos por CG-EM e RMNq de $^1\text{H}$ com valores corrigidos.....	56
Tabela 8. Teor médio de linalol corrigido e coeficiente de variação (CV) obtidos por meio da técnica de RMNq de $^1\text{H}$ para amostras de OE de pau-rosa autênticas (A) e não autênticas (U).....	57
Tabela 9. Erro relativo, em porcentagem, obtido para a técnica de RMNq de $^1\text{H}$ , tendo como valor de referência a técnica de CG-EM, após a correção do desvio sistemático. ....	58
Tabela 10. Valores de Sinal/Ruído (S/R) obtidos para o sinal em 5,90 ppm nos espectros de RMNq de $^1\text{H}$ .....	61
Tabela 11. Amostras de OE de pau-rosa divididas em amostras de treinamento e validação.....	63
Tabela 12. Atribuição dos sinais de benzoato de benzila e comparação com os dados da literatura (Mou, et al., 2017; Hassan e Mossa, 1981).....	69

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AM	Amazonas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Amapá
BBFO	Sonda <i>Broadband Observe</i>
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CITES	<i>Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora</i> (Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Fauna e Flora Selvagens em Perigo de Extinção)
COSY	<i>CO</i> rrrelation <i>S</i> pectroscopY (Correlação Espectroscópica)
CV	Coeficiente de Variação
D1	<i>Delay</i> (tempo de espera)
dd	Duplo duplete
DE	<i>Delay</i> de pré-aquisição
DMAPP	Difosfato de dimetilalila
DMSO <sub>2</sub>	Dimetil sulfona
DPR	Desvio Padrão Relativo
DS	<i>Dummy Scans</i> (Número de Varreduras fictícias)
ERETIC	Eletronic REference To acess In vivo COncentrations
EXPT	Tempo do experimento

FID	<i>Free Induction Decay</i> (Decaimento Livre de Indução)
FN	Falsos Negativos
FOB	<i>Free On Board</i>
FP	Falsos Positivos
GO	Goiás
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i> (Análise Hierárquica de Clusters)
HD	<i>High Definition</i> (Alta Definição)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> (Correlação de Ligação Múltipla Heteronuclear)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> (Correlação Heteronuclear Única Quântica)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPP	Pirofosfato de isopentenila
IQ	Instituto de Química
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i> (União Internacional para Conservação da Natureza)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (União Internacional da Química Pura e Aplicada)
LD	Limite de Detecção
lit.	Literatura

LPF	Laboratório de Produtos Florestais
LQ	Limite de Quantificação
LTDA	Sociedade de Responsabilidade Limitada
m	Múltiplo
MG	Minas Gerais
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MRC	Material de Referência Certificado
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)
NS	Número de <i>Scans</i> (varreduras)
OE	Óleo Essencial/ Óleos Essenciais
OPLS-DA	<i>Orthogonal Partial Least Squares – Discriminant Analysis</i> (Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais – Análise Discriminante)
P90	Pulso de 90°
PA	Pará
PC	<i>Principal Component</i> (Componente Principal)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise do Componente Principal)
PLS	<i>Partial Least Squares</i> (Mínimos Quadrados Parciais)
PLS-DA	<i>Partial Least Squares – Discriminant Analysis</i> (Mínimos Quadrados Parciais – Análise Discriminante)
PPM	Partes Por Milhão

PULCON            *PULse lenght based CONcentration determination*  
(Determinação de Concentração baseada no Comprimento do Pulso)

PW	Pulso de Excitação
PLW1	Potência do pulso a 90°
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RG	<i>Receiver Gain</i> (Ganho do Receptor)
RJ	Rio de Janeiro
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMNq	Ressonância Magnética Nuclear quantitativa
s	Simpleto
SBPC	Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência
SC	Santa Catarina
S/R	Sinal/Ruído
T <sub>1</sub>	Tempo de Relaxação Longitudinal
TD	Timer Domain (número de pontos)
TE	Temperatura
tqi	Tripla quinteto
TMS	Tetrametilsilano
USD	<i>United States Dollar</i> (Dólar dos Estados Unidos)
VL	Variáveis Latentes
VN	Verdadeiros Negativos
VP	Verdadeiros Positivos

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{s}$	Microsegundos
$\delta$	Desplazamiento Químico
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamiento
K	Kelvin
MHz	Mega Hertz
mg	Miligramo
mm	Milímetro
s	Segundos
W	Watts

# SUMÁRIO

Resumo .....	vi
Abstract.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas .....	xi
Lista de Siglas e Abreviações.....	xii
Lista de Símbolos.....	xvi
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>03</b>
<b>2.1. Objetivos gerais .....</b>	<b>03</b>
<b>2.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>03</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>04</b>
<b>3.1. Óleo essencial de <i>Aniba rosiodora</i> Ducke .....</b>	<b>04</b>
3.1.1. Comércio.....	07
3.1.2. Adulteração.....	10
<b>3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....</b>	<b>12</b>
3.2.1. Histórico e Fundamentos .....	12
3.2.2. RMN e Produtos Naturais .....	14
3.2.3. RMN quantitativo.....	16
<b>3.3. Quimiometria .....</b>	<b>23</b>
3.3.1. HCA ( <i>Hierarchical Cluster Analysis</i> ).....	25
3.3.2. PCA ( <i>Principal Component Analysis</i> ).....	25
3.3.3. PLS-DA ( <i>Partial Least Squares – Discriminant Analysis</i> ).....	26
<b>3.4. Quimiometria e RMN.....</b>	<b>27</b>
<b>3.5. Trabalho de Óleo de pau-rosa com Infravermelho .....</b>	<b>29</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1. Amostras.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2. Preparo de amostras .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3. Ressonância Magnética Nuclear .....</b>	<b>34</b>
4.3.1. Aquisição dos espectros de RMN.....	34

4.3.2. Processamento dos espectros de RMN .....	36
<b>4.4. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas .....</b>	<b>36</b>
4.4.1. Aquisição dos cromatogramas .....	34
4.4.2. Preparo de amostras.....	37
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1. Análise Exploratória .....</b>	<b>38</b>
<b>5.2. Caracterização do linalol por RMN bidimensional .....</b>	<b>49</b>
<b>5.3. Validação do método de quantificação de linalol por RMN .....</b>	<b>53</b>
5.3.1. Exatidão .....	58
5.3.2. Precisão .....	58
5.3.3. Incerteza .....	59
5.3.4. Sinal/Ruído.....	61
<b>5.4. Análise univariada com teor de Linalol .....</b>	<b>62</b>
<b>5.5. Caracterização do benzoato de benzila por RMN bidimensional....</b>	<b>68</b>
<b>5.6. PLS-DA como modelo de classificação .....</b>	<b>75</b>
<b>5.7. Análise das amostras autênticas com as amostras do Peru .....</b>	<b>78</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>90</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO A – Certificado de análise da pureza do DMSO<sub>2</sub>.....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO B – Certificado de análise da pureza do linalol .....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO C – Espectros de RMN monodimensionais e bidimensionais da amostra LPF-11-3.....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO D – Teor de linalol por amostra .....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXO E – Espectros e deslocamentos químicos do álcool benzílico ..</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO F – Espectros e deslocamentos químicos do etanol .....</b>	<b>108</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O óleo essencial (OE) da espécie *Aniba rosiodora*, mais conhecido como OE de pau-rosa, é amplamente usado na indústria de cosméticos devido ao seu *bouquet* de substâncias que imprime uma fragrância característica muito apreciada. Os componentes principais dos óleos essenciais são terpenos e fenilpropanóides, sendo o composto majoritário o linalol, um terpeno, fixador muito utilizado em perfumes. (Ohashi; Rosa; Santana, 1997; Moghaddam; Mehdizadeh, 2017; Contim e Contim, 2018).

O comércio e exploração do OE de pau-rosa são regulamentados pelo IBAMA (1992), sendo que a espécie *Aniba rosiodora* está na lista de espécies ameaçadas de extinção pela CITES (2011) e pela IUCN (2021), criadas para combater o comércio ilegal e a exploração desordenada. Como se trata de um produto natural e de alto valor econômico agregado, a adulteração desse óleo ocorre comumente com o objetivo de se aumentar o rendimento e ter um maior lucro. Misturas do OE de pau-rosa com outros óleos também são comercializadas, o que prejudica a economia ao causar uma concorrência desleal, e ainda expõe o consumidor a produtos não autênticos e que não exprimem segurança na composição (Corddella, et al., 2002; Mosandl, 2004). Por isso, se faz necessário um controle de autenticidade dos OE de pau-rosa comercializados.

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) possui uma riqueza de informações, mas de alta complexidade para análise, principalmente quando são analisadas amostras de matrizes complexas, como são as de produtos naturais. Dessa forma, a associação dessa técnica à métodos Quimiométricos de análise multivariada de dados é uma estratégia com muito potencial nas pesquisas de produtos naturais e metabolômica. Portanto, a combinação entre RMN e Quimiometria pode ser usada para a identificação de marcadores, pois possibilita o reconhecimento de padrões e a determinação da autenticidade dos OE de pau-rosa (Trygg; Holmes; Lundstedt, 2007; Freitas, et al., 2018).

A técnica de RMN também possibilita a quantificação de componentes de misturas nas amostras de óleos, desde que os espectros sejam adquiridos

respeitando-se o tempo de relaxação adequado, e observando-se outros parâmetros de aquisição e processamento, como por exemplo, o *shimming*, linha de base e faseamento dos espectros. Esses e outros parâmetros devem ser observados na aquisição e processamento dos espectros usados também nas análises quimiométricas (Claridge, 2009; Ferreira, 2015). A quantificação por RMN pode se dar pelo método do padrão interno, ERETIC (sinal eletrônico de referência) e pelo método PULCON que utiliza de referência externa (Rizzo; Pinciroli, 2005; Dreier; Wider, 2006; Monakhova, et al., 2014).

A análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) é um dos modelos de análise não-supervisionada e reconhecimento de padrões mais utilizados na quimiometria, pois busca reduzir o número de variáveis do conjunto de dados sem perder informações relevantes e torná-las mais fáceis de serem visualizadas e interpretadas. Uma outra análise não-supervisionada muito utilizada é a análise hierárquica de agrupamento (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*). Já o método de análise por regressão dos mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares – Discrimination Analysis*) é um método supervisionado frequentemente usado para distinguir classes previamente definidas e encontrar diferenças que expliquem a distinção das classes (Ferreira, 2015; Wold; Martens; Wold, 1982).

Assim, diante do exposto, nesse trabalho foi aplicada a técnica de RMN associada à Quimiometria para diferenciar OE autênticos e não-autênticos de pau-rosa. A partir da metodologia aplicada neste trabalho buscou-se encontrar algum componente do OE de pau-rosa que o caracterize e diferencie dos demais óleos, o que permitiu que esses componentes identificados pudessem ser quantificados pela técnica de RMNq de  $^1\text{H}$ .

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

Aplicar a técnica de RMN associada à quimiometria para diferenciar OE autênticos e não-autênticos de pau-rosa. A partir da metodologia aplicada a esse trabalho, buscou-se determinar e quantificar algum componente do OE de pau-rosa que o caracterize e diferencie os óleos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Obter espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de amostras de OE de pau-rosa e realização de análises quimiométricas pelos métodos de HCA e PCA para realizar uma análise exploratória do comportamento das amostras e PLS-DA a fim de discriminar as amostras da classe autêntica das amostras da classe não-autênticas.
- Determinar um ou mais possíveis marcadores ou componentes que contribuam na diferenciação das classes por meio das análises quimiométricas e dos espectros bidimensionais de RMN.
- Quantificar por meio da técnica de RMNq de  $^1\text{H}$  com padrão externo (PULCON) um possível marcador ou componente que contribua na diferenciação das classes.
- Validar o método de quantificação por meio da técnica de RMNq de  $^1\text{H}$  com padrão externo (PULCON).

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

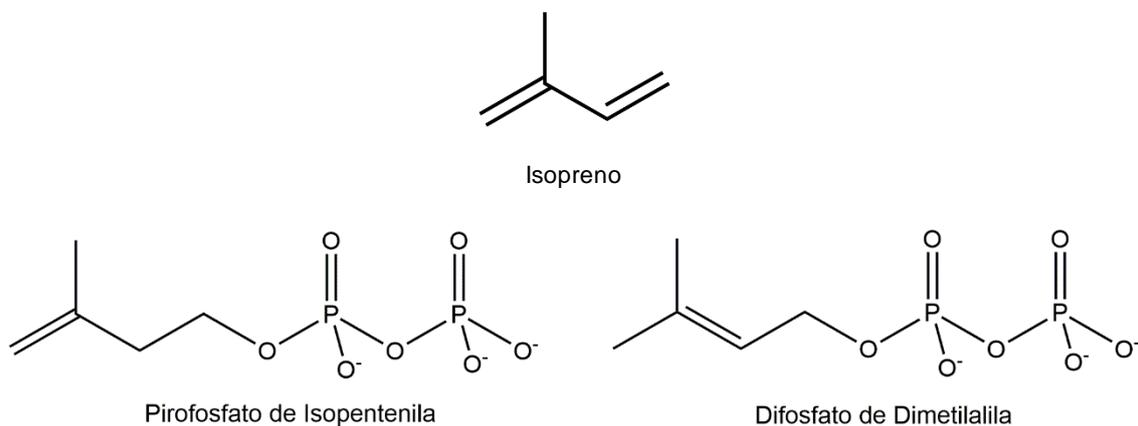
#### 3.1. Óleo essencial (OE) de *Aniba rosiodora* Ducke

*Aniba rosiodora* Ducke é uma espécie da família *Lauraceae*, e é comumente conhecida como pau-rosa. São árvores nativas da Amazônia e o OE de pau-rosa, extraído de diversas partes da árvore, tem como seu principal constituinte o linalol racêmico (Morais, et al., 1972; Ohashi; Rosa; Santana, 1997; Alencar e Fernandes, 1978). Plantas aromáticas são parte importante da economia da Amazônia, sendo utilizadas na alimentação, na medicina, cosméticos, aromaterapia e perfumaria (Barata, 2012).

A ANVISA define óleos essenciais como produtos voláteis de origem vegetal que são obtidos por processos físicos como destilação por arraste a vapor e destilação à pressão reduzida. Podendo ser misturados, retificados, desterpenados, concentrados ou isolados. São constituídos principalmente por terpenos, que são hidrocarbonetos (Brasil, 2007).

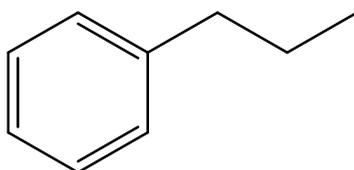
Os OE são líquidos à temperatura ambiente, voláteis, normalmente incolores, lipossolúveis e com uma densidade geralmente menor que a da água. A princípio, podem ser extraídos de todas as partes e órgãos das plantas (Bakkali, et al., 2008).

Os componentes principais dos OE são terpenos e fenilpropanóides (Moghaddam; Mehdizadeh, 2017). Os terpenos constituídos por combinações de várias unidades de 5 carbonos (C5) chamados de isoprenos (2-metil-1,3-butadieno). A biossíntese dos terpenos consiste na junção dos intermediários pirofosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetilalila (DMAPP), cujas estruturas estão apresentadas na Figura 1. Os principais terpenos são os monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15). Um terpeno que possui oxigênio em sua estrutura é chamado de terpenóide (Bakkali, et al., 2008; Moghaddam; Mehdizadeh, 2017).



**Figura 1.** Estruturas das moléculas de isopreno, IPP e DMAPP, intermediários presentes na biossíntese de terpenos.

Os fenilpropanóides (Figura 2) consistem em um anel fenólico ligado a uma cadeia alquila de três carbonos (C3). Eles podem ainda ter outros substituintes no anel, como grupos alquila e hidroxila. Podem também formar oligômeros a partir da estrutura básica formando estrutura  $(C_6-C_3-C_6)_n$ . Nos OE são encontrados mais frequentemente os fenóis ou éteres fenólicos. Entretanto, esses compostos aromáticos ocorrem com menos frequência do que os terpenos (Bakkali, et al., 2008; Moghaddam; Mehdizadeh, 2017).



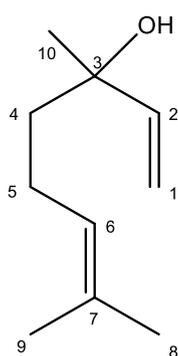
**Figura 2.** Estrutura básica do fenilpropanóides.

Segundo Moghaddam e Mehdizadeh (2017), existem fatores internos e externos à planta que podem interferir na composição dos OE. Dentre os fatores internos pode-se citar a genética, população, origem da planta, parte da planta da qual o óleo foi extraído, idade etc. Ao considerar os fatores externos, são incluídos fatores ambientais, como o clima e habitat, condições de cultivo e técnicas pós-colheita. Além disso, Bakkali, et al (2008) diz que o perfil químico dos OE não difere apenas no número de moléculas e concentração dos constituintes, mas também na estereoquímica das moléculas. Quando a molécula é opticamente ativa, os dois enantiômeros estão presentes em diferentes plantas, mas a mistura racêmica também pode ser encontrada em

algumas plantas. Isso pode ser afetado pela região da coleta e pela existência de diferentes espécies (Ohashi; Rosa; Santana, 1997; Bakkali, et al., 2008).

Além da composição, o rendimento da extração do óleo é um ponto importante para as atividades econômicas. Segundo Araújo et al. (1971), o rendimento em óleo depende em geral da estação do ano e da parte da árvore da qual o óleo é extraído, afirmando que um maior rendimento na extração do OE pelas folhas é obtido em comparação com o extraído da madeira. Local, período vegetativo e desenvolvimento da planta foram alguns fatores citados por Amazonas (2020) que também influenciam no rendimento do OE extraído das árvores de espécie *Aniba rosiodora*.

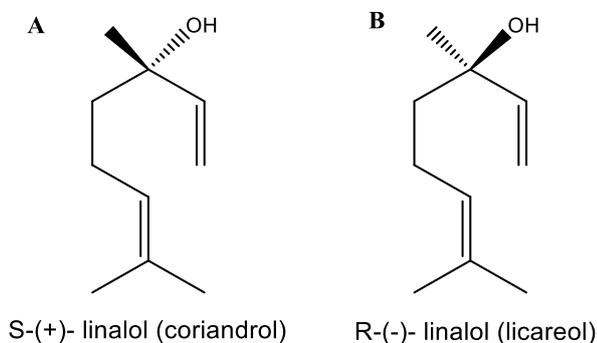
O linalol ( $C_{10}H_{18}O$ ), cujo nome IUPAC é 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (Figura 3), é o principal constituinte da espécie *Aniba rosiodora* (Ohashi, Rosa e Santana, 1997) e é caracterizado por ser um monoterpene alcoólico terciário acíclico de peso molecular 154,25 g/mol e densidade entre 0,858 e 0,867 g/mL (NCBI). Na estação chuvosa, o rendimento da extração do linalol é baixo devido à circulação da água pelas células oleíferas, que tende a solubilizá-lo. Outro fator que afeta a qualidade do óleo é a idade da árvore, quanto mais novas, mais ricas em linalol e quanto mais velhas maior a proporção de outros terpenos e óxidos de linalol (Araújo, et al., 1971).



**Figura 3.** Estrutura com carbonos enumerados do linalol, com nome IUPAC 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol.

Por conta do terceiro carbono (C3) ser quiral, os dois enantiômeros de linalol podem ser encontrados nas plantas, o *S*-(+)-linalol, comumente chamado de coriandrol (Figura 4A) e *R*-(-)-linalol, chamado de licareol (Figura 4B). A fragrâncias dessas duas substâncias se diferem, sendo o coriandrol

percebido como aroma doce, floral, herbáceo e com notas cítricas e frutadas, já o licareol tem aroma amadeirado e de lavanda (Aprotosoiaie, et al., 2014; Lara, et al., 2018).



**Figura 4.** Estrutura dos enantiômeros do linalol, coriandrol (A) e licareol (B).

Componente de OE, o linalol é extraído de várias espécies de plantas da flora brasileira, principalmente no Norte e Nordeste do país. Dentre essas plantas pode-se citar algumas conhecidas como o pau-rosa (*Aniba rosiodora*), a tangerina (*Citrus reticulata*), a bergamota (*Citrus bergamia*), o jasmin (*Jasminum auriculatum*), a lavanda (*Lavandula dentata*), o manjeriço (*Ocimum gratissimum*) e o coentro (*Coriandrum sativum*) (Camargos; Vasconcelos, 2014).

Por ser uma espécie rica em linalol, a *Aniba rosiodora* tem seu óleo amplamente usado como fixador pela indústria de perfumaria e os produtos mais refinados utilizam o linalol natural (Marques, 2001; Camargos; Vasconcelos, 2014), como o Chanel n°5 criado em 1920, famoso perfume francês (Homma, 2003). Apesar da existência do linalol sintético, o *bouquet* de óleos encontrados na espécie é muito particular e não é substituível pelo sintético (Contim; Contim, 2018). Além do potencial uso na indústria de perfumes, foram confirmadas atividades terapêuticas, que despertaram o interesse da indústria farmacêutica (Kohn, et al., 2012; Everton, et al., 2020; Teles, et al., 2021; Sampaio, et al., 2012; Guimarães, et al., 2011).

### 3.1.1. Comércio

A exploração do pau-rosa começa com a identificação e corte das árvores. Os troncos cortados vão para as destilarias para serem processados e moídos. Essa é uma tecnologia antiga e destrutiva e contribui para a extinção

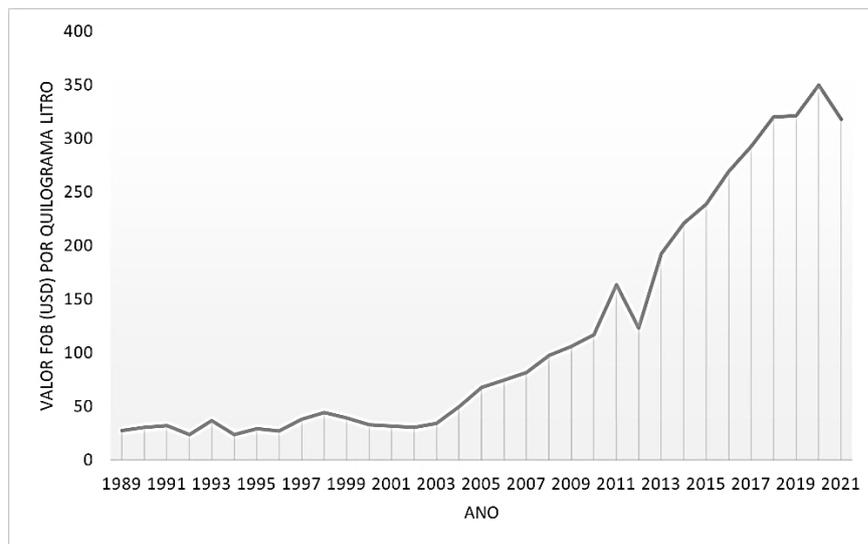
da planta (Contim; Contim, 2018). A obtenção dos óleos voláteis é feita por processos de destilação, como a hidrodestilação e a destilação por arraste de vapor d'água, sendo que ambos os processos se baseiam na alta pressão de vapor dos óleos (Simões, et al., 2017).

A produção comercial do OE de pau-rosa começou na América do Sul no século XX e em meados de 1950 era amplamente exportado, mas no final da década de 1960 o linalol sintético foi introduzido no mercado fazendo com que a exportação do OE declinasse. Além disso, o ressurgimento de folhas e madeiras de Ho da China (*Cinnamom camphora*) que possui teor de linalol semelhante ao do pau-rosa, ajudou no declínio das exportações do OE de pau-rosa. Na década de 1980 sua exportação estabilizou por volta de 100 toneladas por ano e posteriormente começou a ser exportado por demanda. Seu primeiro lugar no mercado é na América do Norte e na Europa Ocidental (Ohashi; Rosa; Santana, 1997).

O OE de pau-rosa possui larga demanda e um alto valor agregado nacional e internacionalmente. A disponibilização dos dados pelo Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços em relação a exportação de OE de pau-rosa começou no ano de 1989. Nos anos 2000 a quantidade exportada ainda era acima de 30 toneladas por ano e tinha um valor aproximado de US\$ 33,00/kg (Brasil, 1989-2021). Pela primeira vez, em 2010, foi exportado menos de 5 toneladas desse óleo. Em contrapartida, o valor aproximado por quilograma líquido foi de US\$ 116,00. Desde 2018, o valor por quilograma líquido é maior que US\$ 300,00. A quantidade exportada em 2020 foi de apenas 360 kg com valor de US\$ 350,00/kg e em 2021 foram exportados 1440 kg por aproximadamente US\$ 318,00/kg (Brasil, 1989-2021).

Com os dados do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços é possível visualizar o aumento do valor agregado ao OE de pau-rosa no comércio exterior pelo gráfico apresentado na Figura 5. O valor FOB (*Free on Board*) refere-se ao preço da mercadoria em dólares americanos em que o vendedor assume a responsabilidade de embarcar a mercadoria, sendo o frete responsável pelo comprador, além de seguros e demais custos pós-embarque,

ou seja, o valor informado é exclusivamente da mercadoria, onde quilograma líquido expressa o preço líquido da mercadoria (Brasil, 2020).



**Figura 5.** Gráfico dos valores FOB em USD por quilograma litro de óleo com o passar dos anos.

Em decorrência de uma exploração desordenada, na Região Amazônica, várias espécies de árvores de alto valor econômico são consideradas ameaçadas de extinção (Morais, et al., 1972; Rosa, et al., 1997). Considerando o potencial econômico do OE de pau-rosa, sua exploração seguiu o modelo predatório clássico, no qual o propósito era um maior lucro em menos tempo. Esse modelo extrativista baseava-se no corte raso indiscriminado, sem considerar a idade das plantas, a regeneração e a recomposição das populações (Krainovic, et al., 2017).

A exploração das árvores da espécie *Aniba rosiodora* se tornou insustentável, pois praticamente todas as árvores foram derrubadas para a produção do óleo nas destilarias. Foi estimada em, no mínimo, 825 mil árvores de pau-rosa na Amazônia brasileira derrubadas entre os anos de 1937 e 2002 (Lara; Costa; Sampaio, 2021). Com a exploração desordenada, praticamente não se existem mais populações naturais de pau-rosa, limitando-se agora a plantações e algumas regiões remanescentes em reservas florestais no Brasil (Contim; Contim, 2018).

Tudo isso levou a espécie a receber, na 15ª Conferência das Partes (CoP15) em 2010, o status de ameaçada de extinção, entrando na lista da

CITES, apêndice II, em que está incluso as toras de madeira, madeira serrada, folhas de madeira, madeira compensada e OE da espécie *Aniba rosiodora*. Isso quer dizer que, a espécie é protegida pela CITES contra a exploração excessiva pelo comércio internacional (CITES,2011).

Em 2020, foi a última verificação da *Aniba rosiodora* pela União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais das espécies ameaçadas (IUCN), e a espécie continua na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN, considerada como em perigo e em declínio de população (IUCN, 2021; Barstow, 2021).

No Brasil, a regulamentação se dá desde 1992 pelo IBAMA. A Portaria IBAMA N° 37-N de 03 de abril de 1992 incluiu na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção a espécie *Aniba rosiodora* Ducke (Brasil, 1992). Em 2014 o Ministério do Meio Ambiente publicou a Portaria MMA n° 443 que se refere a Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção e a *Aniba rosiodora* se encontra como “Em Perigo” (Brasil, 2014).

A inclusão da espécie nas listas da CITES e IUCN, significa um processo de combate ao comércio ilegal da espécie entre os países signatários, o que somado às restrições impostas pela legislação brasileira, coibiu a extração predatória e irregular (Lara; Costa; Sampaio, 2021).

Para tentar encontrar formas de explorar o OE de pau-rosa sem provocar a extinção da espécie, foram feitos estudos a fim de comparar o rendimento e qualidade do óleo extraído das folhas das árvores do extraído comumente pela madeira da árvore. Foi confirmado que o óleo obtido de folhas e galhos apresenta qualidade semelhante ao da madeira (May; Barata, 2004; Sampaio, et al., 2003; Souza, et al., 2011).

### **3.1.2. Adulteração**

O uso de matérias-primas naturais é visto como uma forte vantagem no mercado devido à crescente busca de produtos considerados orgânicos, veganos, sustentáveis, e com menos aditivos químicos. Inclusive são produtos

que possuem vantagens de marketing, por serem atrativos ao consumidor. Porém, os extratos naturais são muito mais caros do que os materiais sintéticos, logo, existem muitos casos de adulteração (Culp; Noakes, 1990). Portanto, a autenticidade dos OE é de grande importância para os consumidores e para a economia. Para os consumidores, há a importância de se saber realmente o que se está consumindo e se ter uma segurança diante disso. Economicamente, a autenticação tem como finalidade evitar concorrência desleal que prejudique o mercado (Corddella, et al., 2002; Mosandl, 2004). Além disso, com a alta relevância comercial dos OE, a otimização dos lucros usando materiais sintéticos mais baratos adicionados ao óleo natural é uma consequência, assim como a mistura de outros óleos voláteis, mas que possuem preço de mercado inferior, a fim de aumentar o rendimento e obter maior retorno financeiro (König; Hochmuth, 2004; Salgueiro; Martins; Correia, 2010; Souza, et al., 2011).

Para atestar a autenticidade dos OE existem técnicas analíticas que podem ser usadas para detectar adulterantes conhecidos, embora os constituintes químicos dos OE, como dito anteriormente, variem dependendo da colheita, estação, clima, habitat, processo de colheita e pós-colheita. Com isso, a autenticidade pode ser controlada usando valores quantitativos, visto que vários regulamentos levam em consideração a variabilidade da composição química (Do, et al., 2015). Nesse sentido, é importante destacar que a diferença enantiomérica que o linalol possui é útil no controle de qualidade dos OE e dos óleos-resinas, pois podem atestar a autenticidade (Ravid, et al., 1997).

Com a preocupação crescente na preservação da floresta Amazônica e a exigência da indústria para um óleo de pureza elevada, além de todas as legislações e regulações quanto a espécie *Aniba rosiodora*, é necessário um controle de autenticidade dos OE comerciais (Pastore, et al., 2022).

## **3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

### **3.2.1. Histórico e Fundamentos**

A espectroscopia de RMN é comumente usada na elucidação de estrutura, tanto de compostos sintetizados quanto de produtos naturais ou semissintéticos (Holzgrabe, 2010). Além disso, é uma técnica analítica versátil e poderosa e pode ser aplicada tanto a materiais sólidos quanto líquidos, e tem se tornado cada vez mais popular na análise de alimentos, bebidas, óleos e lipídeos, legumes, carnes e laticínios (Claridge, 2009; Hatzakis, 2018).

A técnica teve seu primeiro sucesso demonstrado por dois grupos simultaneamente. Em Harvard, por Purcell, Torrey e Pound em 1945 e em Stanford por Bloch, Hansen e Packard no mesmo ano (Andrew, 1992). Jungnickel e Forbes (1963) descreveram a utilização da RMN para quantificação, quando utilizaram a técnica para determinar pureza e quantidade de hidrogênio em mais de 20 compostos.

A utilização da RMN normalmente não requer um pré-tratamento da amostra, como separação e purificação do analito. Além disso, um único espectro de hidrogênio é capaz de fornecer muitas informações, como informações estruturais, de composição dos principais constituintes e ainda pode fornecer dados quantitativos (Tavares; Ferreira, 2006). A técnica possui caráter não destrutivo e de alta precisão e reprodutibilidade e com alto potencial de análises de multicomponentes (Hatzakis, 2018).

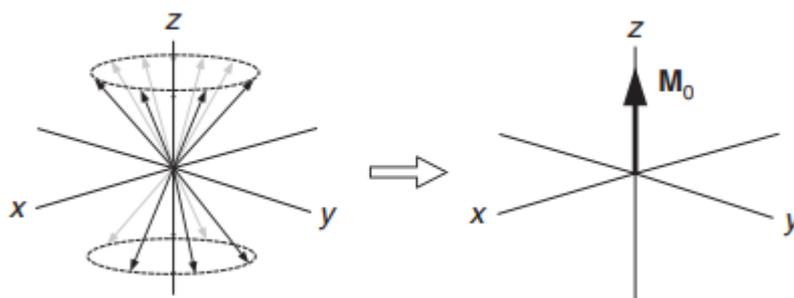
Hollis (1963) no início da utilização da técnica também apontou a quantificação por RMN como uma técnica direta e que não necessita de curva de calibração, requerendo na maioria das vezes apenas um padrão de referência que pode ser diferente do analito. Essa facilidade decorre do fato que as absorvidades para os prótons dos sinais de interesse dos espectros serem constantes e não serem alterados significativamente por interações com solventes.

Porém, assim como todas as técnicas, quando comparadas entre elas, possuem barreiras a serem superadas. Dentre as limitações da técnica de RMN está o alto custo de equipamentos e manutenções e a sua baixa

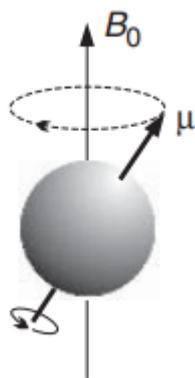
sensibilidade, principalmente quando comparada à Cromatografia Gasosa (Wolfender, et al., 2019, Malz e Jancke (2005).

A espectroscopia de RMN é baseada nas propriedades magnéticas de núcleos que possuem spin nuclear ( $S$ ) e que, portanto, são caracterizados por um número quântico de spin nuclear ( $I$ ) diferente de 0. Os spins nucleares possuem momento angular ( $P$ ) e carga. A movimentação dessa carga dá origem a um momento magnético ( $\mu$ ) (Claridge, 2009). Na ausência de um campo magnético, as orientações dos spins nucleares possuem a mesma energia mas, caso um campo magnético externo ( $B_0$ ) seja aplicado, diferentes estados de energia são gerados e uma divisão populacional ocorre entre os spins nucleares. Em termos quânticos elementares, os prótons podem ser encontrados em dois estados energéticos quantizados,  $+\mu B$  ( $\beta$ ) ou  $-\mu B$  ( $\alpha$ ) (Hatzakis, 2018).

Em um campo magnético ( $B_0$ ), a somatória dos momentos magnéticos dos núcleos dará origem a um momento magnético resultante ( $M$ ) alinhado ao campo, pois esse alinhamento favorece a mais baixa energia (Figura 6). Os núcleos precessam a uma frequência angular  $\omega = \gamma B$ , em que  $\gamma$  é a constante giromagnética, e que é conhecida por frequência de Larmor (Figura 7). Esta conclusão deriva dos resultados encontrados por Sir Joseph Larmor em 1897 (Andrew, 1992).

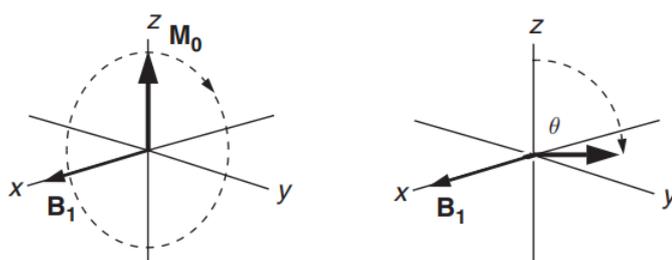


**Figura 6.** Momento magnético resultante ( $M$ ) dos prótons alinhados ao campo magnético  $B_0$  (Claridge, 2009).



**Figura 7.** Movimento de Precessão (Claridge, 2009).

Caso seja aplicada uma radiação eletromagnética na região de radiofrequência (RF) equivalente à diferença energética entre os dois estados magnéticos, pode ocorrer uma transferência ressonante de energia entre os núcleos e o campo eletromagnético, que caracteriza o efeito de ressonância. Isso faz com que o momento magnético resultante ( $M$ ), que se orienta ao longo do eixo  $z$ , se afaste de  $B_0$ , por conta da excitação dos núcleos e se inclinem em direção ao plano  $xy$ . O fenômeno é apresentado na Figura 8, em que  $B_1$  se trata do campo magnético fornecido pelo componente magnético da RF aplicada. O sinal de RMN é detectado através da emissão do fóton no retorno dos núcleos ao estado de menor energia, alinhados ao campo magnético externo ( $B_0$ ) (Andrews, 1992; Hatzakis, 2018).



**Figura 8.** Excitação dos prótons alinhados ao campo  $B_0$  no eixo  $z$  que se deslocam em direção plano  $xy$ . (Claridge, 2009)

### 3.2.2. RMN e Produtos Naturais

Os produtos naturais são uma classe de compostos químicos únicos e valiosos agentes biologicamente ativos, o que resulta em uma alta demanda analítica para testar seu desvio do ideal de composição, diz Pauli, Jaki e Lankin

(2005). Os experimentos monodimensionais e bidimensionais de RMN e experimentos quantitativos (RMNq) mostram-se ser adequados para o reconhecimento seletivo e simultâneo de metabólitos em matrizes complexas como a dos OE (Pauli; Jaki; Lankin, 2005).

A RMN é uma das técnicas mais adequadas para realizar análises qualitativas e quantitativas de produtos naturais, por serem capazes de fornecer informações como (i) estrutura química, (ii) equilíbrios estruturais, (iii) determinação da pureza dos agentes bioativos, (iv) determinação de impurezas e (v) exploração dos análogos estruturais e composição metabolômica (Bharti; Roy, 2012).

Junto a análises estatísticas multivariadas, a espectroscopia de RMN tem sido aplicada com sucesso na caracterização de produtos derivados de plantas para controle de qualidade, autenticação, determinação de origem geográfica e detecção de adulteração. As abordagens sobre perfis metabólicos se concentram nos conceitos quantitativos de RMN, enquanto os marcadores são compreendidos como uma ferramenta geradora de hipóteses que buscam diferentes padrões entre as amostras com ajuda de métodos estatísticos (Holmes, et al., 2006).

Uma vantagem do uso de RMN na análise de produtos naturais, que em geral são misturas complexas, é que qualquer composto orgânico presente, seja ele característico do produto ou um adulterante, será detectado com a mesma sensibilidade de todos os analitos, sem limitações de detecção por falta de volatilidade, como no caso da cromatografia gasosa (CG) por exemplo (Schripsema; Silva; Dagnino, 2022).

Produtos naturais que normalmente costumam ser analisados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) vêm sendo analisados recentemente por RMN (Breton; Reynolds, 2013). Abouzid (2016) analisou *trans*-anetol, um fenilpropanóide contido no OE de Fennel, através da espectroscopia de RMN; Cerceau e colaboradores (2020) quantificaram citronelal, citronelol e geraniol no OE de Citronela; Rivero-Cruz e colaboradores (2006) detectaram e quantificaram constituintes do OE de

*Brickellia veronicifolia*; Freitas e colaboradores (2018) analisaram OE de diferentes espécies do gênero *Ocimum* e caracterizaram e quantificaram componentes predominantes de algumas espécies, como o eugenol, estragol e cinamato de metila; Cerceau e colaboradores (2016) quantificaram alfa-bisabolol em OE de candeia.

A identificação de produtos naturais puros por RMN normalmente consiste em obter dados dos espectros, como os deslocamentos químicos, informações de multiplicidades, valores de constantes de acoplamento e comparar essas informações em bases de dados e literaturas para confirmar com valores experimentais ou previstos dos sinais de RMN encontrados. Nesse caso, os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  são os mais utilizados, por possuírem sinais menos complexos. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  se mostram suficientes para revelar a presença de biomarcadores em estudos de metabolômica, mas para assegurar sua identificação estrutural pode-se usar a interpretação de espectros monodimensionais e bidimensionais (1D e 2D) (Wolfender, et al., 2019).

Ainda há uma relevante ausência de bancos de dados espectrais de produtos naturais que sejam de amplo acesso e aberto, especialmente de RMN. Dessa forma, tem sido encorajada a utilização da técnica, que se mostra com alto potencial de elucidação de estruturas e de quantificação. Existe uma enorme gama de experimentos que são possíveis de serem feitos pela espectroscopia de RMN e que podem auxiliar no estudo dos produtos naturais (Halabalaki, et al., 2014).

### **3.2.3. RMN quantitativo**

Nos dias de hoje, a quantificação por RMN (RMNq) é uma técnica estabelecida em diversas áreas, como drogas (Almeida, et al., 2018; Benedito; Maldaner; Oliveira, 2018), vacinas (Jones, 2005), produtos naturais (Wang, et al., 2021), metabolômica (Barding; Salditos; Larive, 2012), diagnóstico de doenças (Himmelreich, et al., 2009), gasolina (Ure; O'Brien; Dooley, 2019), alimentos (Hatzakis, 2018) e bebidas (Tabago, et al., 2021; Zielinska, et al., 2022).

A principal vantagem que pode ser observada ao fazer uma análise quantitativa pela RMNq quando comparada a outras técnicas analíticas, é por ser uma análise que não requer o uso de padrões específicos do analito a ser quantificado ou calibrações com o mesmo. Além disso, é uma análise simples e rápida. Muitas das vezes o preparo se resume a dissolver a amostra em um solvente deuterado e a análise em si leva apenas alguns minutos (Forshed, et al., 2005).

Os processos de validação através das figuras de mérito, como linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, robustez, seletividade e estabilidade, tem provado que a espectroscopia de RMN é uma boa técnica analítica para utilização quantitativa (Almeida, et al., 2018; Benedito; Maldaner; Oliveira, 2018).

Cada vez mais a RMNq está se tornando mais importante para a análise de produtos naturais e metabólica, que buscam analisar a massa total de metabólitos primários e/ou secundários de um organismo. A avaliação qualitativa e quantitativa de “impressões digitais” que a espectroscopia de RMN fornece, é um componente importante para as análises quimiométricas (Pauli; Jaki; Lankin, 2005).

Uma preocupação que se aplica aos produtos naturais, é a disponibilidade limitada de materiais de referência que sejam certificados altamente puros. Nesse aspecto, a RMNq representa uma solução muito prática e relevante (Pauli; Jaki; Lankin, 2005). Pois, como destacado anteriormente, a principal característica analítica da análise quantitativa de RMN é que pode ser aplicada na estimativa de pureza de compostos sem a necessidade do uso de qualquer padrão de referência específico, ou seja, não é preciso usar o padrão do analito de estudo, sendo possível usar outros padrões, que podem ser mais fáceis de obter (Bharti; Roy, 2012).

A intensidade do sinal ( $I$ ) dos espectros de RMN é diretamente proporcional ao número de núcleos ( $N$ ), podendo então o sinal ser usado para quantificar compostos apenas medindo a área sob o sinal, ou seja, integrando o sinal. Para isso, a RMNq requer uma maior observação para as condições de

análise como a homogeneidade do campo magnético (*shimming*), a sintonia da radiofrequência (*tuning*) e demais parâmetros de aquisição e processamento (Holzgrabe, 2010; Pauli; Jaki; Lankin, 2005), como será descrito a seguir.

A mais importante relação fundamental na RMNq é a resposta do sinal, ou seja, a área do sinal integrada ( $I_x$ ), que é diretamente proporcional ao número de núcleos ( $N_x$ ):

$$I_x = K_s N_x \quad (1)$$

Onde  $K_s$  é uma constante do espectrômetro. Deve-se destacar que a relação de proporcionalidade entre  $I_x$  e  $N_x$  somente é observada perfeitamente caso todos os núcleos do analito possam ser excitados durante a análise de RMN. Em experimentos em que todas as moléculas estão submetidas às mesmas condições experimentais,  $K_s$  é o mesmo, logo pode ser feita a seguinte relação:

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{N_1}{N_2} \quad (2)$$

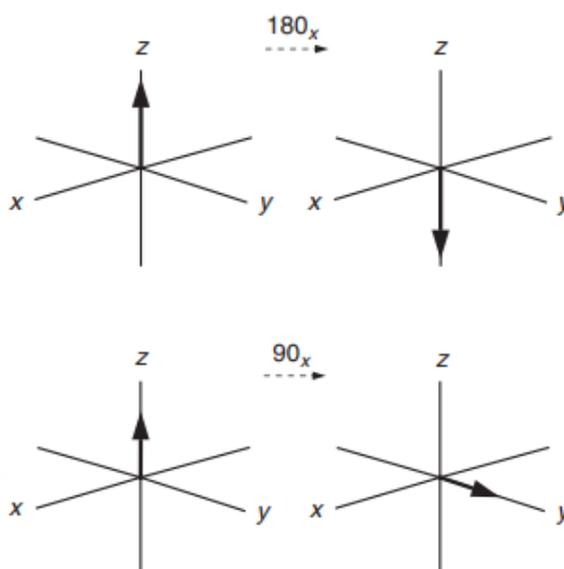
Existem dois tipos de quantificação por RMN, relativa e absoluta. A relativa se trata da medição da fração molar de cada espécie, já a absoluta retorna o valor direto da quantidade real de um analito presente na amostra. A partir das equações (1) e (2), é possível realizar uma quantificação relativa, através da razão molar de dois compostos, X e Y, sendo  $n_x$  o número de mols do composto X e  $n_y$  do composto Y:

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{I_x N_y}{I_y N_x} \quad (3)$$

Ao se inserir um padrão a uma mistura, é possível obter resultados de quantificações absolutas como as concentrações de substâncias.

Para que o valor de  $K_s$  seja constante para sinais de moléculas distintas é preciso que os experimentos respeitem certas condições de aquisição, como a excitação de pulso (que deve ser uniforme em toda a largura espectral) e o tempo de aquisição (Bharti; Roy, 2012).

Existem parâmetros experimentais que afetam a precisão quantitativa, dessa forma, é preciso uma otimização cuidadosa antes da análise. Como o pulso de excitação (pw) que é usado para excitar todos os núcleos magnéticos ao mesmo tempo. Um pulso de  $90^\circ$  desloca a magnetização resultante (M) do eixo +z para o plano x-y, onde o sinal máximo é alcançado. Já o pulso de  $180^\circ$  causa uma inversão do eixo +z para o -z (Figura 9). O retorno do vetor magnetização (M) para o equilíbrio se dá pelo relaxamento longitudinal, em que a população de spins retorna ao equilíbrio e perdem energia. Esse relaxamento é geralmente referido como  $T_1$ . Para que os spins relaxem totalmente depois de um pulso de  $90^\circ$  é necessário aguardar um período de pelo menos 5 vezes o  $T_1$ . Para determinar o valor de  $T_1$ , o sistema de spin no equilíbrio térmico é perturbado e então sua recuperação é observada em função do tempo (Claridge, 2009).



**Figura 9.** Deslocamento do momento magnético resultante devido ao pulso de excitação (Claridge, 2009).

Além disso, a eficácia do pulso de  $90^\circ$  pode variar de amostra para amostra, pois depende das propriedades físico-químicas dessa. Para obter

uma melhor precisão e exatidão, o pulso de 90 deve ser calibrado para cada amostra (Bharti; Roy, 2012).

Bharti e Roy (2012) também relatam os pontos de dados no domínio do tempo (TD) e homogeneidade do campo como possíveis fatores que podem afetar a análise de RMNq. Em espectrômetros de RMN modernos com computadores de alta memória e velocidade, 64k de pontos de dados é adequado para a quantificação. A homogeneidade do campo magnético deve ser alcançada para que não se crie uma distorção de sinal ou formato de picos inadequados, o que resultaria em baixa resolução e baixa relação sinal/ruído (S/R).

Para que seja possível obter uma quantificação eficiente, pelo menos um dos sinais do analito o qual se quer quantificar deve estar separado dos demais sinais da mistura no espectro e, portanto, com ausência de sobreposições. Dessa forma, é necessária uma correta atribuição dos sinais de RMN e uma escolha cuidadosa do sinal a ser usado na quantificação. A presença das bandas de satélites de carbono também pode interferir no sinal de interesse, alterando a área de integração, sendo necessário que essa área seja subtraída da área do sinal do analito. (Claridge, 2009).

No processamento, deve-se também observar a correção da fase para medir precisamente a intensidade do sinal, pois o erro na medição do pico pode afetar na obtenção da concentração absoluta ou relativa nas análises quantitativas. É preferível que se faça a correção manual, pois a correção automática costuma distorcer pequenos sinais. A correção da linha de base também é um fator importante para que não seja introduzido um erro significativo durante a integração do pico e conseqüentemente na análise quantitativa (Kaisar, et al., 2008; Bharti; Roy, 2012).

Um método muito utilizado para quantificar analitos pela técnica de RMN é uso do padrão interno, em que se escolhe um composto de referência altamente puro e estável, além de solúvel no mesmo solvente de sua amostra, para ser adicionado à solução analisada. O padrão também deve ser inerte e possuir sinal em uma região livre de sinais da amostra nos espectros, ou seja, os sinais do padrão não devem se sobrepor aos sinais da amostra. Uma

alternativa ao método de padrão interno, é o método de referência externa e eletrônica, conhecido como ERETIC (Eletronic REference To access In vivo CONcentrations), que utiliza um sinal eletrônico de referência para a quantificação (Rizzo; Pinciroli, 2005). Uma vantagem do método ERETIC é que esse sinal pode ser deslocado para uma faixa do espectro livre de sinais e interferentes, evitando uma sobreposição dos sinais do analito (Malz, 2008).

Outra forma de obter as mesmas vantagens do método ERETIC é através do algoritmo PULCON (*PULse lenght based CONcentration determination*) que é capaz de relacionar a intensidade de sinais de dois espectros diferentes (Dreier; Wider, 2006). A metodologia é baseada no princípio de reciprocidade, o qual afirma que a intensidade do sinal de RMN é inversamente proporcional ao comprimento do pulso de 90°. PULCON é de fácil implementação e aplicação em todos os espectrômetros de RMN, sem a necessidade de hardware ou software específico (Dreier; Wider, 2006; Monakhova, et al., 2014).

No método PULCON, se a concentração da referência externa ( $C_{std}$ ) é conhecida e o pulso 90 de todas as amostras forem precisamente calibradas, a concentração desconhecida do analito ( $C_x$ ) pode ser determinado pela equação (Dreier; Wider, 2006):

$$C_x = f_T C_{std} \frac{I_x T_x \theta_x^{90} n_{std}}{I_{std} T_{std} \theta_{std}^{90} n_x} \quad (4)$$

na qual os índices x e std se referem, respectivamente, a amostra e a referência.  $C$  é a concentração,  $I$  é a integral absoluta do sinal,  $T$  a temperatura,  $\theta^{90}$  o valor do pulso de 90 graus,  $n$  o número de transientes e  $f_T$  é um fator responsável por variações nas intensidades de sinais, caso as medições dos espectros tenham sido feitas em condições diferentes. Esse fator é igual a 1 quando não há diferenças nas medições de ambos os espectros. A equação é válida quando os espectros são adquiridos pela mesma sonda de RMN e corretamente sintonizada (Dreier; Wider, 2006).

Para cálculo da pureza através da equação 4, é preciso expandir os termos das concentrações (Benedito; Maldaner; Oliveira, 2018):

$$\frac{m_x^{grav} P_x N_x}{M_x V_x} = f_T \frac{m_{std}^{grav} P_{std} N_{std}}{M_{std} V_{std}} \frac{I_x T_x \theta_x^{90} n_{std}}{I_{std} T_{std} \theta_{std}^{90} n_x} \quad (5)$$

Os novos termos são: a massa gravimétrica  $m^{grav}$ , a pureza ( $P$ ), o número de prótons relacionados ao sinal ( $N$ ), a massa molar da substância ( $M$ ) e o volume de solvente ( $V$ ). Para o termo de pureza do analito temos:

$$P_x = f_T \frac{I_x N_{std} M_x m_{std}^{grav}}{I_{std} N_x M_{std} m_x^{grav}} P_{std} \frac{V_x T_x \theta_x^{90} n_{std}}{V_{std} T_{std} \theta_{std}^{90} n_x} \quad (6)$$

Com a intenção de minimizar a incerteza associada ao método, ao invés do uso do volume, pode ser usada a massa e a densidade do solvente:

$$P_x = f_T \frac{I_x N_{std} M_x m_{std}^{grav}}{I_{std} N_x M_{std} m_x^{grav}} P_{std} \frac{m_x^{solv} / d_x^{solv} T_x \theta_x^{90} n_{std}}{m_{std}^{solv} / d_{std}^{solv} T_{std} \theta_{std}^{90} n_x} \quad (7)$$

Sendo  $m^{solv}$  e  $d^{solv}$  a massa e densidade do solvente respectivamente. Caso o mesmo solvente seja usado para preparar as amostras e a referência externa, a razão das densidades será igual a 1:

$$P_x = f_T \frac{I_x N_{std} M_x m_{std}^{grav}}{I_{std} N_x M_{std} m_x^{grav}} P_{std} \frac{m_x^{solv} T_x \theta_x^{90} n_{std}}{m_{std}^{solv} T_{std} \theta_{std}^{90} n_x} \quad (8)$$

Em resumo, os termos presentes na equação final (8) são: pureza ( $P$ ), integral absoluta do sinal ( $I$ ), número de núcleos associados ao sinal ( $N$ ), massa molecular ( $M$ ), massa gravimétrica ( $m^{grav}$ ), massa do solvente ( $m^{solv}$ ), temperatura de aquisição ( $T$ ), o valor calculado do pulso de  $90^\circ$  ( $\theta^{90}$ ), o número de varreduras ( $n$ ) e por fim, o fator de correção associado a diferenças nas condições de aquisição dos espectros ( $f_T$ ).

### 3.3. Quimiometria

A quimiometria associada à RMN tem seu crescente uso em pesquisas como nas áreas de metabolômicas (Trygg; Holmes; Lundstedt, 2007), alimentos e bebidas (Monakhova; Kuballa; Lachenmeier, 2013), óleos vegetais (Popescu, et al., 2015), autenticação (Pacholczyk-Sienicka, et al., 2021), óleos essenciais (Freitas, et al., 2018); farmacêutica (Monakhova; Holzgrabe; Diehl., 2018).

A Sociedade de Quimiometria (Ferreira, 2015) define a quimiometria como a aplicação de ferramentas matemáticas e estatísticas à química. A quimiometria surgiu da necessidade da utilização de ferramentas matemáticas e estatísticas capazes de transformar grandes conjuntos de dados numéricos em informações químicas úteis. Com o grande avanço tecnológico na área instrumental, em que espectrômetros e cromatógrafos foram adicionados à rotina dos químicos e nos laboratórios analíticos, houve um aumento na variedade de dados obtidos (Ferreira, 2015). Dentre as várias áreas da Quimiometria, o “reconhecimento de padrões em Química”, como cita Kowalski (1975) se destaca pela busca de correlações de padrões ocultos em dados de medições analíticas que normalmente não são observados devido ao constante uso de métodos limitados de baixa dimensão.

Ferreira (2015) relata que para os dados adquiridos serem considerados úteis, é necessário que sua aquisição se dê de maneira adequada, para evitar desperdício de tempo e de recursos. Assim, os dados obtidos devem ser organizados em matrizes representadas por  $\mathbf{X}$  ( $I \times J$ ), sendo  $I$  o total de linhas (amostras) e  $J$  o total de colunas (variáveis). Após organizados os dados experimentais devem ser pré-processados, para que se reduza o número de

variáveis indesejadas, que eventualmente não foram removidas durante a aquisição de dados, e que podem influenciar nos resultados. A escolha adequada dos pré-processamentos influencia no sucesso de qualquer análise multivariada de dados.

Citando como exemplo a RMN, alguns dos pré-processamentos podem ser feitos no próprio software do equipamento utilizado, como correção da linha de base, faseamento, normalização e *binning*. Esses pré-processamentos são considerados transformações e são aplicadas às amostras, mas existem também os pré-processamentos em que são aplicados às variáveis.

Dentre alguns exemplos de pré-processamento nas variáveis têm-se o *mean center* que no português se traduz para centrado na média, em que a média dos valores de cada coluna/variável, que no caso do RMN se refere a cada deslocamento químico, é subtraído dos valores da respectiva coluna de todos os espectros, o que preserva a estrutura dos dados. Já o autoescalamento, além da subtração da média, os valores também são divididos pelo desvio-padrão da respectiva coluna, que faz com que todos os sinais tenham uma mesma importância em todo o espectro, ou seja os compostos minoritários causam a mesma influência dos compostos majoritários. O *mean center* é o pré-processamento mais comum no uso de dados espectrais (Ferreira, 2015; Monakhova; Kuballa; Lachenmeier, 2013).

Uma ferramenta que se destaca para extrair conhecimento químico dos dados são os métodos de reconhecimento de padrões, em que tem como objetivo encontrar tendências e os agrupamentos em um conjunto de amostras para que seja possível interpretar dados e tomar decisões. Os métodos quimiométricos usados para agrupar e classificar amostras estão divididos em dois grupos, os métodos supervisionados e os não supervisionados de reconhecimento de padrões. Os métodos supervisionados utilizam de informações de classes pré-estabelecidas das amostras, já os métodos não supervisionados não fazem uso dessa informação (Ebrahimi, et al., 2017; Ferreira, 2015).

PCA e de HCA são métodos não-supervisionados e conhecidos como métodos exploratórios de dados, enquanto PLS-DA é um método supervisionado de discriminação (Ferreira, 2015).

### **3.3.1. HCA (do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*)**

A análise por HCA é usada para representar a similaridade presente em um conjunto de dados com muitas variáveis através de uma forma compacta e que permite a verificação da presença de clusters/agrupamentos. O objetivo é reunir em grupos as amostras que mais se assemelham entre si, com a finalidade de maximizar a homogeneidade dentro de cada grupo. Os resultados são representados na forma de árvore hierárquica conhecida como dendrograma, em que os comprimentos dos ramos da árvore representam o grau de similaridade entre as amostras (Ferreira, 2015).

### **3.3.2. PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*)**

PCA é usada para projetar os dados multivariados em um espaço dimensional menor do que o original, destacando as informações/relações mais relevantes presentes nos dados, tornando capaz, por exemplo, a detecção de amostras que tenham comportamento atípico do esperado e as relações entre as amostras com comportamento similar. Diz-se que há uma compressão de dados com o uso da PCA, mas uma compressão controlada que é compensada por uma melhor compreensão dos dados (Winning, et al., 2008).

A compressão de dados é a redução no número de variáveis. As variáveis originais são agrupadas de acordo com suas correlações. As novas variáveis então obtidas são chamadas de componentes principais (PC's), também conhecidas como fatores. As PC's são não correlacionadas (ortogonais entre si), ou seja, a informação que uma possui é distinta da seguinte e assim sucessivamente. Uma propriedade do método é que a primeira das componentes principais tem a direção de máxima variância, o faz com que essa descreva a maior fonte de variação dos dados. A segunda componente principal explica a direção da segunda maior variância dos dados e assim por diante (Ferreira, 2015). A escolha do número de componentes principais para PCA é menos crítica do que em outros métodos de análise

multivariada, pois a primeira e mais importante PC não mudará em função do número de componentes selecionados (Winning, et al., 2008). Contudo, deve-se usar a informação disponível do sistema em estudo e parâmetros como o percentual de variância explicada de cada PC para definir quantas componentes devem ser utilizadas para descrever o comportamento dos dados.

As PC's são compostas por escores e pesos. Os pesos contêm as informações das variáveis, no caso das análises com RMN, seriam os deslocamentos químicos. Já os escores possuem as informações sobre as amostras. Sendo assim, os pesos indicam as partes do espectro que representam a principal variação entre as amostras para cada componente principal através do gráfico de pesos, ou seja, o gráfico de pesos permite especificar os deslocamentos químicos que são responsáveis pelos agrupamentos observados nos gráficos de escores (Winning, et al., 2008; Ohmenhaeuser, et al., 2013).

As análises de PCA são geralmente feitas através de um gráfico de dispersão que é plotado através dos escores das PC's uma contra a outra, por exemplo PC1 x PC2. Dessa forma, as amostras agrupadas em um gráfico de escores apresentam semelhanças espectrais em relação a cada componente principal selecionada (Winning, et al., 2008).

### **3.3.3. PLS-DA (do inglês, *Partial Least Squares – Discriminant Analysis*)**

Ao usar os métodos supervisionados de classificação, o objetivo é a construção de modelos em que a propriedade de interesse é discreta. É selecionada uma série de amostras representativas de cada classe e para cada classe as medidas são coletadas e o padrão de cada classe é estabelecido (Brereton, 2015).

O modelo de mínimos quadrados parciais, PLS do inglês *Partial Least Squares*, a matriz de dados e o vetor ou matriz com os valores da propriedade dependente são modelados por componentes principais. Os blocos são relacionados entre si através de variáveis latentes, as quais representam as

direções que melhor discriminam as classes. PLS-DA é um modelo de análise discriminante de regressão que descreve a máxima separação entre as classes que são pré-definidas. O método é frequentemente usado para distinguir as classes, encontrar diferenças que expliquem a distinção das classes, maximizando a diferença entre as classes e minimizando a diferença dentro delas. (Wold; Martens; Wold, 1982).

O método PLS-DA utiliza variáveis latentes (VL) para descrever os dados. Essas VL são construídas combinando a informação presente nos espectros e na identificação das classes. Logo, ao contrário das PC que modelam a variância dos espectros, as VL modelam covariância. A importância das variáveis pode ser avaliada pelos pesos, mais conhecido pelo inglês *loadings* e pela projeção da importância da variável (VIP, do inglês *Variable Importance in Projection*) que é visualizado pelo gráfico de VIP scores, em que mostra os sinais que são mais importantes para a discriminação das amostras. O modelo PLS-DA pode apresentar sobreajuste se um número excessivo de VL for utilizado na modelagem. Dessa forma, o número de variáveis latentes deve ser cuidadosamente selecionado e o modelo validado com um conjunto de amostras independentes (Debik, et al., 2022). O PLS-DA tem sido usado para modelar duas classes de dados a fim de aumentar a separação entre elas, simplificar a interpretação e possivelmente encontrar biomarcadores potenciais (Trygg; Holmes; Lundstedt, 2007).

### **3.4. Quimiometria e RMN**

A associação da técnica de RMN com a Quimiometria tem contribuído para a obtenção de resultados importantes nas análises de óleos, por isso, vale apresentar os resultados de alguns trabalhos que motivam utilizar desse método para analisar os dados de RMN.

No trabalho de Freiras *et al.* (2018) ele realizou uma análise quimiométrica dos dados obtidos por RMN e por CG para caracterizar OE de espécies diferentes de *Ocimum*. O objetivo foi encontrar quimiotipos das espécies, ou seja, qual substância predominante de cada espécie. Para algumas espécies do OE de *Ocimum* o composto predominante foi o eugenol, para outras o estragol e ainda cinamato de metila para uma das espécies. Para

efeitos de confirmação dos resultados, os métodos de referência usados foram CG-EM e CG-DIC. E na comparação dos métodos, a análise quimiométrica com dados de RMN se mostraram mais robustas (melhor ajuste), além disso a técnica de RMNq permite detecção e quantificação de compostos em uma mistura sem a necessidade de padrões de referência certificados de cada analito. Embora a sensibilidade de CG-EM e CG-DIC seja maior e possibilitou a detecção de cinco compostos não identificados por RMN. No trabalho citado, as análises quimiométricas realizadas foram de HCA, PCA e PLS-DA.

Mehl *et al.* (2014) apresenta uma abordagem para diferenciar OE de limão e uma das formas utilizadas é com a técnica de RMN de  $^1\text{H}$ , usando frações não voláteis de OE, associada a métodos quimiométricos com análises multivariadas supervisionadas e não supervisionadas. O objetivo de Mehl e colaboradores (2014) foi de desenvolver e avaliar métodos para classificar OE de limão conforme origem geográfica e pelos processos de extração. A PCA não permitiu a diferenciação das amostras conforme a origem, já com OPLS-DA foi possível observar essa separação das amostras por origem, sendo as amostras da Itália e da Argentina discriminadas na primeira VL, já as amostras da Espanha foram diferenciadas com duas VL. Além dos resultados obtidos com RMN, foram realizadas análises com outras técnicas, dentre elas CG-DIC, e ao comparar os resultados, ao utilizar a técnica de RMN, essa se mostrou altamente reprodutível e rápida quando comparada com CG-DIC.

Outro trabalho que utilizou RMN de  $^1\text{H}$  e quimiometria para classificação de espécies foi o de Nurani e colaboradores (2021), que não foi com OE, mas com produto natural de grande utilização, a cúrcuma. O estudo visou a autenticação de espécies de cúrcuma com fins de evitar adulterações. Novamente, as vantagens observadas e pontuadas ao utilizar a técnica de RMN na análise de plantas e produtos naturais são o tempo de análise rápido, simplicidade no preparo de amostra, a alta reprodutibilidade e robustez. Os autores ainda citam a análise simultânea de metabólitos primários e secundários. *C. longa*, *C. xanthorrhiza* e *C. manga*, foram as espécies diferenciadas nesse trabalho, e seus espectros de RMN já evidenciaram visualmente algumas diferenças, inclusive entre amostras obtidas em

diferentes origens. A PCA não foi capaz de evidenciar as diferenças entre essas espécies, já com PLS-DA, *C. longa* e *C. xanthorrhiza* estavam mais agrupadas, o que se comprova pela semelhança na composição dos princípios ativos dessas espécies. Ao utilizar o método OPLS-DA houve uma classificação melhor entre as três espécies.

Com esses trabalhos apresentados acima é possível observar o potencial da associação da técnica de RMN com as análises por métodos quimiométricos, como sugerido também nesse trabalho.

### **3.5. Trabalho de Óleo de pau-rosa com Infravermelho**

O trabalho da Pastore e colaboradores (2022) do qual originou esse, sugere um método “verde” e direto para autenticação e classificação de OE de pau-rosa por infravermelho próximo portátil. Todas as 130 amostras adquiridas foram analisadas em um espectrômetro portátil MicroPHAZIR™ RX Analyzer na faixa de 1595 – 2396 nm e resolução de 8 nm. As amostras foram analisadas em triplicadas. A análise de dados foi pelo método DD-SIMCA com abordagem de uma classe.

As amostras autênticas tinham origem certificada e pureza verificada pelo método de referência CG-EM. As amostras com adulterações também eram confirmadas com as análises em CG-EM. As amostras obtidas da Magaldi Agro Comercial e Industrial LTDA foram consideradas como referências para o desenvolvimento do método, por serem uma indústria autorizada para produção e comercialização do OE de pau-rosa.

A partir das amostras adquiridas pela empresa Magaldi, a autenticação das demais amostras foi feita considerando um perfil químico médio de pelo menos 70% de semelhança. Porém o parâmetro mais importante foi o teor de linalol e seus produtos de oxidação, que representaram juntos 94% do sinal do cromatograma. Além disso, a presença de adulterante ou contaminação já classificava a amostra como não autêntica.

Com o método proposto, encontraram uma alta taxa de eficiência para as amostras de validação, em que ocorreu apenas um falso-negativo, mas que

com as análises de CG-EM foi possível observar que pode ter ocorrido por ser uma marca com um teor de linalol inferior às demais amostras e com uma maior quantidade de óxidos obtidos pelo processo natural de oxidação dos OE.

Com isso o trabalho de Pastore *et al.* (2022) apresentou um método com comprovada eficiência para autenticação e classificação das amostras de OE de pau-rosa.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Amostras

Todas as amostras estudadas nesse trabalho foram obtidas em colaboração com o Laboratório de Produtos Florestais (LPF), pertencente ao Serviço Florestal Brasileiro, localizado em Brasília-DF, por meio de um projeto de colaboração coordenado pela Dr.<sup>a</sup> Tereza Cristina Monteiro Pastore (Projeto CITES S1-32QTL-000018).

Foram avaliadas 130 amostras de OE extraídas de árvores da espécie *Aniba rosiodora* ou adquiridos em feiras ou comércios em geral, conforme indicado na Tabela 1. A coluna de comentários presente na Tabela 1 se refere a algumas informações que podem ser relevantes no decorrer do trabalho.

Pelo OE de pau-rosa ser um produto natural e composto por uma mistura complexa de componentes voláteis, principalmente monoterpenos e sesquiterpenos, a composição pode variar de acordo com fatores climáticos, geográficos, de extração, dentre outros. Algumas amostras foram coletadas em diferentes localidades e adquiridas em feiras de rua, mercados locais, diretamente de associações comunitárias e usinas de produção. Outras foram compradas pela internet de diferentes fornecedores. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro ou plástico, refrigerados a 4°C e protegidos da luz ambiente até serem analisadas.

Sendo assim, de acordo com Pastore *et al.* (2022), para que fosse possível determinar amostras autênticas e não autênticas, foram consideradas autênticas as amostras obtidas pela Magaldi Agro Comercial e Industrial LTDA, por ser uma indústria autorizada pelo IBAMA a produzir e comercializar o OE de pau-rosa, além de serem amostras que durante as análises de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) não mostraram presença de adulterantes. Dessa forma, através dessas amostras um perfil químico foi estabelecido para os OE de pau-rosa, e para classificar as demais amostras, a compatibilidade com esse perfil deveria ser de pelo menos 70%, mas o parâmetro mais importante levado em consideração é a presença de linalol e suas oxidações. Essas são as 21 amostras classificadas como

Marca A1 na Tabela 1. As demais marcas autênticas são indicadas como AX e as não-autênticas como UX, sendo X a numeração (Pastore *et al.*, 2022).

A marca U24 não foi nomeada anteriormente no trabalho da Pastore e colaboradores (2022), visto que ela havia sido classificada como autêntica (anteriormente marca A8). Entretanto, após análise no CG-EM e comparação no RMN, foi observado que a composição da amostra é basicamente linalol, o que não é característico de um OE, que possui outros componentes minoritários e fazendo com que essa amostra se assemelhe a um linalol sintético. Dessa forma, sua classificação foi alterada para não comprometer as análises posteriores.

**Tabela 1.** Dados das amostras de óleo essencial de pau-rosa usados para análise.

Marca	Amostras	Origem	Comentários
A1	LPF-01; LPF-02; LPF-03; LPF-04; LPF-05; LPF-06; LPF-07; LPF-08; LPF-09; LPF-10.1; LPF-10.2; LPF-11.1; LPF-11.2; LPF-11.3; LPF-11.4; LPF-11.5; LPF-11.6; LPF-11.7; LPF-11.8; LPF-11.9; LPF-11.10	Maués (AM)	Óleo extraído de ramos finos e folhas por destilação a vapor
A2	LPF-12.1; LPF-12.2; LPF-12.3; LPF-12.4; LPF-12.5; LPF-12.6; LPF-12.7; LPF-12.8; LPF-13.1; LPF-13.2; LPF-13.3; LPF-13.4; LPF-13.5; LPF-13.6; LPF-13.7; LPF-13.8	Maués (AM)	Óleo extraído de tronco, ramos finos e folhas por destilação a vapor
A3	LPF-15	Maués (AM)	Obtido por destilação a vapor
A4	LPF-16	Parintins (AM)	Extração em extrator de
A5	LPF-50	Parintins (AM)	
A6	LPF-54; LPF-55	Barreirinhas (AM)	
A7	LPF-57	Itacoatiara (AM)	
A9	LPF-62.2	Belém (PA)	
A10	LPF-63	Macapá (AP)	
A11	LPF-65	Desconhecida	
U1	LPF-56	Barreirinhas (AM)	
U2	LPF-49	Itacoatiara (AM)	
U3	LPF-21	Novo Aripuanã (AM)	Extraído com 10% de etanol
U4	LPF-58.2	Novo Aripuanã (AM)	
U5	LPF-62.1	Belém (PA)	
U6	LPF-25; LPF-26; LPF-27; LPF-28; LPF-44 LPF-45	Belém (PA)	Perfumaria de essências
U7	LPF-29; LPF-30; LPF-31; LPF-32	Belém (PA)	Loja de essências
U8	LPF-33-1; LPF-33-2; LPF-34-1; LPF-34-2; LPF-43	Belém (PA)	Adquiridos em Feira
U9	LPF-23.1; LPF-23.2; LPF-24.1; LPF-24.2	Macapá (AP)	Comércio de aromas, extratos e fragrâncias
U10	LPF-17; LPF-18; LPF-19; LPF-20; LPF-22	Manaus (AM)	Adquiridos em Feira
U11	LPF-46; LPF-47	Manaus (AM)	
U12	LPF-14	Silves (AM)	Material apreendido
U13	LPF-51; LPF-52	Silves (AM)	
U14	LPF-59	Belterra (PA)	
U15	LPF-53	Itapiranga (AM)	
U16	LPF-35.1; LPF-35.2; LPF-36.1; LPF-36.2; LPF-36.3; LPF-36.4; LPF-36.5; LPF-37.1; LPF-37.2; LPF-37.3; LPF-37.4; LPF-37.5	Santarém (PA)	Comércio de produtos naturais
U17	LPF-60; LPF-61	Santarém (PA)	
U18	LPF-48; LPF-64.1; LPF-64.2	São Sebastião Uatumã (AM)	
U19	LPF-38.1; LPF-38.2; LPF-38.3	Gravatal (SC)	Loja de essências e aromas
U20	LPF-39.1; LPF-39.2; LPF-39.3	Montes Claros (MG)	Loja de essências e aromas
U21	LPF-40.1; LPF-40.2; LPF-40.3; LPF-40.4; LPF-40.5; LPF-40.6	Rio de Janeiro (RJ)	Loja de essências e OE
U22	LPF-41.1; LPF-41.2; LPF-41.3; LPF-41.4; LPF-41.5; LPF-41.6; LPF-41.7; LPF-41.8; LPF-41.9; LPF-41.10	Alto Paraíso (GO)	Loja virtual de óleos e produtos da terra
U23	LPF-42.1; LPF-42.2; LPF-42.3; LPF-42.4; LPF-42.5; LPF-42.6; LPF-42.7; LPF-42.8	São Paulo (SP)	Loja virtual de incensos, aromas, velas e mais
U24	LPF-58.1	Novo Aripuanã (AM)	
AP	PA1; PA2; PA3; PA4; PA5	Peru	

Além das amostras citadas acima, durante o presente trabalho foram obtidas 5 amostras oriundas do Peru. Essas amostras foram incluídas nas análises de autenticidade e classificação e foram feitas comparações entre elas e as amostras autênticas do Brasil para possível identificação. As informações também se encontram na Tabela 1 e como ela será nomeada no decorrer do trabalho. Essas amostras foram consideradas autênticas, visto que são originadas de um plantio da espécie *Aniba rosiodora* e o óleo extraído de todas as partes da planta ainda jovem.

## **4.2. Preparo das amostras**

Todas as 135 amostras de OE foram pesadas em *eppendorffs*, aproximadamente 90 mg, e solubilizadas em 500  $\mu$ L (aproximadamente 750 mg) de clorofórmio deuterado com Tetrametilsilano ( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ). A massa exata do solvente adicionado foi registrada para posterior utilização na quantificação pelo método PULCON, assim como a massa das amostras. A solução foi transferida para tubos Norell Standard Series™ 600 MHz de 5 mm.

Para a quantificação por referência externa pelo método PULCON, foi preparada uma solução do padrão de referência dimetil sulfona ( $\text{DMSO}_2$ ) solubilizada em  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ . O material de referência utilizado nesse trabalho é certificado pelo INMETRO com pureza de  $100,0 \pm 0,2\%$ .

## **4.3. Ressonância Magnética Nuclear**

### **4.3.1. Aquisição dos espectros de RMN**

Foram adquiridos espectros monodimensionais de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ), carbono ( $^{13}\text{C}$ ) e hidrogênio quantitativo (RMNq de  $^1\text{H}$ ) para todas as amostras. Para a atribuição dos sinais foi necessária a aquisição de espectros bidimensionais  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de uma amostra autêntica da marca A1.

Todos os espectros foram obtidos em espectrômetro de RMN Bruker Avance III HD 600 MHz equipado com sonda *Broadband Observe* (BBFO) de 5 mm, localizado no Laboratório de RMN da Central Analítica do Instituto de Química (CAIQ) da Universidade de Brasília (UnB).

Após a inserção do tubo contendo a amostra no equipamento, foram realizados o *lock* do campo para o sinal de deutério, a fim de controlar o campo magnético na amostra para que não haja variação nas frequências de ressonância, e o *shimming* para o ajuste da homogeneidade do campo. Foi feita a sintonia (*tuning*) para as frequências do  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ . O pulso de  $90^\circ$  (P90) para o  $^1\text{H}$  foi calculado automaticamente pelo comando *pulsecal* para cada amostra. Os espectros foram adquiridos com parâmetros que pudessem garantir a obtenção de dados para as análises quimiométricas e, posteriormente, de dados quantitativos, como descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Parâmetro	Símbolo (Bruker)	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	RMNq de $^1\text{H}$
Nº de pontos (FID)	TD	64 k	128 k	64 k
<i>Delay</i> de relaxação	D1	2 s	0,5 s	10 s
Número de Varreduras	NS	64	512	16
<i>Dummy Scans</i>	DS	8	128	0
Ganho do detector	RG	2	203	2
<i>Delay</i> pré-aquisição	DE	10 $\mu\text{s}$	6,5 $\mu\text{s}$	10 $\mu\text{s}$
Potência do pulso a $90^\circ$	PLW1	28 W	75 W	28 W
Temperatura	TE	298 K	300 K	298 K
Tempo total	expt	5 min 7 s	21 min	3 min 16 s

Os parâmetros de aquisição dos espectros de RMN bidimensionais estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN bidimensionais.

Parâmetro	Símbolo (Bruker)	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC	$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC
Nº de pontos (FID)	TD	4096 x 256	8192 x 1024	2048 x 512
<i>Delay</i> de relaxação	D1	1 s	1 s	1 s
Número de Varreduras	NS	8	8	16
<i>Dummy Scans</i>	DS	16	64	64
Ganho do detector	RG	2	203	203
<i>Delay</i> pré-aquisição	DE	10 $\mu\text{s}$	10 $\mu\text{s}$	10 $\mu\text{s}$
Potência do pulso a $90^\circ$	PLW1	28 W	28 W	28 W
Temperatura	TE	298 K	298 K	298 K

### **4.3.2. Processamento dos espectros de RMN**

Os espectros foram processados com o programa TopSpin 4.0.7. Os espectros foram referenciados em relação ao sinal de TMS (0 ppm). A linha de base e a fase dos espectros foram ajustadas preferencialmente de forma automática, porém ajustes manuais foram realizados quando necessário. Foi aplicada uma função polinomial do tipo *line broadening* (LB) aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (LB = 0,3 Hz) com a finalidade aumentar a relação sinal/ruído do espectro. As integrações nos espectros de RMNq foram feitas manualmente.

Após o processamento inicial dos espectros no programa TopSpin, os espectros de RMN foram processados no programa MestreNova 6.0.2-5475, onde foi feito um processamento de *binning* de 0,001 ppm nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e 0,003 nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , com objetivo de reduzir número de pontos para viabilizar a utilização e processamento dos dados em softwares especializados. Os espectros também foram normalizados com referência no sinal de maior intensidade. Os dados foram então salvos no formato ASCII e exportados para uma planilha no formato .xlsx. A planilha foi exportada para o programa MATLAB R2017a, onde foi calculada a PCA, HCA e PLS-DA através do pacote computacional PLS-Toolbox 8.81 com emprego do pré-processamento *mean center*.

## **4.4. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas**

### **4.4.1. Aquisição dos Cromatogramas**

Os cromatogramas para análises qualitativas foram obtidos no trabalho da Pastore et al. (2022) e utilizados como referência. Por outro lado, as análises complementares de CG-EM realizadas com intuito quantitativo e para efeitos de validação da quantificação feita por RMN foram realizadas no âmbito dessa dissertação.

Os cromatogramas obtidos para validar a quantificação feita por RMN nas condições expostas acima foram adquiridos no cromatógrafo gasoso da marca Agilent Technologies modelo 7890A GC System, acoplado a um detector de espectrometria de massas da Agilent Technologies modelo 5975 inert XL MSD, equipamento localizado no Laboratório de Produtos Florestais

(LPF) do Serviço Florestal Brasileiro (SFB). Os dados foram processados e analisados pelo software ChemStation.

O método utilizado foi o mesmo do trabalho da Pastore e colaboradores (2022) que foi desenvolvido e aplicado às mesmas amostras analisadas nesse trabalho. A injeção foi realizada no modo Split com divisão 20:1 e fluxo de 14 mL.min<sup>-1</sup> à temperatura de 270°C. A temperatura inicial de trabalho foi de 60°C e um aquecimento de 3°C.min<sup>-1</sup> até a temperatura de 210°C, depois o aquecimento continuou a uma taxa de 9°C.min<sup>-1</sup> até 250°C em que permaneceu pelos 2 minutos finais da corrida. O tempo de solvente delay foi de 5 min, totalizando 56 minutos de corrida.

#### **4.4.2. Preparo de amostras de CG-EM**

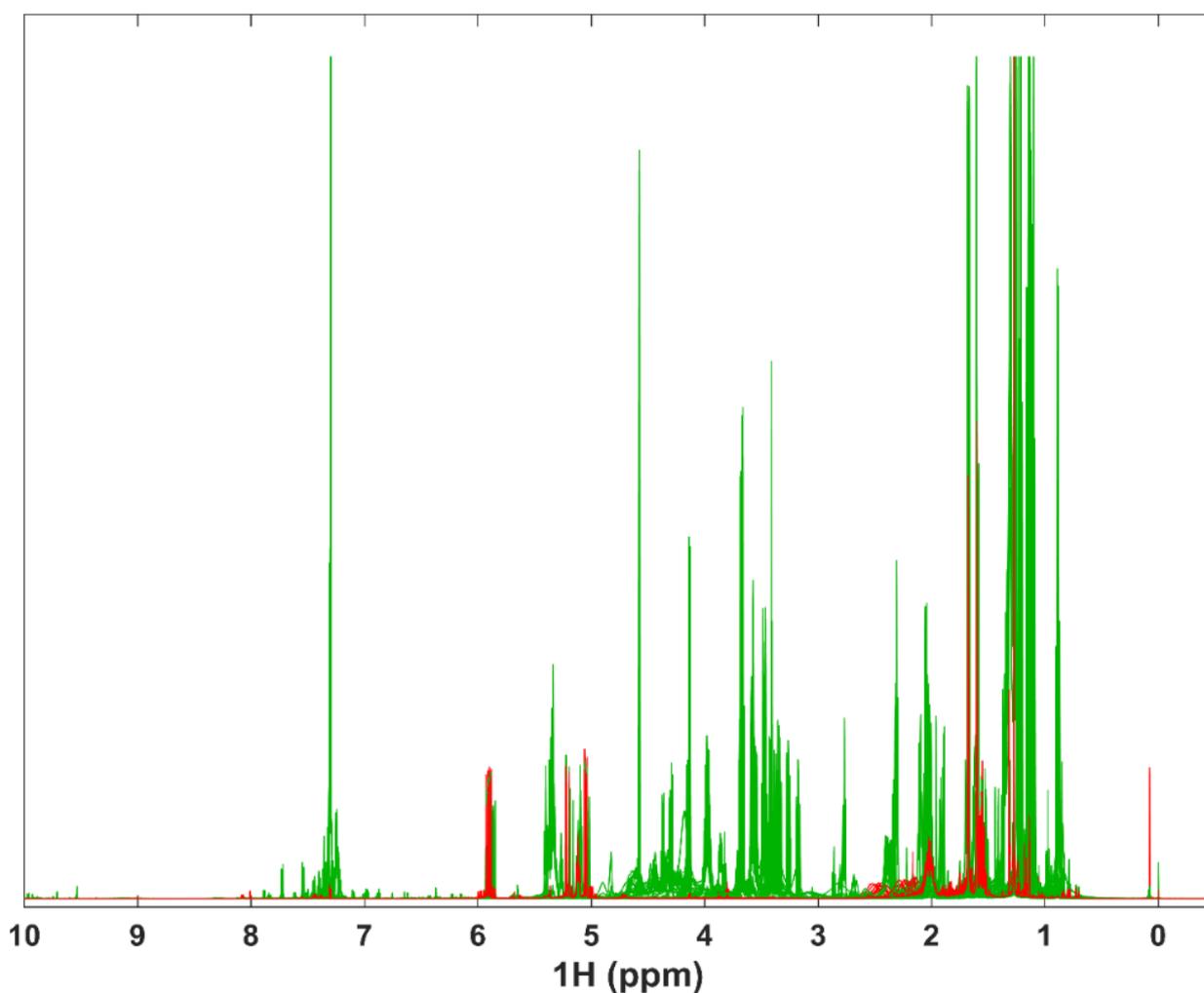
A curva analítica foi feita com padrão de linalol da Sigma-Aldrich certificado em 99,4% (ANEXO B). A solução estoque foi preparada usando 200 µL em 20 mL de n-Hexano PA. A curva de calibração foi construída com 5 pontos, objetivando ter pontos de 50 a 90% de linalol, para obter 50%, 60%, 70%, 80% e 90% de linalol foram solubilizados respectivamente 500, 600, 700, 800 e 900 µL da solução estoque de linalol em 10 mL de n-Hexano. Como o padrão do linalol contém 99,4% de pureza, os pontos realmente obtidos foram de 49,5%; 59,4%; 69,3%; 79,2% e 89,1%. Todos os pontos foram preparados e adquiridos em triplicata.

As 3 amostras a serem analisadas em triplicata foram: LPF 11-3, da marca A1, a LPF 12-6 da marca A2 e a LPF 58-1 da marca U24. Foram solubilizados 10 µL no solvente, n-Hexano, em um balão volumétrico de 10 mL, depois uma alíquota foi transferida para os *vials* de 1,5 mL e 2 µL foram injetados no CG-EM para análise.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análise Exploratória

Foram realizadas as análises de RMN de  $^1\text{H}$  para as 130 amostras de OE de pau-rosa obtidas no Brasil (Tabela 1) que serão objeto de estudo nesse trabalho. Para fins de comparação, na Figura 10 estão sobrepostos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para todas as amostras de OE de pau-rosa autênticas e não autênticas, onde as amostras autênticas estão representadas pela cor vermelha e as amostras não autênticas na cor verde. Esse padrão de cores será utilizado no decorrer do trabalho.



**Figura 10.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das 130 amostras de OE de pau-rosa definidos como não autênticos (verde) e autênticos (vermelho).

Como é possível observar nos espectros (Figura 10), as amostras de OE de pau-rosa autênticas (vermelho) não possuem sinais de alta intensidade

acima de 6,00 ppm. Já algumas amostras não autênticas, cujos espectros estão apresentados em verde (Figura 10), possuem sinais nessa região que são característicos de hidrogênios olefínicos, aromáticos, aldeídos e ácidos carboxílicos. O mesmo é possível notar na região entre 3 e 4,5 ppm, que são sinais característicos de álcoois, éteres e ésteres. Esses sinais estão presentes nos espectros de RMN de algumas amostras de OE de pau-rosa não autênticas que não são observados para as amostras de OE de pau-rosa autênticas. Além disso, também é interessante destacar que esses sinais não são observados em todos os OE não autênticos, indicando diferença na composição também dentre o conjunto de amostras dos óleos não autênticos.

Embora a análise visual dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 10) permita a observação de diferenças espectrais óbvias, por se tratar de amostras de matrizes complexas, a avaliação da autenticidade das amostras de OE, bem como descrição de todos os seus componentes, foi difícil. Isso destaca a importância das análises quimiométricas para os dados obtidos nesse trabalho.

Assim, para verificar o possível agrupamento das amostras entre as classes de óleos autênticos e não autênticos, os espectros completos de RMN de  $^1\text{H}$  foram exportados para o programa MATLAB e análise de HCA foi realizada. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 11.

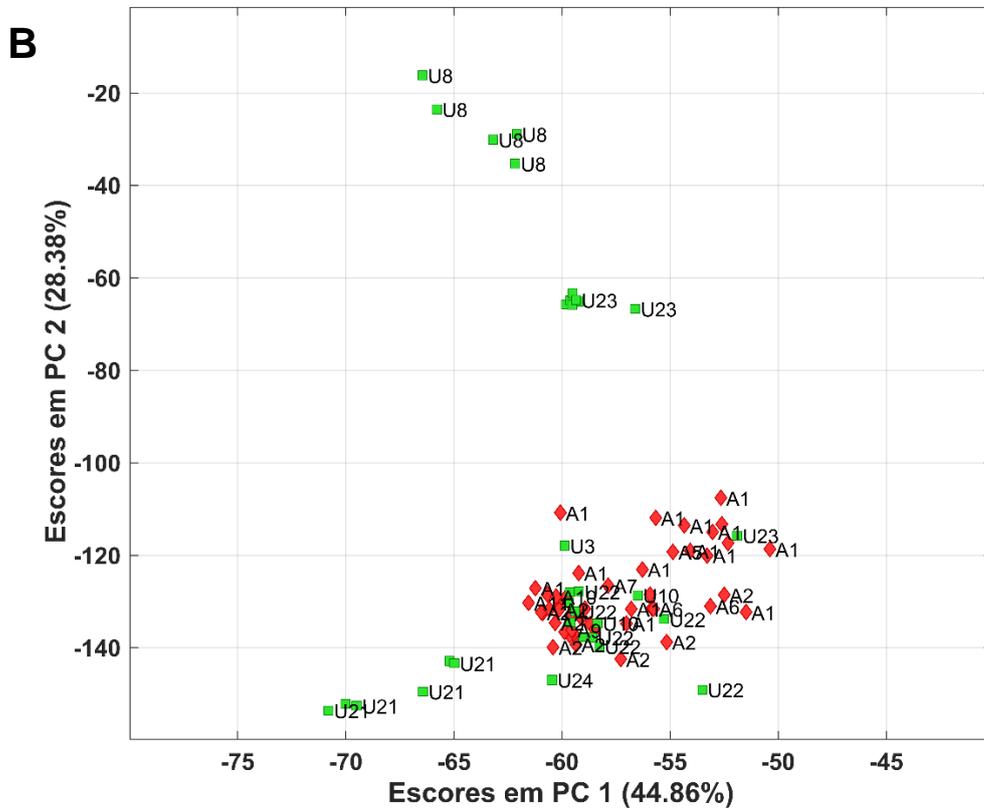
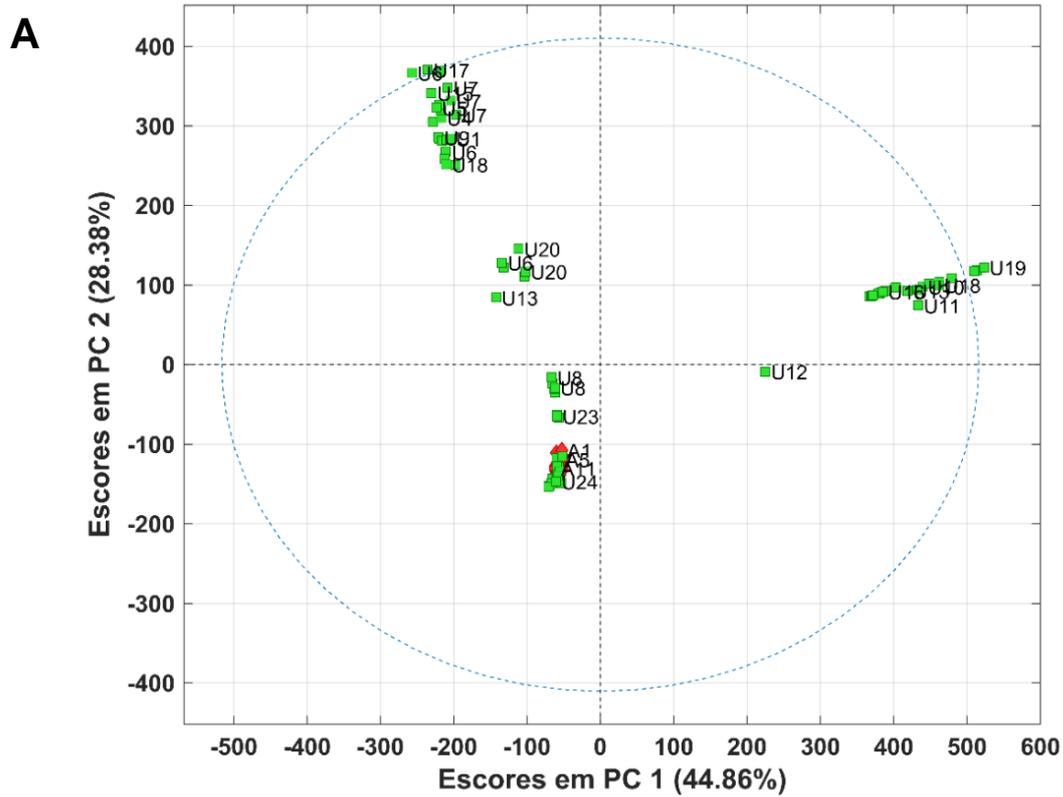


No dendrograma obtido pelo método HCA é possível observar que as amostras autênticas se agrupam de formas diferentes, mostrando que existe uma diferença de composição química entre elas, mesmo sendo todas autênticas. As diferenças na composição do OE podem ocorrer devido a diversos fatores como clima, época de extração, solo, genética, origem, método de extração, subgrupos dentro da mesma espécie botânica, dentre outros. Segundo Moghaddam e Mehdizadeh (2017), existem fatores internos e externos a planta que podem interferir na composição dos OE.

Outro aspecto importante a se destacar no dendrograma é que ele se divide em dois clusteres principais e no primeiro cluster estão agrupadas a maioria das amostras não autênticas e que possuem uma distância muito grande do outro cluster. São os primeiros 69 óleos que aparecem no dendrograma. Além disso, vale ressaltar as marcas que se agrupam com as amostras autênticas, são elas: uma amostra da marca U3, duas amostras da marca U10, a marca U22 (10 amostras), uma amostra da marca U23 e uma amostra da marca U24.

A HCA é uma análise exploratória, ou seja, não supervisionada, que agrupa as amostras com base na sua similaridade utilizando uma medida de distância pré-determinada. Nesse trabalho utilizou-se a distância Euclidiana. No seu processamento, ela não busca minimizar as diferenças internas das classes e maximizar as diferenças entre as classes. Contudo, essa técnica não permite saber quais variáveis estão sendo usadas para diferenciar os óleos, portanto, não é possível apenas com HCA confirmar o que difere as amostras autênticas das demais.

A PCA também é uma análise exploratória que pode complementar a análise por HCA. A PCA pode ser usada para observar o comportamento dos óleos através de componentes principais que buscam explicar a variância das amostras e permite identificar quais sinais são responsáveis pelos clusteres observados. Na Figura 12, o gráfico de PCA mostra as duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) obtidas na análise dos dados da Figura 10.



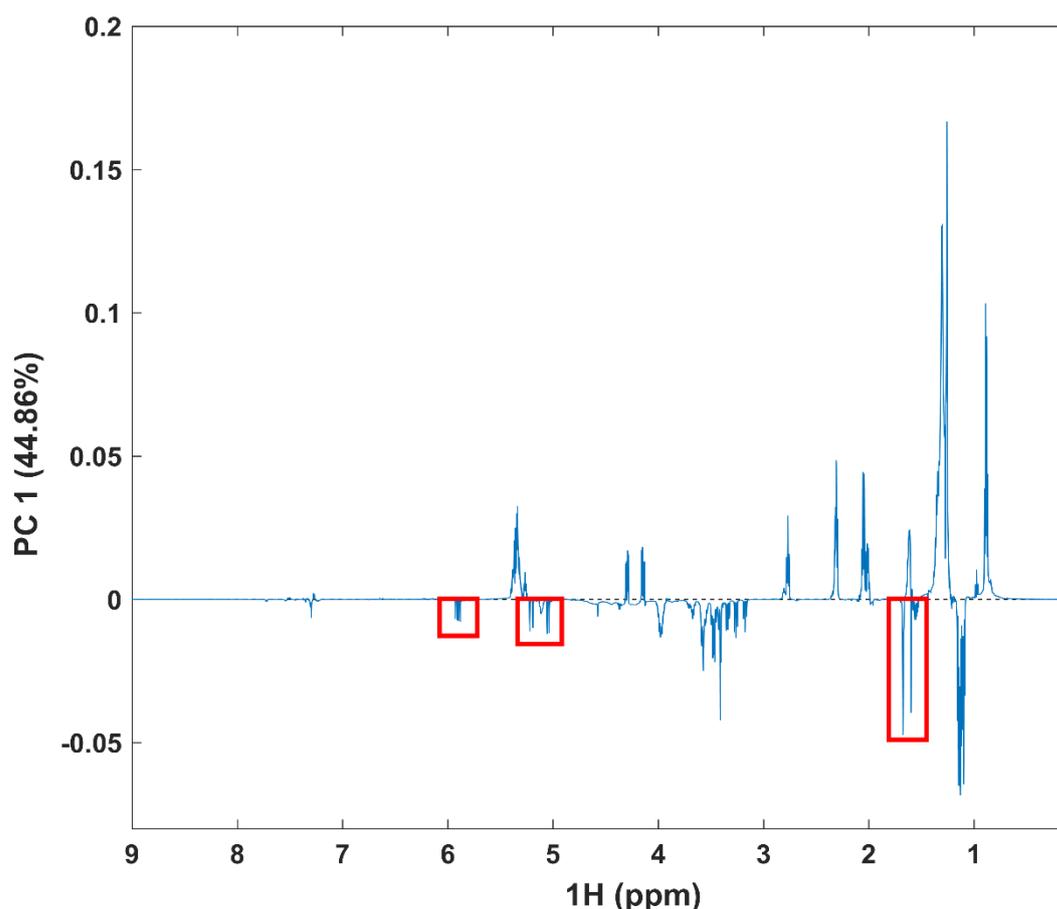
**Figura 12.** EscORES de PC1 no eixo X (44,86% de variância explicada) e PC2 no eixo Y (28,38% de variância explicada). (A, vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (U, verde) amostras não autênticas **(A)**. Para melhor visualização dos agrupamentos em PC1 e PC2 das amostras autênticas **(B)**.

Como mostra a Figura 12, são necessárias duas PCs para separar as amostras autênticas da maioria das amostras não autênticas. Todas as amostras autênticas se agrupam nos valores negativos de PC1 e PC2, enquanto temos dois grandes grupos de amostras não autênticas que se separam ao longo de PC1 e PC2. A componente PC1 explica 44,86% e a componente PC2 explica 28,38% da variância dos dados. A distância entre as amostras que estão em valores de escores positivos em PC1 e, portanto, mais afastadas dos óleos autênticos, mostra que PC1 modela principalmente alguma característica ou tipo de adulteração presente nessas amostras, e que as diferenciam das demais. As amostras que possuem escores positivos em PC1 são as da marca U2, U11, U12, U13, U16, U19 e três óleos da marca U10. A PC2 também separa os óleos autênticos de outro grupo de óleos não autênticos, sendo eles da marca U1, U4, U5, U6, U7, U9, U13, U14, U15, U17, U18 e U20.

Outra informação importante que pode ser extraída do gráfico de escores é a avaliação dos óleos não autênticos que coincidem com os óleos autênticos tanto em PC1 quanto em PC2, ambos em escores negativos. As marcas U3, U21, U22, U24, um óleo da marca U23 e dois óleos da marca U10 estão agrupados às amostras autênticas (Figura 12A). Além disso, as marcas U8 e as demais amostras da marca U23 também estão em escores negativos de PC1 e PC2, próximos às amostras autênticas. Apesar dessas amostras não estarem agrupadas, esse resultado indica que a informação das variáveis explicadas em PC1 e PC2 não as diferenciam, pelo contrário, essas amostras possuem certa similaridade. Provavelmente, a informação que as distingue das amostras de OE de pau-rosa autênticas e que também distingue a separação entre o grupo de amostras autênticas (sugerido no dendrograma) esteja presente na variância das outras componentes principais, uma vez que PC1 + PC2 só explica 73,24% da variância dos dados.

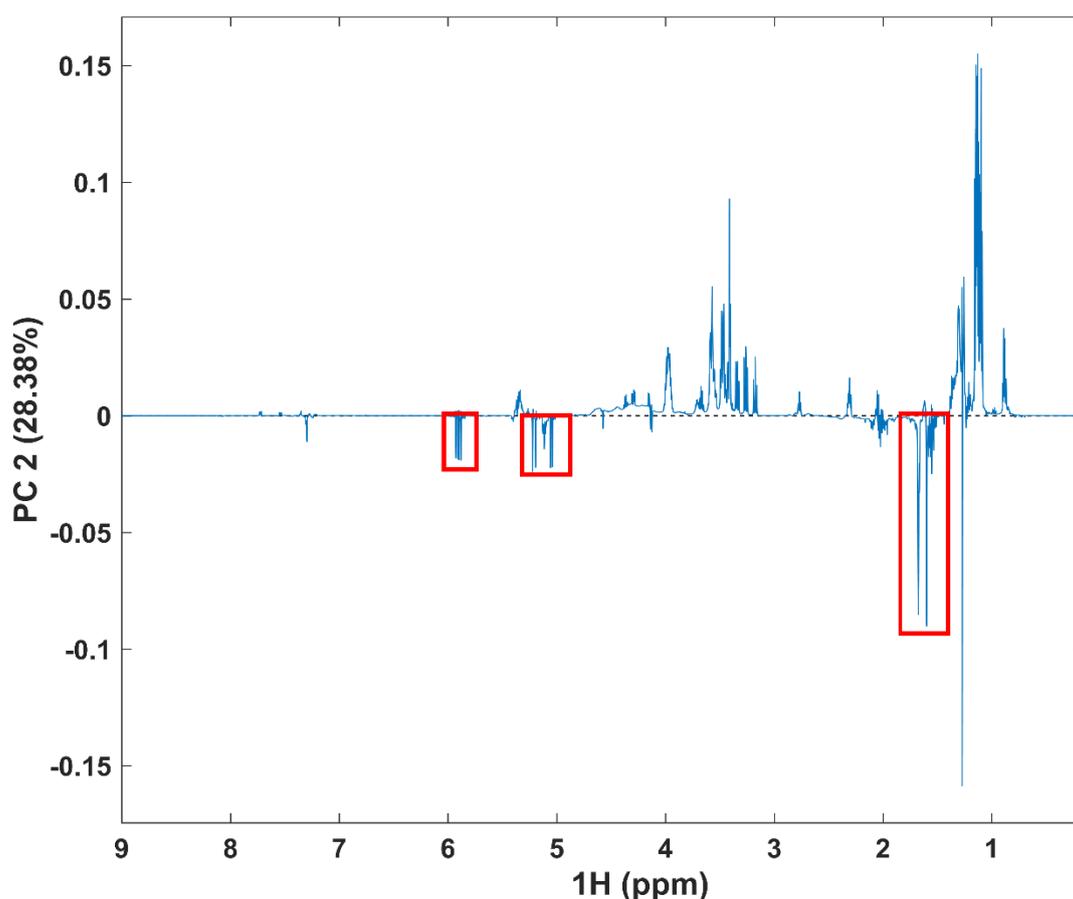
O gráfico de pesos de cada componente principal pode revelar os sinais dos espectros de RMN que mais influenciam nos escores. Assim, é possível avaliar esse resultado para associá-lo às diferenças observadas na Figura 10 e na Figura 12. O gráfico de pesos da Figura 13 é referente a PC1, em que os valores de escores positivos são característicos de um grupo de 23 amostras

de OE de pau-rosa não autênticas (U2, 3 amostras da marca U10, U11, U12, uma amostra da marca U13, U16, uma amostra da marca U18 e U19), enquanto os valores negativos referem-se a todas as amostras autênticas e 33 amostras não autênticas. Alguns sinais da Figura 13 com escores negativos de PC1 podem ser destacados: 7,90 ppm; 5,90 ppm; 5,22 ppm; 5,19 ppm; 5,11 ppm; 5,06 ppm; 5,04 ppm; 3,94 a 4,01 ppm; 3,67 ppm; 3,59 ppm; 3,58 ppm; 3,48 ppm; 3,47 ppm; 3,42 ppm; 3,41 ppm; 3,34 ppm; 3,25 ppm; 3,17 ppm; 1,68 ppm; 1,60 ppm; 1,53 a 1,58 ppm; 1,09 a 1,16 ppm. Isso significa que esses sinais são os que mais influenciam nas amostras que apresentam escores negativos de PC1 na Figura 12. Já os sinais que mais contribuem nas amostras com escores positivos de PC1 são: 5,30 a 5,40 ppm; 5,27 ppm; 4,31 ppm; 4,28 ppm; 4,14 ppm; 2,78 ppm; 2,29 a 2,32 ppm; 1,99 a 2,08 ppm; 1,61 ppm; 1,3 ppm; 1,26 ppm; 0,97 ppm; 0,88 ppm.



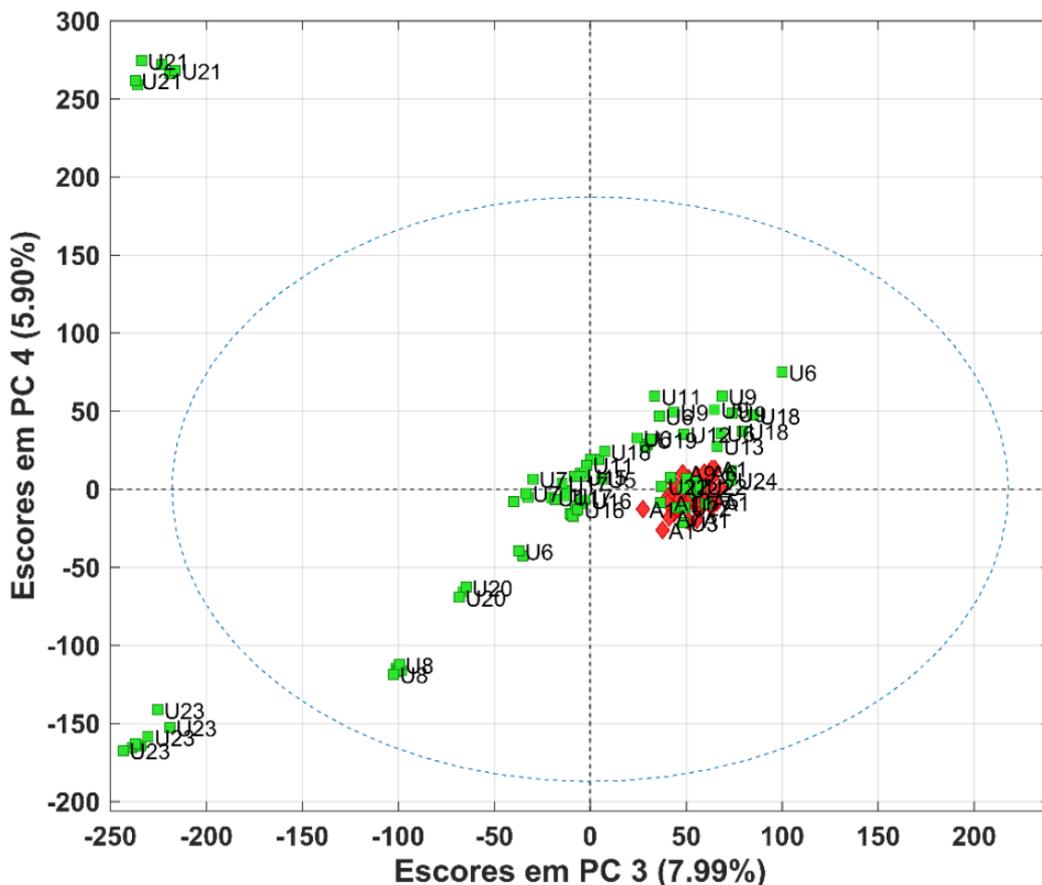
**Figura 13.** Gráfico de pesos da PC1 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com pré-processamento *mean center*. Regiões destacadas em vermelho indicam os sinais do composto Linalol.

O gráfico de pesos da PC2 (Figura 14) também aponta para variáveis importantes para a separação das amostras autênticas, uma vez que essas se agrupam na Figura 12 com os escores negativos de PC2. Vale destacar os sinais em 7,29 ppm; 5,90 ppm; 5,22 ppm; 5,19 ppm; 5,11 ppm; 5,06 ppm; 5,04 ppm; 4,58 ppm; 4,14 ppm; 4,13 ppm; 2,10; 1,96 a 2,06 ppm; 1,68 ppm; 1,60 ppm; 1,50 a 1,58 ppm; 1,27 ppm, sendo então, esses os sinais que mais contribuem para separar as amostras autênticas de OE de pau-rosa do grupo de amostras não autênticas que está apresenta escores positivos em PC2. Já os sinais mais influentes nos escores positivos de PC2 e que mais contribuem para a maioria das amostras não autênticas, são: 7,72 ppm; 7,54 ppm; 5,30 a 5,40 ppm; 5,26 ppm; 4,37 ppm; 4,31 ppm; 4,29 ppm; 4,15 ppm; 3,93 a 4,01 ppm; 3,38 a 3,74 ppm; 3,34 ppm; 3,26 ppm; 3,17 ppm; 2,77 ppm; 2,31 ppm; 2,05 ppm; 1,28 a 1,38 ppm; 1,26 ppm; 1,21 ppm; 1,08 a 1,16 ppm; 0,88 ppm.



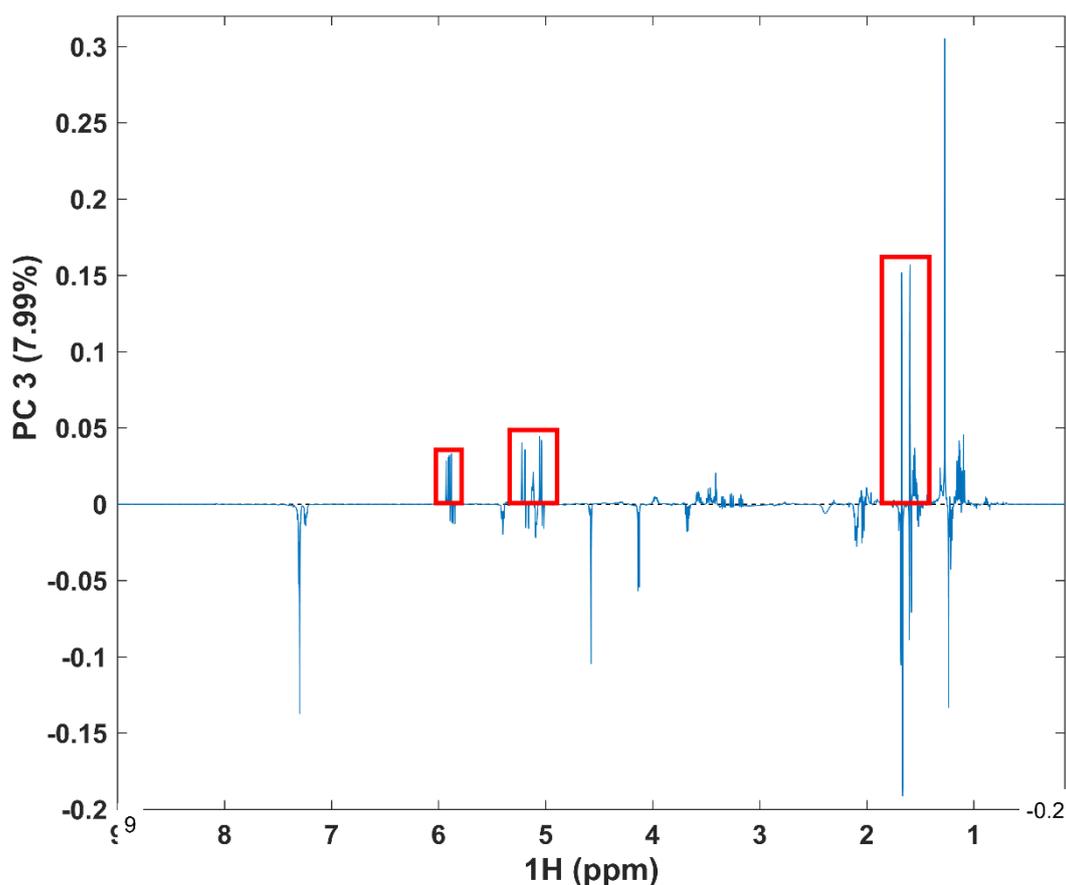
**Figura 14.** Gráfico de pesos da PC2 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com pré-processamento *mean center*. Regiões destacadas em vermelho indicam os sinais do composto Linalol.

As componentes PC3 e PC4 explicam 7,99 % e PC4 5,9% da variância dos dados, respectivamente. A Figura 15 mostra o gráfico dos escores PC3 x PC4. Ao observar a PC3 é possível notar essa componente contribui na diferenciação principalmente dos óleos autênticos das marcas não autênticas U8, U21 e U23. Essa variância não havia sido explicada em PC1, nem PC2. Já em PC4, é possível ressaltar a separação das amostras da marca U21 e U23, que se mostram mais similares às amostras autênticas em PC1 e PC2. Na PC4 é notória a separação entre as marcas U21 e U23, já que uma está mais no extremo do gráfico em escores positivos e outra em escores negativos. Além disso, nem em PC3 e nem em PC4 essas amostras estão agrupadas com amostras autênticas, enfatizando então, que existem variáveis que são capazes de diferenciar esses óleos que nas duas primeiras componentes principais não foram explicadas.



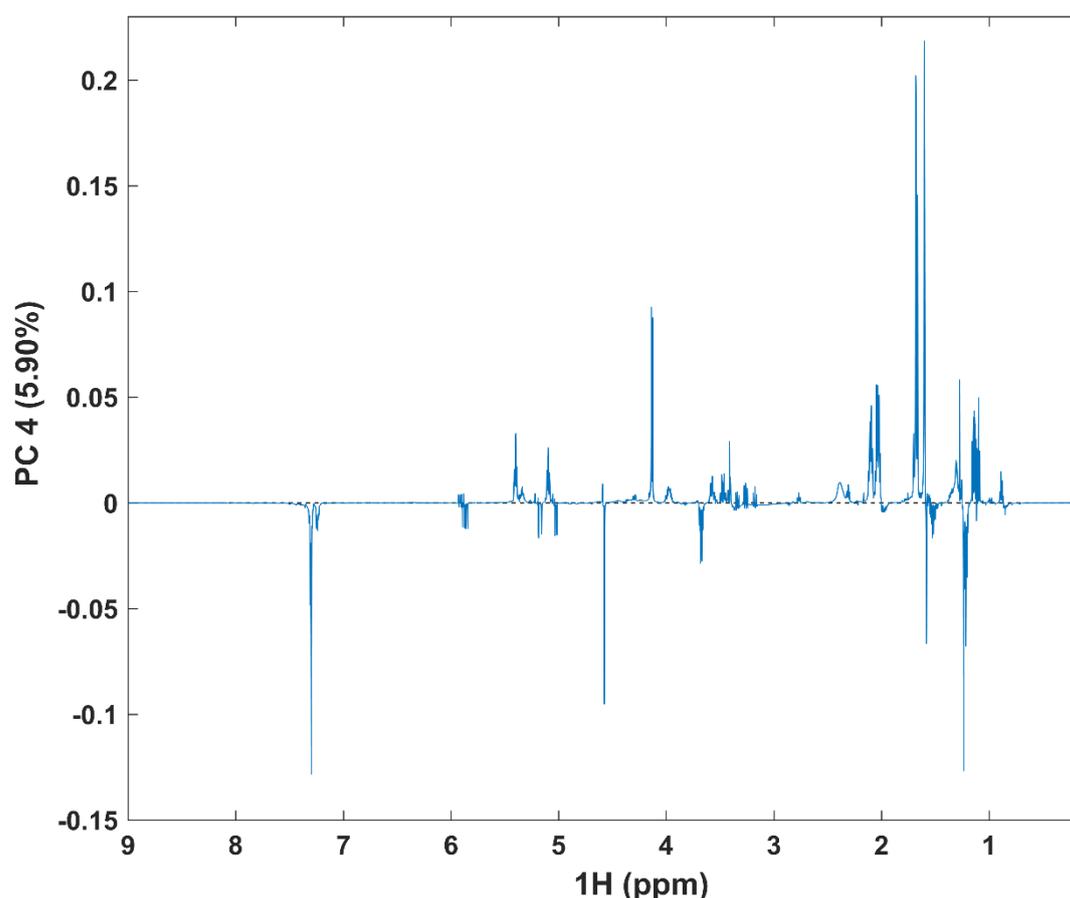
**Figura 15.** Escores de PC3 no eixo X (7,99% de variância explicada) e PC4 no eixo Y (5,90% de variância explicada). (A, vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (U, verde) amostras não autênticas.

Da mesma forma que foi visto com as duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2), é possível obter o gráfico de pesos da PC3 e PC4. Na PC3 observa-se uma separação das amostras autênticas e 3 marcas de amostras não autênticas que em PC1xPC2 agrupavam com as autênticas, além da marca U20 que está mais distante das amostras autênticas em PC3. Na Figura 16, então, é possível observar os sinais que mais contribuem para essa separação. Os sinais que mais influenciam nos escores negativos de PC3 são: 5,87; 5,40 ppm; 5,19 ppm; 5,16 ppm; 5,09 ppm; 5,03 ppm; 5,02 ppm; 4,58 ppm; 4,13 ppm; 3,65 a 3,70 ppm; 2,39 ppm; 2,10 ppm; 2,03 a 2,05 ppm; 1,68 ppm; 1,67 ppm; 1,60 ppm; 1,58 ppm; 1,52 ppm; 1,23 ppm; 1,21 ppm. Já os sinais que influenciam nos escores positivos de PC3 são: 5,90 ppm; 5,22 ppm; 5,19 ppm; 5,11 ppm; 5,06 ppm; 5,04 ppm; 3,93 a 4,01 ppm; 3,40 a 3,60 ppm; 3,34 ppm; 3,26 ppm; 3,18 ppm; 1,67 ppm; 1,60 ppm; 1,53 a 1,57 ppm; 1,27 ppm; 1,17 a 1,09 ppm.



**Figura 16.** Gráfico de pesos da PC3 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com pré-processamento *mean center*. Regiões destacadas em vermelho indicam os sinais do composto Linalol.

Entretanto na Figura 15 a maior contribuição do gráfico que se pode observar é na separação que ocorre em PC4 entre as amostras não autênticas de marca U21, com escores positivos, e U23, com escores negativos. Destaca-se na Figura 17 os sinais com escores negativos em 7,30 ppm; 7,29 ppm; 5,87 ppm; 5,19 ppm; 5,16 ppm; 5,04 ppm; 5,02 ppm; 4,58 ppm; 3,65 a 3,70 ppm; 1,58 ppm; 1,48 a 1,55 ppm; 1,20 ppm. E os sinais positivos em PC4, mais influentes nas amostras da marca U21 são: 5,90 ppm; 5,40 ppm; 5,34 ppm; 5,22 ppm; 5,09 ppm; 5,05 ppm; 4,59 ppm; 4,3 ppm; 4,13 ppm; 3,93 a 4,02 ppm; 3,40 a 3,60 ppm; 3,34 ppm; 3,26 ppm; 3,18 ppm; 2,77 ppm; 2,39 ppm; 2,30 ppm; 2,00 a 2,13 ppm; 1,60 a 1,80 ppm; 1,25 a 1,39 ppm; 1,08 a 1,16 ppm; 0,88 ppm.



**Figura 17.** Gráfico de pesos da PC4 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com pré-processamento *mean center*.

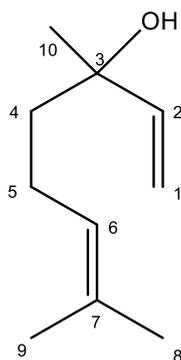
Levando em consideração os gráficos de pesos e os sinais que mais contribuem para a separação dos OE de pau-rosa, tem-se que nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  os sinais que são mais influentes para os OE de pau-rosa

autênticos são os sinais em escores negativos em PC1, negativos em PC2 e positivos em PC3. Portanto, os sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  que coincidem nesses gráficos de pesos e mais contribuem para essas amostras são: 5,90 ppm; 5,22 ppm; 5,19 ppm; 5,11 ppm; 5,06 ppm; 5,04 ppm; 1,68 ppm; 1,60 ppm; 1,53 - 1,58 ppm. Todos esses sinais foram sinalizados nos gráficos de pesos de PC1, PC2 e PC3 (Figuras 13, 14 e 16) com caixas em vermelho.

Dessa forma, após a análise exploratória, os espectros bidimensionais de RMN foram analisados com o objetivo de atribuir os sinais de Hidrogênio que mais contribuem para diferenciar as amostras autênticas das não autênticas a algum composto por meio da determinação da sua estrutura.

## 5.2. Caracterização do linalol por RMN bidimensional

Inicialmente, os experimentos de RMN monodimensionais de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e bidimensionais  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC e  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Anexo C) foram realizados com uma das amostras de OE de pau-rosa autêntica para caracterizar os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  pertencentes ao linalol (Figura 18), que é a substância majoritária presente no OE da espécie *Aniba rosiodora* e avaliar se os sinais encontrados nos gráficos de pesos pertencem a esse composto. Na Tabela 4 se encontram os sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  que caracterizam o linalol e suas respectivas correlações, que os espectros forneceram.



**Figura 18.** Estrutura do linalol com carbonos enumerados.

**Tabela 4.** Atribuição dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  do linalol e comparação com os dados da literatura (Hanneguelle, et al., 1992; Silva, 2011).

	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	HMBC	COSY	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm) lit.	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) lit.
1	111,6	5,05 (dd, 1,3 Hz; 10,8Hz); 5,20 (dd, 1,3 Hz; 17,3Hz)	C2, C3, C4, C10	5,90	111,6	5,03 5,25
2	145	5,90 (dd, 17,3Hz; 10,8 Hz)	C3, C4, C10		145	5,93
3	73,3	-			73,4	-
4	42,1	1,55 (m)	C3, C5, C6, C10	2,01	42,0	1,52
5	22,7	2,01 (m)	C3, C6, C7	5,11	22,7	2,03
6	124,3	5,11 (tqui, 7,1 Hz; 1,4 Hz)	C8, C9		124,3	5,14
7	131,7	-			131,8	-
8	25,6	1,68 (s)	C7, C9		25,6	1,67
9	17,6	1,60 (s)	C7		17,6	1,60
10	27,5	1,27 (s)	C3		27,8	1,27

Ao comparar os sinais da Tabela 4 com os sinais analisados no gráfico de pesos nas análises de PCA descritos anteriormente, observa-se que os sinais do linalol possuem relevância nos gráficos, indicando que o esse é um dos componentes dos OE de pau-rosa autênticos que mais os diferencia dos não autênticos. De acordo com a literatura, como o linalol é o componente majoritário do OE de pau-rosa, sua quantidade pode ser determinante para caracterizar o OE de pau-rosa, sendo os óleos autênticos compostos por uma maior porcentagem de linalol.

Após identificar os sinais característicos do linalol, é possível quantificá-lo em cada amostra estudada. Como o linalol é muito utilizado na indústria, principalmente como um fixador de fragrância de perfumes, é importante, além de conhecer a composição do óleo que se compra, saber a quantidade do composto majoritário que está vinculado também ao rendimento do óleo que está sendo vendido, ou seja, quanto de óleo está sendo extraído através da biomassa inicial.

Para realizar a quantificação de um analito por RMNq é requerido um sinal analítico adequado para a integração. Dentre os sinais da Tabela 4, o sinal escolhido para quantificar o linalol nas amostras foi o sinal que corresponde ao deslocamento químico de 5,90 ppm, referente ao H2, pois é um sinal que se encontra sem sobreposição e isolado de demais sinais, sendo possível realizar uma boa integração. Além disso, esse sinal foi inequivocamente atribuído e confirmado pelos experimentos monodimensionais

de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e os bidimensionais  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC e  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY e literatura.

A Tabela 5 informa os teores de linalol obtidos pelo método PULCON, que utiliza referência externa para quantificar analito presente na amostra. Os valores apresentados na Tabela 5 referem-se ao valor médio de cada marca. Porém, ao se avaliar os teores de linalol de cada amostra, cujos resultados estão apresentados no Anexo D, é possível observar que, dentro de uma mesma marca de OE de pau-rosa não autêntica, como U6, U8, U10, U11, U13, U18 e U23, existe uma variação grande da quantidade de linalol. Essa alta variação na concentração de linalol também pode ser observada pelos altos valores de coeficiente de variação (CV), que nas marcas citadas acima é superior a 20%.

**Tabela 5.** Teor de linalol médio e o coeficiente de variação (CV) correspondente para amostras de OE de pau-rosa.

Marca	Teor médio de linalol (%)	CV (%)
A1	58,75	7,42
A2	63,86	3,78
A3	62,20	-
A4	64,19	-
A5	53,86	-
A6	57,98	0,79
A7	60,92	-
A9	62,15	-
A10	61,60	-
A11	59,02	-
U1	5,25	-
U2	0,94	-
U3	50,80	-
U4	4,70	-
U5	4,74	-
U6	12,31	21,28
U7	**	-
U8	3,38	53,66
U9	15,43	0,77
U10	24,48	137,29
U11	4,01	113,25
U12	19,51	-
U13	13,23	132,58
U14	1,81	-
U15	4,67	-
U16	**	-
U17	2,07	2,00
U18	10,60	67,30
U19	**	-
U20	0,65	2,93
U21	3,76	5,15
U22	62,93	2,43
U23	36,07	21,65
U24	75,35	-

\*\*Dados obtidos abaixo do Limite de Quantificação (S/R inferior a 10:1)

As amostras de 3 marcas (U7, U16 e U19) não foram quantificadas, visto que a relação sinal/ruído para o sinal utilizado na quantificação estava abaixo do Limite de Quantificação (LQ) da técnica. O LQ é a menor concentração que pode ser quantificada com uma incerteza aceitável. É comum usar valores de S/R de 3:1 para o LD e valores de S/R de 10:1 para LQ.

No caso das amostras da marca U7, o valor de S/R varia em torno de 5:1, o que torna o linalol detectável, mas não quantificável. Já as amostras da marca U16 possuem S/R aproximado de 2,7:1 o que indica que além de não quantificável, está abaixo do limite de detecção. A marca U19 possui amostras com espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com bastante sinais na região do sinal de 5,90

ppm, dificultando inclusive o cálculo da relação S/R. Mas, o valor de S/R está próximo de 6,5:1 que torna o linalol detectável nesses óleos, mas não quantificável.

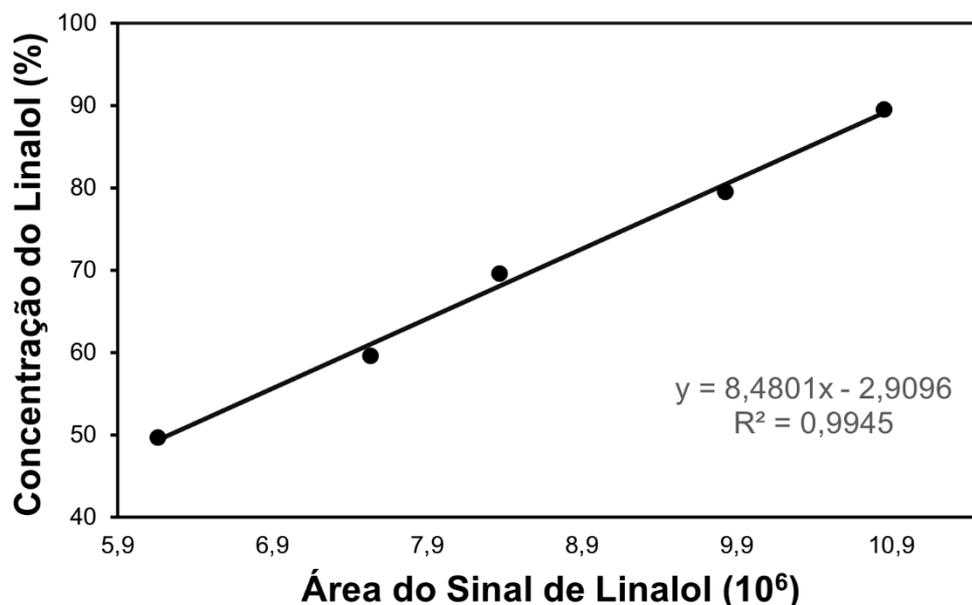
Com a Tabela 5 foi possível observar que todas as amostras de marcas consideradas autênticas têm em sua composição um teor de linalol que varia de 53 a 64%. Esse resultado corrobora com os dados da literatura, que descreve que os OE de pau-rosa são majoritariamente constituídos por linalol (Morais, et al., 1972; Ohashi, Rosa e Santana, 1997; Alencar e Fernandes, 1978).

Para confirmar a quantificação dos OE foi feita uma validação do método. A validação consiste em garantir que o método é adequado para a finalidade proposta e para isso serão avaliadas algumas figuras de mérito.

### **5.3. Validação do método de quantificação de linalol por RMNq de <sup>1</sup>H**

Para a validação do método de quantificação do linalol pela técnica de RMNq de <sup>1</sup>H pelo método de PULCON, a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a um Espectrômetro de Massas (CG-EM) foi utilizada como método de referência para comparação. Foram escolhidas 3 amostras com alto teor de linalol, pois o objetivo principal é confirmar o teor de linalol nas amostras autênticas, e estas foram analisadas em triplicata por RMNq de <sup>1</sup>H e CG-EM. As amostras escolhidas foram: LPF 11-3 da marca A1, LPF 12-6 da marca A2 e LPF-58-1 da marca U24.

Para a quantificação por CG-EM, foi construída uma curva de calibração com um padrão de linalol (99,4%). A Figura 19 apresenta a curva de calibração obtida com 5 pontos de concentração, sendo eles em 49,7%; 59,6%; 69,6%, 79,5% e 89,5% de linalol. O método se mostrou capaz de manter a resposta linear dentro da faixa de concentração estudada. Além disso, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,9945 está dentro do limite de aceitação (BRASIL, 2017).



**Figura 19.** Curva de calibração para a quantificação de linalol por CG-EM.

A partir da curva de calibração construída, foi possível quantificar o linalol por meio dos cromatogramas obtidos para as amostras LPF 11-3, LPF 12-6 e LPF 58-1. A Tabela 6 apresenta os valores médios de concentração das triplicatas obtidos para cada amostras, tanto por meio da técnica de CG-EM, quanto por meio da técnica de RMNq de <sup>1</sup>H, além do coeficiente de variação dos teores obtidos pela técnica de RMNq de <sup>1</sup>H.

**Tabela 6.** Teor médio de linalol obtidos por CG-EM e RMNq de <sup>1</sup>H.

Amostra	Teor médio de linalol (%) CG-EM	Coefficiente de Variação (%) CG-EM	Teor média de linalol (%) RMNq de <sup>1</sup> H	Coefficiente de Variação (%) RMNq de <sup>1</sup> H
LPF 11-3	68,21	0,50	59,44	0,23
LPF 12-6	76,03	6,26	66,54	4,67
LPF 58-1	96,04	8,71	81,01	1,13

Ao se comparar os dados apresentados na Tabela 6, observa-se um desvio sistemático nos resultados de quantificação obtidos por meio das técnicas de RMNq de <sup>1</sup>H e de CG-EM. Segundo o Guia para a expressão de incerteza de medição - Avaliação de dados de medição (INMETRO, 2012), o desvio sistemático pode ser corrigido por um fator de correção quando este for possível de ser detectado, com a finalidade de diminuir a incerteza das medidas.

Antes da utilização de um fator de correção, foi feita uma investigação sobre o que possivelmente poderia estar causando esse desvio sistemático. A princípio foi novamente obtido o espectro do padrão externo DMSO<sub>2</sub> certificado para avaliar possíveis erros referente a pureza do padrão. Entretanto, não houve diferença nos resultados das análises quantitativas das amostras de OE de pau-rosa utilizando os dois padrões (dados não apresentados).

Outra hipótese que foi levantada que poderia ser responsável pelo desvio é de que nem todos os núcleos de hidrogênio referentes ao linalol estavam sendo excitados e posteriormente relaxados para detecção com o valor de  $D_1$  utilizado. Com essa possibilidade, a quantificação foi testada com amostras mais diluídas das amostras de OE de pau-rosa. A comparação foi feita com a amostra da marca 11-3, e foram observadas diferenças ao quantificar a amostra concentrada (90 mg) e a amostra diluída (14 mg). O teor de linalol encontrado quando quantificado com amostra diluída teve valor mais próximo do valor obtido com a quantificação feita pelo método de referência CG-EM. Além disso, foram feitas comparações entre as amostras do Peru com alta e baixa concentração e análises com linalol sintético de pureza conhecida, e foram obtidos teores de linalol diferentes para as amostras concentradas e diluídas. A pureza do padrão de linalol também foi determinada utilizando massas diferentes. Foram quantificadas duas amostras, uma preparada com massa de 44 mg e outra com 14 mg. Para a amostra utilizando 44 mg foi obtido um valor de  $91,7\% \pm 2,3\%$  (detalhes sobre a determinação da incerteza na seção 5.3.3), enquanto para a amostra preparada com 14 mg obteve-se  $100,5\% \pm 2,3\%$ , sendo mais próximo do valor de referência de 99,4%.

Portanto, em todas as análises realizadas, as amostras diluídas apresentaram sua quantificação mais próxima do valor de referência. Entretanto, não foi encontrado na literatura uma explicação para esse efeito. Dessa forma, o desvio sistemático observado deverá ser mais bem investigado por meio de testes de linearidade do equipamento para observar em que concentração começa a ocorrer esse desvio.

Tendo em vista o grande número de amostras e pouco tempo hábil para refazer todas as análises utilizando massa menor e correção do desvio

sistemático observado, optou-se pela utilização de um fator de correção conforme descrito pelo INMETRO (2012).

O fator de correção foi encontrado dividindo o valor do teor de linalol obtido pelo do método de referência (CG-EM), pelo valor obtido pelo método de RMNq de <sup>1</sup>H. O valor encontrado foi de 1,16. Logo, todos os valores de concentração obtidos por RMN foram multiplicados por esse fator. Na Tabela 7 estão apresentados os valores do teor médio de linalol corrigidos para o método de RMNq de <sup>1</sup>H.

**Tabela 7.** Teor médio de linalol obtidos por CG-EM e RMNq de <sup>1</sup>H com valores corrigidos.

Amostra	Teor médio de linalol (%) CG-EM	Teor média de linalol (%) RMNq de <sup>1</sup> H
LPF 11-3	68,21	68,95
LPF 12-6	76,03	76,63
LPF 58-1	96,04	93,98

Assim, todos os valores de teor de linalol que foram obtidos anteriormente por meio da técnica de RMNq de <sup>1</sup>H (Tabela 5) foram corrigidos por esse mesmo fator de correção proposto. O teor médio de linalol obtido após a aplicação do fator de correção estão apresentados na Tabela 8. No Anexo D se encontra o teor de linalol corrigido para cada amostra analisada.

**Tabela 8.** Teor médio de linalol corrigido e coeficiente de variação (CV) obtidos por meio da técnica de RMNq de <sup>1</sup>H para amostras de OE de pau-rosa autênticas (A) e não autênticas (U).

Marca	Teor médio de linalol (%)	CV (%)*
A1	68,1	7,4
A2	74,1	3,8
A3	72,2	-
A4	74,4	-
A5	62,5	-
A6	67,3	0,8
A7	70,7	-
A9	72,1	-
A10	71,4	-
A11	68,5	-
U1	5,5	-
U2	1,1	-
U3	58,9	-
U4	5,4	-
U5	5,5	-
U6	14,3	21,3
U7	**	-
U8	3,9	53,7
U9	17,9	0,8
U10	28,4	137,3
U11	4,7	113,2
U12	22,6	-
U13	15,3	132,6
U14	2,1	-
U15	5,4	-
U16	**	-
U17	2,4	2,0
U18	12,3	67,3
U19	**	-
U20	0,8	2,9
U21	4,4	5,1
U22	73,0	3,9
U23	41,8	21,6
U24	88,0	-

\*(CV) Coeficiente de variação do resultado da análise de amostras contendo mais de um frasco.

\*\* Dados obtidos abaixo do Limite de Quantificação (S/R inferior a 10:1)

Nessa etapa que também foi possível observar a composição da amostra LPF 58-1, inicialmente classificada como autêntica. Através das análises do CG-EM para essa amostra, foi possível concluir que a amostra não possuía o mesmo perfil químico das demais amostras classificadas como autênticas. Em seu cromatograma foram identificados apenas os sinais referentes ao linalol e ao diidrolinalol e nos espectros de RMN também foi observada a falta de sinais dos compostos minoritários presentes nos espectros dos demais OE autênticos de pau-rosa. Portanto, essa amostra foi considerada não autêntica por suspeita de ser composta de linalol sintético.

Após a correção dos valores de concentração de linalol, foram então obtidas algumas figuras de mérito para validar o método de RMN que foi proposto para determinação do teor de linalol. Para a validação do método de RMNq de  $^1\text{H}$  e referência externa (PULCON) foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: exatidão, precisão, incerteza, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

### 5.3.1. Exatidão

A exatidão está relacionada ao grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito, ou entre valor medido e valor verdadeiro. Nesse caso, o valor medido ou resultado de um ensaio são os valores de teor de linalol obtidos pelo método de RMNq de  $^1\text{H}$  e o valor de referência ou valor verdadeiro que é o teor de linalol obtido pelo método de referência, o CG-EM.

Uma das formas de se obter a exatidão de um método é através do cálculo de erro relativo. Na Tabela 9 estão presentes os erros relativos, em porcentagem, para cada amostra de OE de pau-rosa analisada. Os valores de erro relativo para todas as amostras analisadas foram inferiores a 5%, o que exprime uma boa exatidão do método e que é rotineiramente atingida ao usar o método de RMNq (Wishart, et al., 2022).

$$\text{Erro relativo} = \frac{|\text{Valor medido} - \text{Valor de referência}|}{\text{Valor de referência}}$$

(9)

**Tabela 9.** Erro relativo, em porcentagem, obtido para a técnica de RMNq de  $^1\text{H}$ , tendo como valor de referência a técnica de CG-EM, após a correção do erro sistemático.

Amostra	Erro Relativo (%)
LPF 11-3	1,09
LPF 12-6	0,79
LPF 58-1	2,15

### 5.3.2. Precisão

A precisão tem como objetivo estimar a variação aleatória dos resultados em amostras medidas em replicata e, portanto, expressa o grau de

concordância entre os resultados das medidas de uma mesma amostra. A precisão do método pode ser determinada pela estimativa do desvio padrão relativo (DPR ou RSD, do inglês *relative standard deviation*), expressada para as amostras consideradas pela equação abaixo:

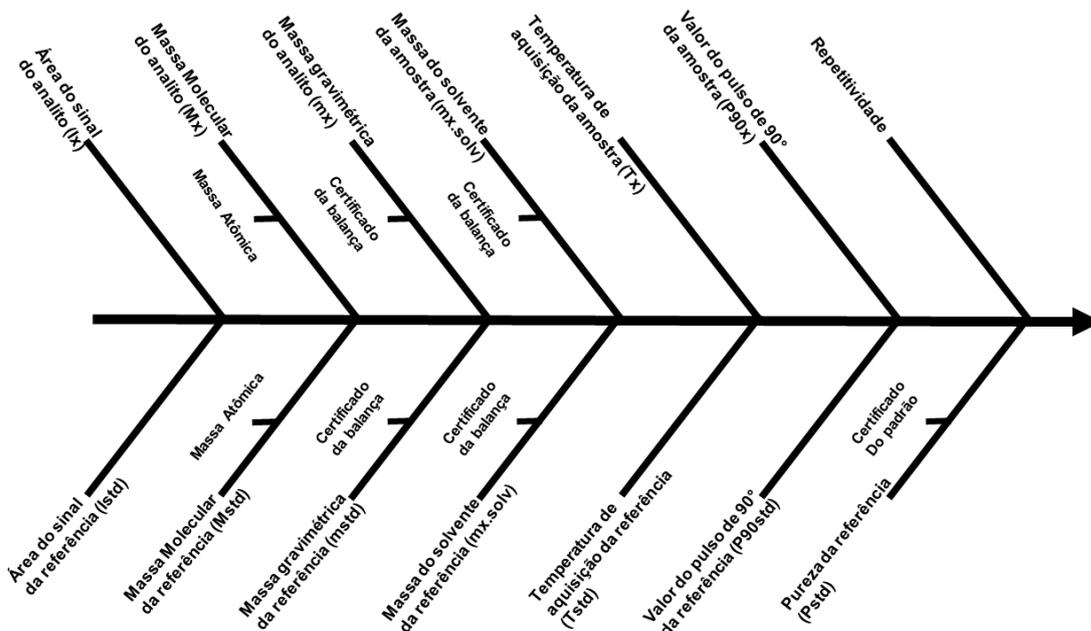
$$precisão = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \left( \frac{\hat{y}_{ij} - \bar{y}_i}{\bar{y}_i} \right)^2}{n(m-1)}} \quad (10)$$

Em que  $n$  é o número de amostras, que nesse caso são 3,  $m$  é o número de replicatas, 3 por amostra,  $\hat{y}_{ij}$  é o valor de cada medição por amostra e  $\bar{y}_i$  é a média das replicatas de cada amostra.

Realizando os cálculos acima, têm-se que a precisão do método de RMN é de 2,78%. Já o método de referência, CG-EM, obteve DPR igual a 6,31%, sendo maior que o desvio observado nas análises de RMN. Segundo INMETRO, para conferir se há uma variância significativa entre os métodos, deve-se aplicar o Teste F, caso  $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tabelado}}$ , não há diferença significativa entre os métodos. O F calculado foi de 5,16, enquanto o tabelado para o grau de liberdade usado é de 3,44 considerando um nível de confiança de 95%, o que indica uma maior precisão obtida pelo método de RMN.

### 5.3.3. Incerteza

Como a medição envolve uma combinação de etapas, cada etapa possui um valor de erro associado e que, conseqüentemente, influencia no valor final da incerteza. Dentre algumas fontes de incerteza pode-se citar a incerteza da balança, integração da área do espectro, valores de referência, no caso a pureza do padrão (material de referência), DMSO<sub>2</sub> e erros instrumentais. Se faz necessário saber o quanto de cada fonte de erro que impacta no valor final da concentração, para que se saiba o quão confiável é o resultado (de la Cruz, et al., 2010). As contribuições que provém da equação (5) do método PULCON estão ilustradas no diagrama de Ishikawa (Figura 20).



**Figura 20.** Diagrama de causa e efeito (Ishikawa) com as fontes de incerteza do método PULCON.

Segundo o Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (GUM), através da norma ISO/IEC 17025, a incerteza é o parâmetro capaz de mensurar a dispersão entre os valores medidos. Ela não pode ser usada para corrigir algum resultado, mas é considerada uma indicação quantitativa da qualidade da medição.

As fontes de incertezas que contribuem para a incerteza do método e que estão citadas no diagrama de causa e efeito da Figura 20 podem ser obtidas como estimativa do Tipo A ou do Tipo B. Tipo A caracteriza as incertezas feitas através de análise estatística de medições repetidas e feitas durante o processo, como as incertezas associadas à Temperatura de aquisição, o valor do Pulso de 90°, repetitividade e a área de integração do sinal. Já a estimativa do Tipo B são aquelas fornecidas por certificados, MRC's, dentre outros meios, podendo citar então as fontes de incerteza das massas proveniente da balança, pureza do material de referência e incerteza associada à Massa Atômica das substâncias envolvidas. Além das incertezas citadas na Figura 20, a incerteza do fator de correção utilizada para corrigir os valores de concentração foi adicionada como fonte de incerteza.

O valor da incerteza combinada ( $u$ ) para quantificação de linalol foi então calculado pela Equação 11 e o valor obtido foi de aproximado de 1,18%. Como mostra a Equação 12, o valor da incerteza expandida ( $U$ ) para a amostra é obtido então pela multiplicação da incerteza combinada pelo fator de abrangência  $k$  ( $k_{95,45\%} = 2$ ) que resulta em 2,3%.

$$u(P_x) = P_x \sqrt{\left(\frac{u(m_x)}{m_x}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{std})}{m_{std}}\right)^2 + \left(\frac{u(M_x)}{M_x}\right)^2 + \left(\frac{u(M_{std})}{M_{std}}\right)^2 + \dots} \quad (11)$$

$$U(P_x) = u(P_x)k \quad (12)$$

#### 5.3.4. Sinal/Ruído

Para a técnica de RMN, a relação sinal-ruído (S/R) é a principal referência para avaliar a detecção e quantificação do analito. Para o LD o sinal deve ter uma intensidade três vezes maior que o ruído, ou seja, uma a razão S/R 2:1. Já para o LQ o valor mínimo da relação S/R é de 10:1. (BRASIL, 2017; MALZ, 2008).

Seguindo esses valores de S/R limites, foram calculados os valores médios de S/R para as amostras analisadas por CG e RMN e os resultados estão na Tabela 10. É possível observar que todos os resultados obedecem aos critérios estabelecidos para a relação S/R para considerar uma amostra como detectável e quantificável.

**Tabela 10.** Valores de Sinal/Ruído (S/R) obtidos para o sinal em 5,90 ppm nos espectros de RMNq de  $^1\text{H}$ .

Amostra	Teor médio de linalol (%) RMN – valor medido	S/R
LPF 11-3	68,95	6573,76
LPF 12-6	76,63	8577,02
LPF 58-1	93,98	9439,51

Vale ressaltar que essas amostras apresentam alto teor de linalol, portanto era de se esperar um valor alto de S/R. O valor de S/R para todas as 3 amostras quantificadas por esse método foi calculado a fim de garantir que

as análises estão sendo realizadas dentro dos limites aceitáveis de quantificação.

#### **5.4. Análise univariada com teor de linalol**

Uma vez que o método de RMNq de  $^1\text{H}$  se mostrou satisfatório para a quantificação dos teores de linalol, uma avaliação mais detalhada dos resultados obtidos (Tabela 8 e Anexo D) foi realizada. De forma geral, dentre as amostras de OE de pau-rosa autênticas e não autênticas, vale destacar que alguns óleos não autênticos possuem teor de linalol próximo aos OE de pau-rosa autênticos.

Em particular, a marca U10 possui um grande coeficiente de variação como visto na Tabela 8, revelando uma grande diferença entre o teor de linalol de suas amostras. Com a análise do Anexo D encontra-se duas amostras da marca U10 com alto teor de linalol, sendo elas LPF-17 com 81,31% e LPF-19 com 59,02%, que corrobora com os resultados encontrados em PCA, por serem amostras que se agrupam com os óleos autênticos, por conta do teor do composto majoritário do OE de pau-rosa. Outra amostra que vale destacar é a amostra LPF 42-8 da marca U23 com 63,74% de linalol, sendo também uma das amostras que estão agrupadas como as citadas acima da marca U10. Além das marcas citadas, a marca U3 (58,93%), U22 (73,00%) e U24 (87,99%) possuem altos teores de linalol. Importante ressaltar que essas amostras estão agrupadas com as amostras autênticas em PC1 e PC2 das análises exploratórias de PCA.

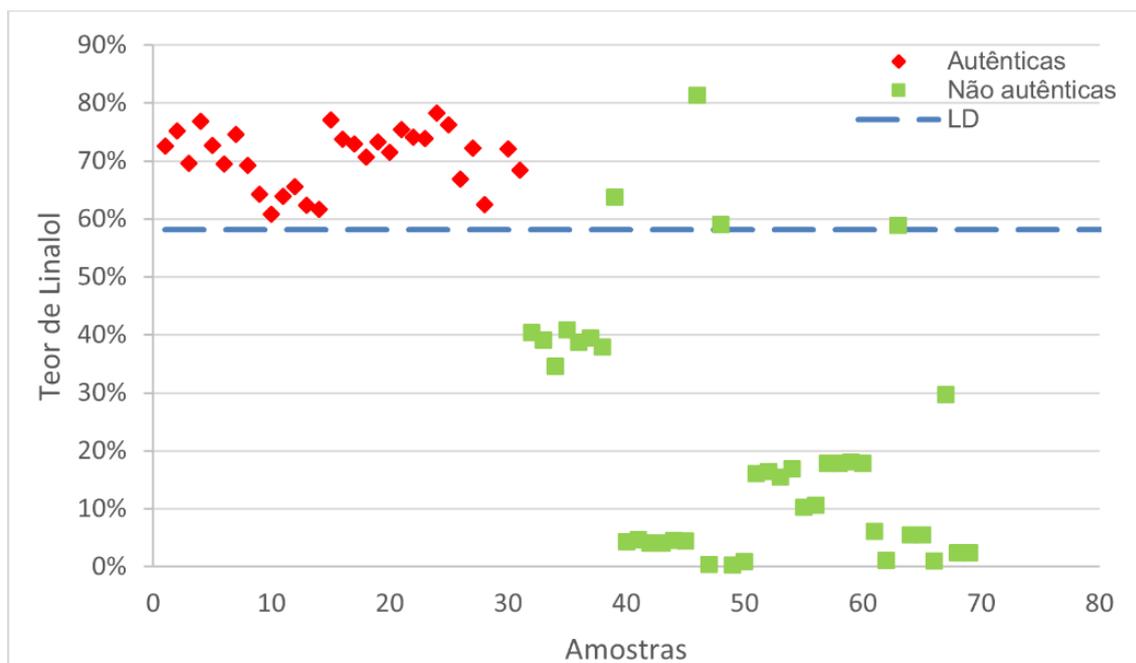
Apesar dessas observações pontuais do alto teor de linalol de algumas amostras dos OE não autênticos, foi testado um modelo univariado, em que a única variável levada em consideração para classificar os OE de pau-rosa seria o teor de linalol. As amostras foram divididas em amostras de treinamento e amostras de validação conforme Tabela 11.

**Tabela 11.** Amostras de OE de pau-rosa divididas em amostras de treinamento e validação.

<b>Amostras de treinamento do modelo</b>	<b>Amostras de validação do modelo</b>
A1: LPF (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10-1, 10-2, 11-1, 11-2 e 11-3)	A1: LPF (11-4, 11-5, 11-6, 11-7, 11-8, 11-9, 11-10)
A2: LPF (12-1, 12-2, 12-3, 12-4, 12-5, 12-6, 13-4, 13-5, 13-6, 13-7, 13-8)	A2: LPF (12-7, 12-8, 13-1, 13-2, 13-3)
A3	A4
A6: LPF 54	A6: LPF 55
A5	A7
A9	A10
A11	U8
U1	U11
U2	U12
U3	U14
U4	U18
U5	U20
U6	U22
U9	U24
U10	AP: (amostras do Peru PA1, PA2, PA3, PA4 e PA5).
U13	
U15	
U17	
U21	
U23	

As marcas U7, U16 e U19 não entraram nessa classificação por não possuir S/R acima da razão 10/1, ideal para quantificação. Portanto, não foi possível quantificar o linalol nessas amostras. Além disso, na validação dessa análise quimiométrica também foram acrescentadas as amostras obtidas do Peru (marca AP), com o objetivo de analisar seu comportamento em relação às amostras autênticas obtidas no Brasil.

Após a separação das amostras em amostras de treinamento e amostras de validação, e ainda observando as classificações pré-existentes como amostras autênticas ou não autênticas, foi construído um gráfico da análise univariada relacionando essa informação com o teor de linalol (Figura 21). Ao se observar o gráfico obtido, nota-se a presença de 4 amostras que seriam classificadas como autênticas pela análise univariada se considerarmos apenas os valores de concentração de linalol, são elas: marca U23 (amostra LPF 48-2), marca U10 (LPF 17 e 19) e marca U3 (LPF 21). Essas mesmas amostras já foram citadas anteriormente por serem marcas não autênticas, mas com um alto teor de linalol.



**Figura 21.** Gráfico de treinamento de análise univariada em relação ao teor de linalol das amostras de OE de pau-rosa. (Vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (Verde) amostra não autênticas.

Assim, a composição química das marcas U23, U10 e U3 será analisada a seguir com maiores detalhes para avaliar se representam um dado atípico ou inconsistente (*outlier*), e que apenas atrapalharia na interpretação dos demais resultados. Para auxiliar nessas análises, o trabalho de Pastore e colaboradores (2022), cujo estudo é realizado com as mesmas amostras avaliadas nessa dissertação, será utilizado.

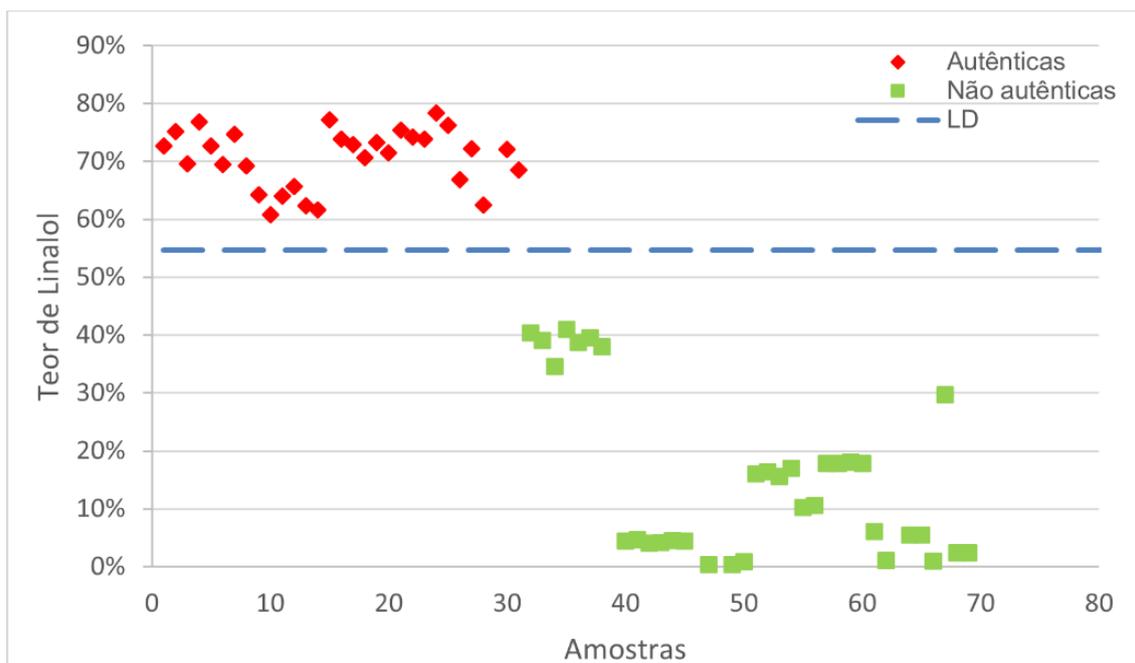
A análise do perfil químico realizada por Pastore e colaboradores (2022) mostra que a marca U23 está adulterada com álcool benzílico. Os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  característicos do álcool benzílico também foram identificados nas amostras de OE da marca U23 e estão apresentados no Anexo E. Assim, devido à presença desse adulterante, confirma-se que marca U23 é um OE não autêntico. Essa marca possui 8 óleos analisados e somente um deles é classificado de forma incorreta, portanto, essa amostra será considerada como *outlier*, ou seja, representa um valor atípico e inconsistente, o que apenas atrapalharia na interpretação dos demais resultados será considerada como *outlier* para a análise univariada.

Para a marca U10, ao se avaliar os resultados de quantificação de linalol obtidos nesse trabalho (Tabela 8), foi calculado um CV de 137,29% e,

portanto, as amostras que compõem essa marca apresentam uma alta variação no teor de linalol. Assim, a marca U10 também foi considerada como um *outlier* pela inconsistência na sua composição.

Já para a amostra da marca U3 tem-se a informação de que esse OE foi extraído utilizando-se 10% de álcool etílico (Tabela 1). Os sinais referentes aos resíduos desse solvente foram observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Anexo F). No trabalho de Pastore e colaboradores o etanol não foi detectado nessa amostra porque os cromatogramas obtidos no CG-EM foram adquiridos com tempo de retenção a partir de 5 min, devido ao Solvente *Delay*, enquanto o tempo de retenção média para o etanol é de 2,21min (Feltraco; Antunes; Linden, 2009). A presença de álcool etílico nessa amostra de OE é um adulterante, uma vez que essa substância não é esperada no perfil químico do OE de pau-rosa e, por esse motivo, confirma-se que essa é uma amostra não autêntica e ela também foi considerada como *outlier* para a análise univariada.

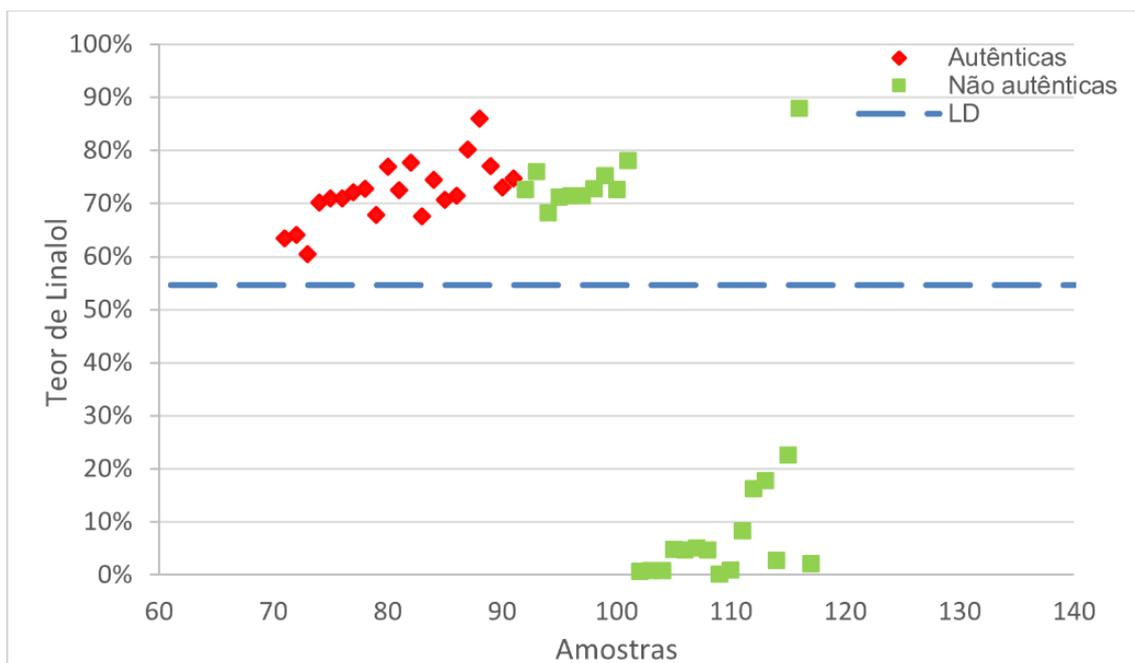
Portanto, após eliminação das amostras consideradas como *outliers*, o gráfico de treinamento da análise univariada com teor de linalol foi construído, com a finalidade de criar um modelo que classifique os OE de pau-rosa, extraídos ou comercializados, através do teor do linalol, seu composto majoritário. O gráfico obtido está apresentado na Figura 22.



**Figura 22.** Gráfico de treinamento de análise univariada em relação ao teor de linalol das amostras de OE de pau-rosa sem as amostras consideradas como *outliers*. (Vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (Verde) amostras não autênticas.

O modelo proposto através da análise univariada dos dados de teor de linalol propõe que o limite de determinação, ou seja, o limite que classifica uma amostra como autêntica ou não autêntica é de 54,6%. Portanto, OE de pau-rosa que apresentem teores de linalol acima de 54,6% são considerados autênticos e OE de pau-rosa que apresentem teores de linalol abaixo desse valor são considerados não autêntico.

Após a construção do modelo, foi feita a etapa de validação do modelo, em que as amostras de validação descritas na Tabela 11 foram testadas. Na Figura 23 é possível ver como as amostras de validação se classificam perante esse modelo que apenas considera os valores do teor de linalol.



**Figura 23.** Gráfico de validação de análise univariada em relação ao teor de linalol das amostras de OE de pau-rosa. (Vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (Verde) amostras não autênticas.

Ao observar o gráfico de validação do modelo univariado apresentado na Figura 23, nota-se um grupo de amostras não autênticas que, pelo teor de linalol, se classificam como autênticas. Em específico, as amostras com numeração entre 90 e 100 são referentes as amostras da marca U22 que possuem uma média de teor de linalol de 73%. Todas as amostras dessa marca possuem altos teores de linalol, uma vez que é observado um baixo CV dentro da própria marca (3,86%). Pelas análises de CG-EM, Pastore e colaboradores mostram que, além dos óleos dessa marca não possuem um perfil químico que coincida com 70% do perfil químico dos OE de pau-rosa (Pastore, et al., 2022), uma alta concentração de limoneno, um terpeno que não faz parte do perfil químico do OE da espécie *Aniba rosiodora*, é detectado.

Outra amostra que é classificada erroneamente na Figura 23 é a amostra LPF 58-1 da marca U24, é uma amostra não autêntica com alto teor de linalol e portanto, usando apenas o teor de linalol das amostras, essa seria classificada como autêntica. No trabalho de Pastore et al. essa amostra era classificada como autêntica devido ao alto teor de linalol. Contudo, por sua composição química observada no CG-EM em conjunto com os espectros de RMN apresentar sinais quase unicamente de linalol, supõe que essa amostra

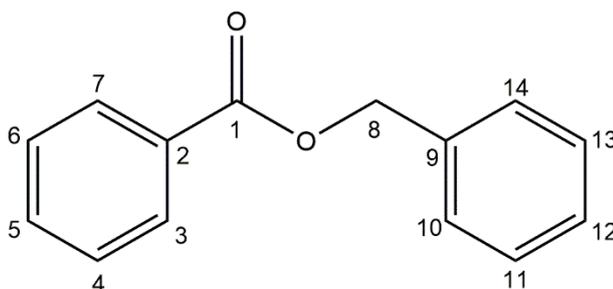
mais se assemelha a uma amostra de linalol sintético, sendo portanto um OE não autêntico.

Após todas essas análises avaliando ao teor de linalol, é possível constatar que embora o linalol seja o componente majoritário e mais importante dos OE de pau-rosa autênticos, somente essa variável não é capaz de classificar os OE de pau-rosa como autênticos ou não autênticos.

Com essa conclusão, buscou-se então um composto minoritário do OE de pau-rosa que esteja presente no perfil químico identificado pela técnica de CG-EM e proposto no trabalho de Pastore e colaboradores (2022) e que fosse possível caracterizá-lo e quantificá-lo por meio da técnica de RMN.

### 5.5. Caracterização do benzoato de benzila por RMN bidimensional

Após análise dos resultados obtidos por CG-EM tanto pelo trabalho feito por Pastore e colaboradores (2022) quanto pelos cromatogramas obtidos no decorrer desse trabalho, observou-se a presença do composto minoritário benzoato de benzila, cuja estrutura está apresentada na Figura 24, no OE da espécie *Aniba rosiodora*.



**Figura 24.** Estrutura com carbonos enumerados do benzoato de benzila.

Da mesma forma que foi feita a caracterização do linalol pelos experimentos bidimensionais de RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC e  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Anexo C) com uma das amostras autênticas, os mesmos espectros foram usados para atribuir os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  pertencentes ao benzoato de benzila (Figura 24). Na Tabela 12 se encontram os sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  que caracterizam o benzoato de benzila e os sinais de correlação que os espectros forneceram.

**Tabela 12.** Atribuição dos sinais de benzoato de benzila e comparação com os dados da literatura (Mou, et al., 2017; Hassan e Mossa, 1981).

	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	HMBC	COSY	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) lit.	$\delta^1\text{H}$ (ppm) lit.
1	166,5 <sup>f</sup>	-	-	-	165,6	-
2	130,1	-	-	-	130,3	-
3	129,7	8,07 (m)	1, 4, 5	7,43	129,6	8,06
4	128,4	7,43 (m)	2, 5	7,55	128,2	7,27 – 7,43
5	133,1	7,55 (m)			132,6	7,46 – 7,51
6	Quimicamente equivalente ao 4					
7	Quimicamente equivalente ao 3					
8	66,7	5,36 (s)	1, 9, 10		66,4	5,33
9	136,0	-	-	-	136,3	-
10	128,4	7,44 (m)	12	7,38	128,4	7,27 – 7,43
11	128,6	7,38 (m)	9, 12		128,0	7,27 – 7,43
12	128,2	7,34 (m)			129,0	7,27 – 7,43
13	Quimicamente equivalente ao 11					
14	Quimicamente equivalente ao 10					

f – sinal fraco

Embora o benzoato de benzila seja um composto minoritário presente nas amostras de OE de pau-rosa autênticas e que poderia ser considerado como um marcador, a adulteração de óleos pela adição desse composto seria fácil. Além disso, nesse trabalho, o benzoato de benzila não foi quantificado uma vez que não seria possível, nesse momento, validar sua quantificação. Assim, com o objetivo de criar um modelo que fosse capaz de considerar as informações de perfil químico do OE de pau-rosa avaliadas nesse trabalho, propôs-se relacionar a área de sinal do linalol com a área de um sinal do benzoato de benzila e criar um modelo através da proporção entre esses dois compostos.

Para isso, o sinal escolhido para o linalol foi o sinal de RMN de  $^1\text{H}$  em 5,90 ppm, o mesmo utilizado para a quantificação desse composto e que corresponde a 1 hidrogênio na sua estrutura (H2). Para o benzoato de benzila foi escolhido o sinal de RMN de  $^1\text{H}$  em 8,07 ppm, que corresponde a 2 hidrogênios em sua estrutura (H3 e H7) e está em uma região sem sobreposição de sinais. Para cada amostra foi calculado a relação S/R do sinal escolhido, para avaliar se seria possível usar a área do sinal nessa relação de proporção. Quanto ao linalol, já foi mencionado que as marcas U7, U16 e U19 não podem ser quantificadas por RMNq, uma vez que o teor de linalol está abaixo do LQ para a técnica. Em relação ao benzoato de benzila, as marcas que possuem S/R abaixo da relação de 10:1 são: U2, U6, U7, U8, U10

(amostras LPF 17, 18, 20 e 22), U13, U14, U15, U16, U17, U18, U19, U20, U21, U22 e U23 (amostra LPF 42-8). Dessas marcas, as únicas em que o sinal do benzoato de benzila é detectável, são: U20 e U23.

Fazendo a razão de área do linalol ( $A_{\text{linalol}}$ ) pela área do benzoato de benzila ( $A_{\text{benzoato de benzila}}$ ), levando em conta a quantidade de hidrogênios que cada área corresponde, obteve-se a Equação 12:

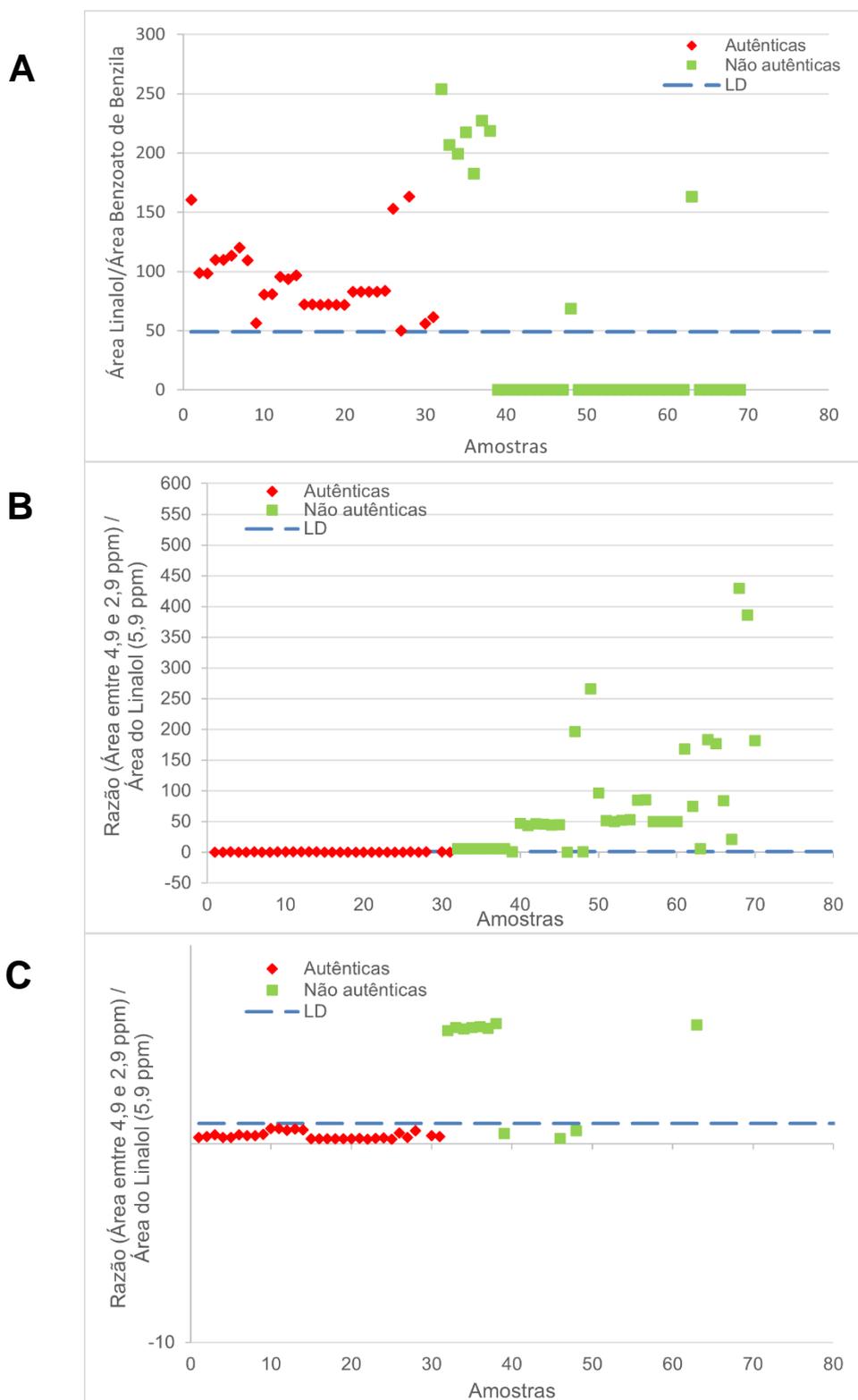
$$\text{razão de áreas} = \frac{\text{Área Linalol}}{\text{Área Benzoato de Benzila}} \times \frac{2H}{1H} \quad (12)$$

Com os resultados obtidos por meio da razão de áreas, foi feito um novo modelo, dessa vez considerado uma proporcionalidade entre um composto majoritário e um composto minoritário.

Apesar do uso dos sinais de dois marcadores já aumentar a informação/representatividade do método, essa proposta não seria capaz de detectar amostras de óleos inicialmente autênticos e que foram adulterados posteriormente. Por essa razão, outra condição incluída no método foi a razão da integral da área referente a região de 4,90 a 2,90 ppm pela área do sinal do linalol em 5,90 ppm, que como visto na Figura 10, a região entre 4,90 e 2,90 ppm é uma região com pouquíssimos sinais referentes aos compostos presentes em OE autênticos e que predominam sinais intensos de adulterantes nas amostras não autênticas, podendo ser identificada como uma região que caracteriza a presença de adulterantes. Na Figura 25 está apresentado a etapa de treinamento desse novo método, na Figura 25-A mostra um limite de 49 da razão  $A_{\text{linalol}}/A_{\text{benzoato de benzila}}$ . Portanto, como primeiro critério para ser classificada como autêntica, a amostra precisa ter um teor de linalol 49 vezes maior do que o teor de benzoato de benzila. Contudo, observa-se que ainda existem algumas amostras não autênticas que se classificariam como autênticas, pois independente do teor de linalol ser alto ou baixo, ao alcançar essa proporcionalidade a amostra seria classificada como um OE autêntico da espécie *Aniba rosiodora*. Já na Figura 25B mostra um limite igual a 1,0 para a razão  $A_{\text{região entre 4,90 e 2,90 ppm}}/A_{\text{linalol (5,90 ppm)}}$ . Ou seja, caso a região entre 4,90 e 2,90 ppm da amostra tenha área absoluta até 1,0 vez a área do sinal do linalol

em 5,90 ppm a amostra cumpriria o segundo critério para ser considerada OE de pau-rosa autêntico. Nota-se na Figura 25C, que se refere ao zoom da Figura 25B que apenas essa condição também não se mostra suficiente para classificar todos os OE de pau-rosa, visto que podem ter adulterantes que não possuem sinais nessa região.

Outro ponto que vale destacar é que as amostras dos OE de pau-rosa que obtiveram área de benzoato de benzila igual a zero, a proporção foi considerada como zero, visto que uma divisão por zero tenderia a infinito. Essa consideração foi feita porque na condição proposta, se os dois compostos não estiverem presentes a amostra não é considerada autêntica.

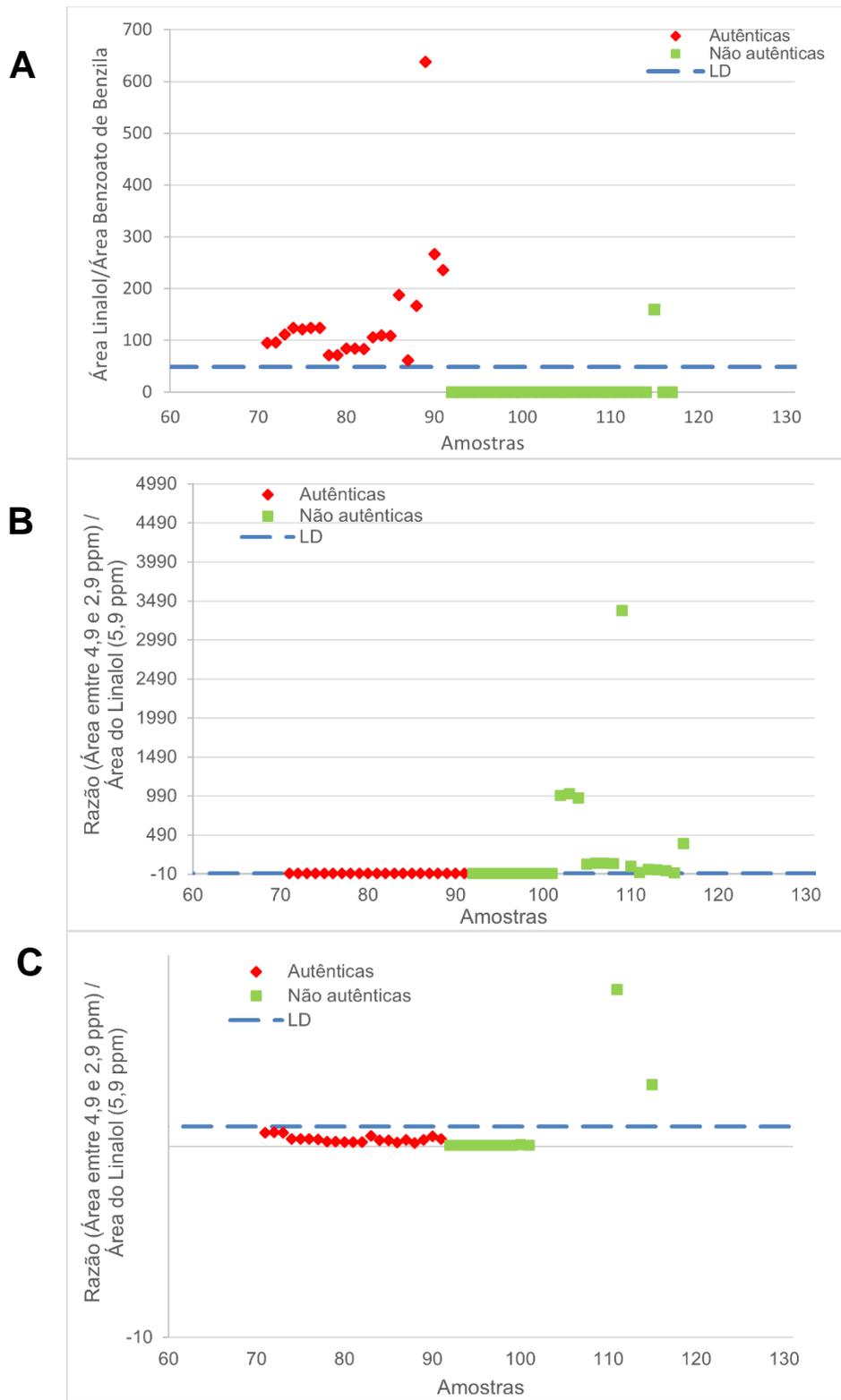


**Figura 25.** Gráfico de treinamento de análise univariada em relação a razão das áreas dos sinais do linalol (5,90 ppm) e do benzoato de benzila (8,07 ppm) das amostras de OE de pau-rosa **(A)**. Gráfico de treinamento de análise univariada em relação a razão da área da região entre 4,90 e 2,90 ppm e da área do sinal do linalol (5,90 ppm) das amostras de OE de pau-rosa **(B)**. Zoom do gráfico apresentado em B **(C)** (Vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (Verde) amostras não autênticas.

Além disso, pode-se colocar um limite máximo da proporção entre as áreas, pois um mínimo de benzoato de benzila poderia ser adicionado a uma amostra de alta concentração de linalol e existiria uma razão aceita. Observando o gráfico da Figura 25A, todas as amostras autênticas de OE de pau-rosa possuem a razão  $A_{\text{linalol}}/A_{\text{benzoato de benzila}}$  abaixo de 200.

Ao se combinar os dois critérios apresentados na Figura 25, apenas uma amostra é classificada erroneamente, que é a LPF-19 (marca U10). Além de estar entre os limites da razão das áreas do linalol e do benzoato de benzila, essa amostra possui uma razão das áreas entre 4,90 e 2,90 e área do sinal do linalol (5,90 ppm) abaixo de 1,0 e ainda tem teor de linalol acima de 54,6%, dessa forma, essas condições combinadas ainda não são capazes de classificar corretamente essa amostra.

Após essas observações na fase de treinamento, foi construído o gráfico de validação (Figura 26). Nesse gráfico, as amostras que são oriundas do Peru também foram inseridas para observar uma possível semelhança ou diferença quando comparadas com as amostras de origem do Brasil.



**Figura 26.** Gráfico de validação da análise univariada em relação a razão das áreas dos sinais do linalol (5,9 ppm) e do benzoato de benzila (8,07 ppm) das amostras de OE de pau-rosa (**A**). Gráfico de validação de análise univariada em relação a área da região entre 4,90 e 2,90 ppm das amostras de OE de pau-rosa (**B**). Zoom do gráfico apresentado em B (**C**) (Vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (Verde) amostras não autênticas.

Analisando o gráfico de validação obtido é possível observar que 3 amostras autênticas apresentam relação  $A_{\text{linalol}}/A_{\text{benzoato de benzila}}$  em valores um pouco fora do comportamento das demais (acima da 200) (Figura 26-A). Entretanto, ao avaliar quais são essas amostras, verifica-se que essas são as amostras originadas do Peru e que, portanto, podem possuir alguma variabilidade no perfil químico devido a mudança de região ou origem quando comparadas às originadas do Brasil.

Observando os gráficos da Figura 26 percebemos que os dois critérios se complementam de forma bastante interessante, pois somados permitem a classificação correta de todas as amostras de validação. O único erro observado é o já comentado da amostra de treinamento da marca U10 (LPF-19).

Dessa forma, a proposta de usar as duas condições, sendo: obedecer a razão de  $A_{\text{linalol}}/A_{\text{benzoato de benzila}}$  acima de 49 e a razão  $A_{\text{região}}$  entre 4,90 e 2,90 ppm /  $A_{\text{linalol}}$  (5,90 ppm) abaixo de 1,0, se mostrou uma proposta simples e com ótimos resultados.

## 5.6. PLS-DA como modelo de classificação

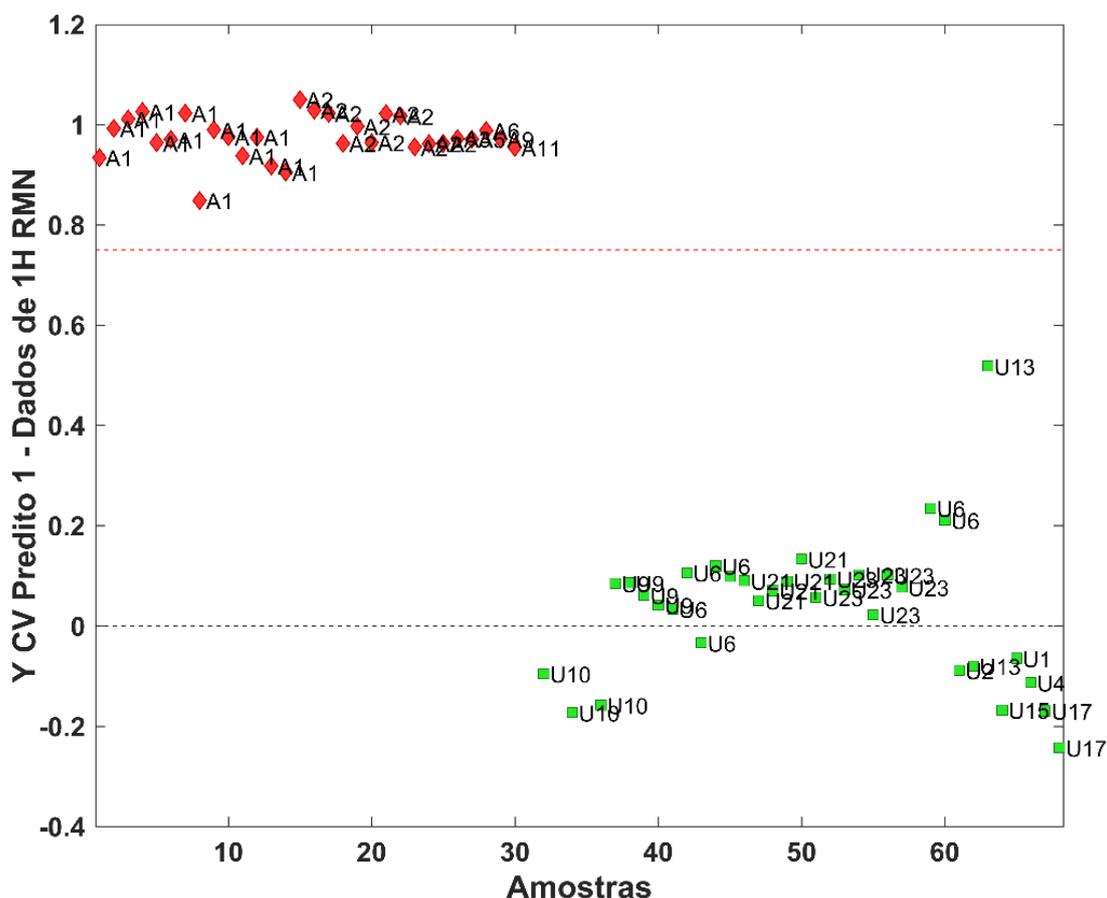
Uma questão que permanece é se um método multivariado baseado na seleção de uma região espectral ou espectro inteiro também apresentaria bons resultados de classificação. Para responder a essa questão um modelo de classificação/discriminação baseado no espectro inteiro dos OE e não apenas os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  do linalol ou benzoato de benzila foi desenvolvido utilizando PLS-DA.

As amostras foram separadas em grupos de treinamento e validação da mesma forma como descrito na Tabela 11. O modelo de treinamento obteve os mesmos *outliers* que foram encontrados na análise univariada do teor de linalol, e como já justificado, esses *outliers* foram removidos do treinamento.

O número de Variáveis Latentes (VL) do modelo pode ser determinado através da sensibilidade e seletividade do método, que levam em conta os valores de Verdadeiros Positivos (VP) e Verdadeiros Negativos (VN); Falsos

Positivos (FP) e Falsos Negativos (FN). Com a remoção dos *outliers*, a sensibilidade e seletividade do método atingiram 100% já com 2 VL.

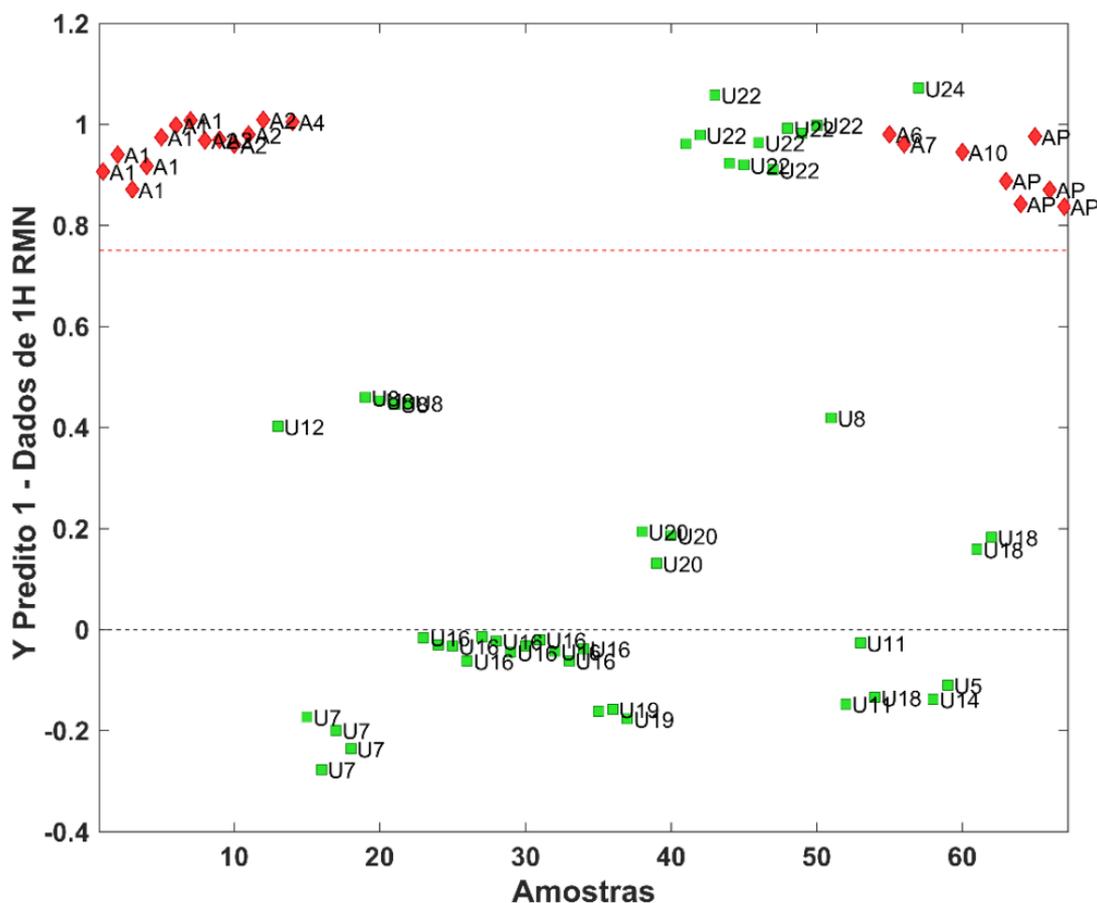
A Figura 27 mostra o gráfico do método PLS-DA da fase de treinamento com 2 VL modelando as classes de óleos autênticos e não autênticos. É possível observar que as amostras autênticas estão mais agrupadas e próximas umas das outras independente das marcas, o que indica uma maior similaridade entre elas. Já as amostras não autênticas estão mais dispersas, mostrando que há uma maior variabilidade entre elas, inclusive que entre elas possuem diferentes adulterantes, como foi visto no CG-EM e confirmado nos espectros de RMN, como é o caso das amostras da marca U3 e U23 apresentadas no Anexo E e F.



**Figura 27.** Gráfico de treinamento de análise multivariada com PLS-DA. (A, vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (U, verde) amostras não autênticas.

A Figura 28 apresenta o gráfico de validação. Pode observar-se que as amostras do Peru (AP) são classificadas como autênticas. Porém, as amostras de marca U22 e U24, que são marcas não autênticas, foram classificadas

como autênticas. Essas são as mesmas marcas que foram classificadas como autênticas no método univariado utilizando apenas o teor de linalol. Logo, pode-se constatar que no método multivariado de classificação por PLS-DA a variável que mais contribui para a classificação das amostras também é o teor de linalol.



**Figura 28.** Gráfico de validação de análise multivariada com PLS-DA. (A, vermelho) amostras de OE de pau-rosa autênticas e (U, verde) amostras não autênticas.

Além de levar muito em conta o teor de linalol, o treinamento dos dados não abrangeu os possíveis adulterantes do OE de pau-rosa, não modelando então todas as adulterações possíveis. Por exemplo, como dito anteriormente, as amostras da marca U22 possuem limoneno em sua composição e, possivelmente, essa adulteração ou mistura de óleos não foi prevista no treinamento do modelo uma vez que essa marca foi classificada com perfil semelhante ao perfil das amostras autênticas, mesmo tendo um adulterante não presente no treinamento. A marca U24, como descrito anteriormente, possivelmente é composta apenas por linalol sintético, corroborando com a

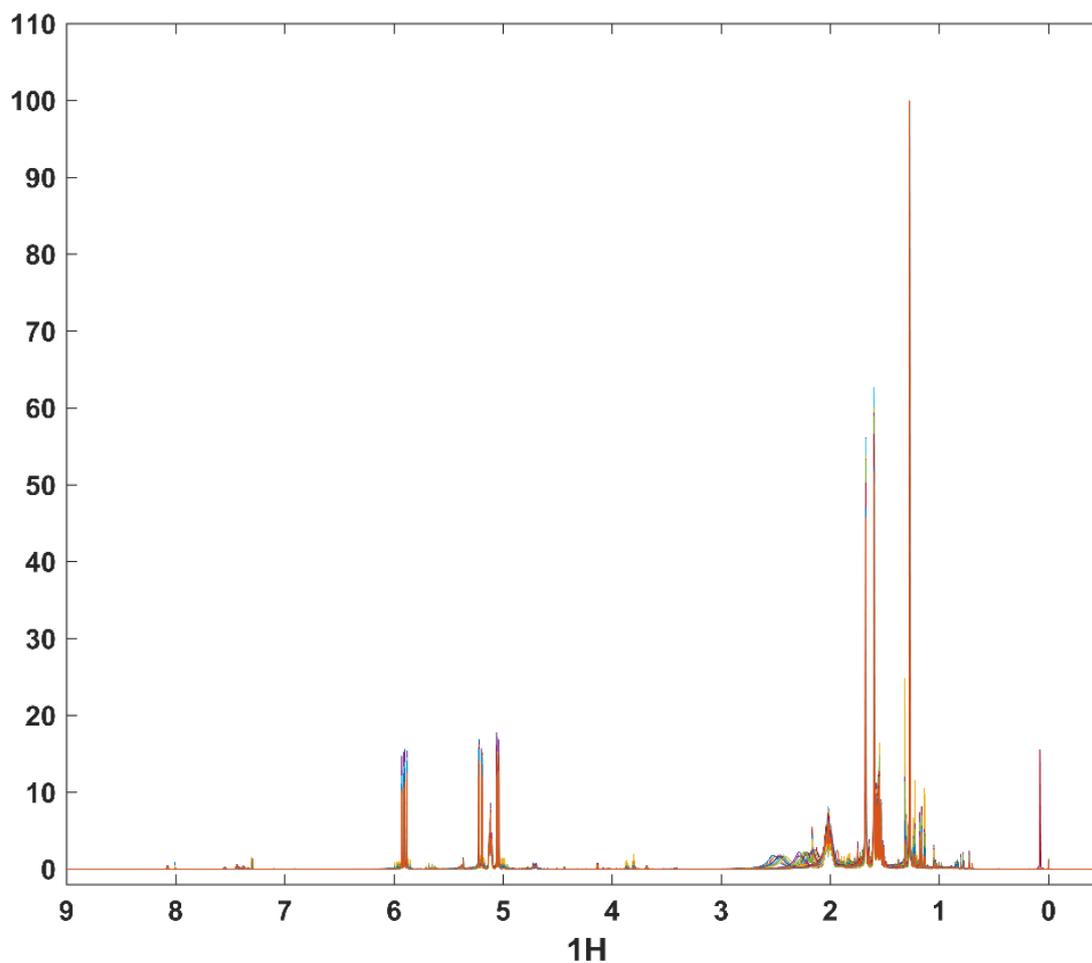
análise de que o método multivariado leva mais em consideração o teor de linalol na classificação das amostras.

Portanto, observa-se que o método multivariado simples, que combina a razão de áreas dos critérios de  $A_{\text{linalol}}/A_{\text{benzoato de benzila}}$  acima de 49 e uma razão inferior a 1 de  $A_{\text{região entre 4,90 e 2,90 ppm}}/A_{\text{linalol (5,90 ppm)}}$ , se mostrou mais adequado e eficaz para a classificação das amostras de OE de pau-rosa, por apresentar apenas um erro na classificação, enquanto ao usar o método multivariado por PLS-DA, 11 amostras foram classificadas erradas na validação do método.

### **5.7. Análise das amostras autênticas com as amostras do Peru**

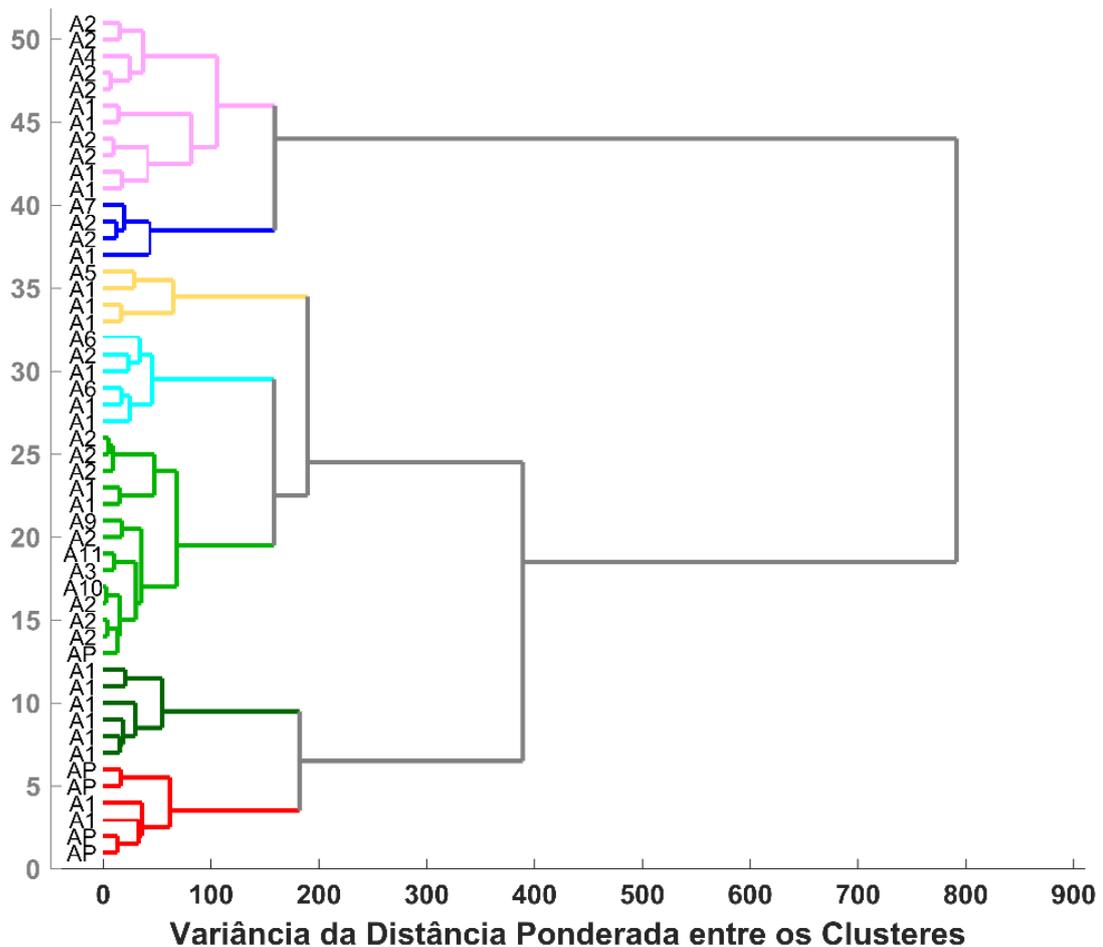
No Peru, o plantio da espécie *Aniba rosiodora* é feito para fins de extração e comércio do OE de pau-rosa. A extração do óleo é realizada em árvores jovens e o OE é obtido de todas as partes da planta, sendo atestado como OE de pau-rosa autêntico. Nessa parte do trabalho, as 5 amostras de OE de pau-rosa do Peru foram utilizadas para avaliar como elas se comportam quando comparadas com as amostras autênticas extraídas e adquiridas no Brasil e se existe alguma variável capaz de distinguir esses OE.

Na Figura 29 estão apresentados os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  sobrepostos de todas as amostras de OE de pau-rosa autênticas, inclusive as amostras do Peru. É possível observar uma alta sobreposição de sinais, em particular dos sinais de maior intensidade.



**Figura 29.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das amostras autênticas de OE de pau-rosa, inclusive as amostras obtidas do Peru.

Para analisar possíveis agrupamentos devido a similaridades das amostras autênticas e como as amostras do Peru se comportam frente às amostras autênticas do Brasil, foi obtido um dendrograma com a análise de HCA (Figura 30).



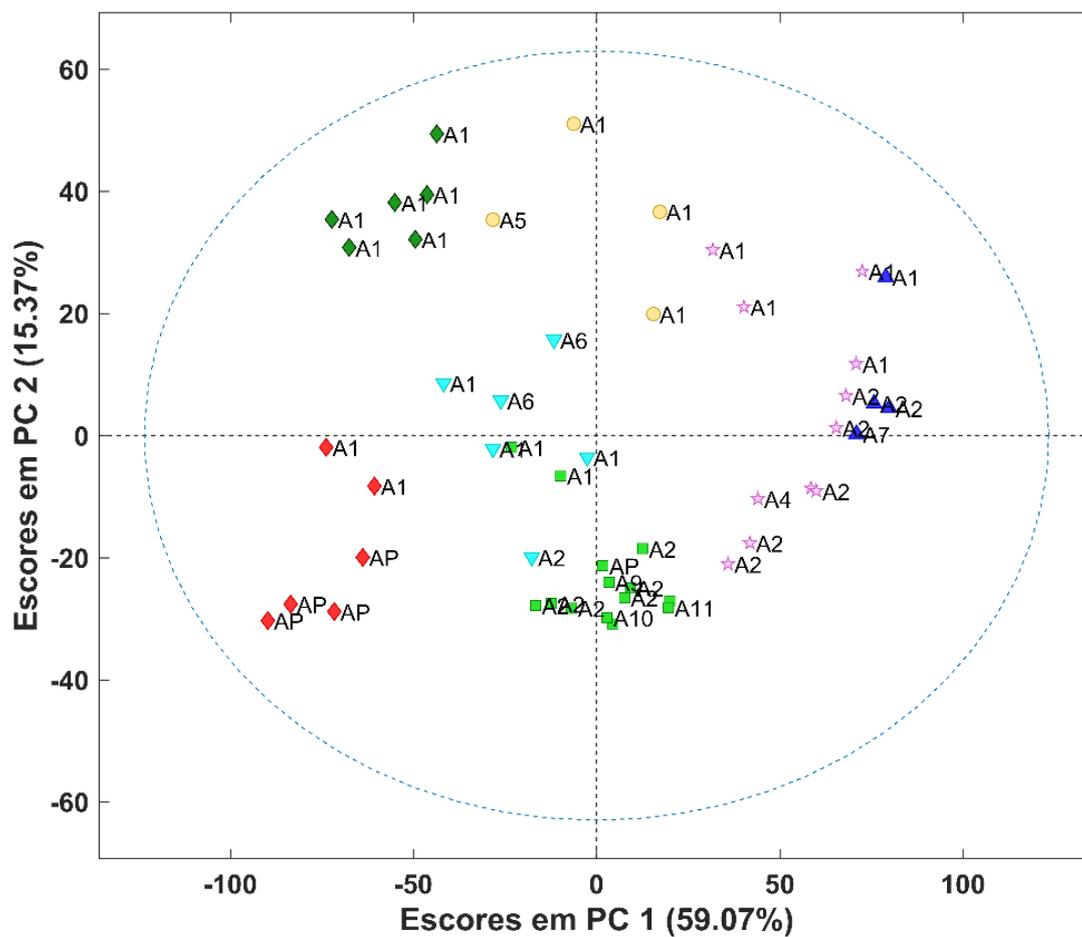
**Figura 30.** Dendrograma da Análise Hierárquica de Clusters (HCA) para amostras de OE de pau-rosa autênticos. A1-11 são amostras do Brasil e AP são amostras do Peru.

A Figura 30 apresenta os agrupamentos formados entre as amostras autênticas. A partir desse resultado é possível observar maiores diferenças dentro das amostras da marca A1 e A2, que são as marcas de maior número de amostras. Além disso, as amostras da marca A1, que são as amostras adquiridas da Indústria MAGALDI (marca certificada e com autorização para exportação pela CITES), são as amostras que apresentam maior dispersão no dendrograma e estão presente em todos os agrupamentos. Portanto, as amostras de marca A1 são as amostras que possuem maiores diferenças entre si. Uma possível explicação é a variação entre lotes, uma vez que essa indústria realiza o processamento de folhas, galhos e eventualmente madeira dependendo dos lotes. As amostras da marca A5 e A6 são as amostras que apresentam uma maior similaridade com amostras da marca A1. Importante também destacar que as amostras provenientes do Peru (AP) se agrupam com duas amostras de marca A1 (agrupamento em vermelho).

Já as marcas A3, A9, A10 e A11 possuem uma maior similaridade com as amostras da marca A2. Nesse agrupamento (verde claro) também são observadas algumas amostras da marca A1 e uma amostra do Peru (AP). A amostra A7 está agrupada com duas amostras da marca A2 e uma amostra da marca A1 (agrupamento em azul escuro).

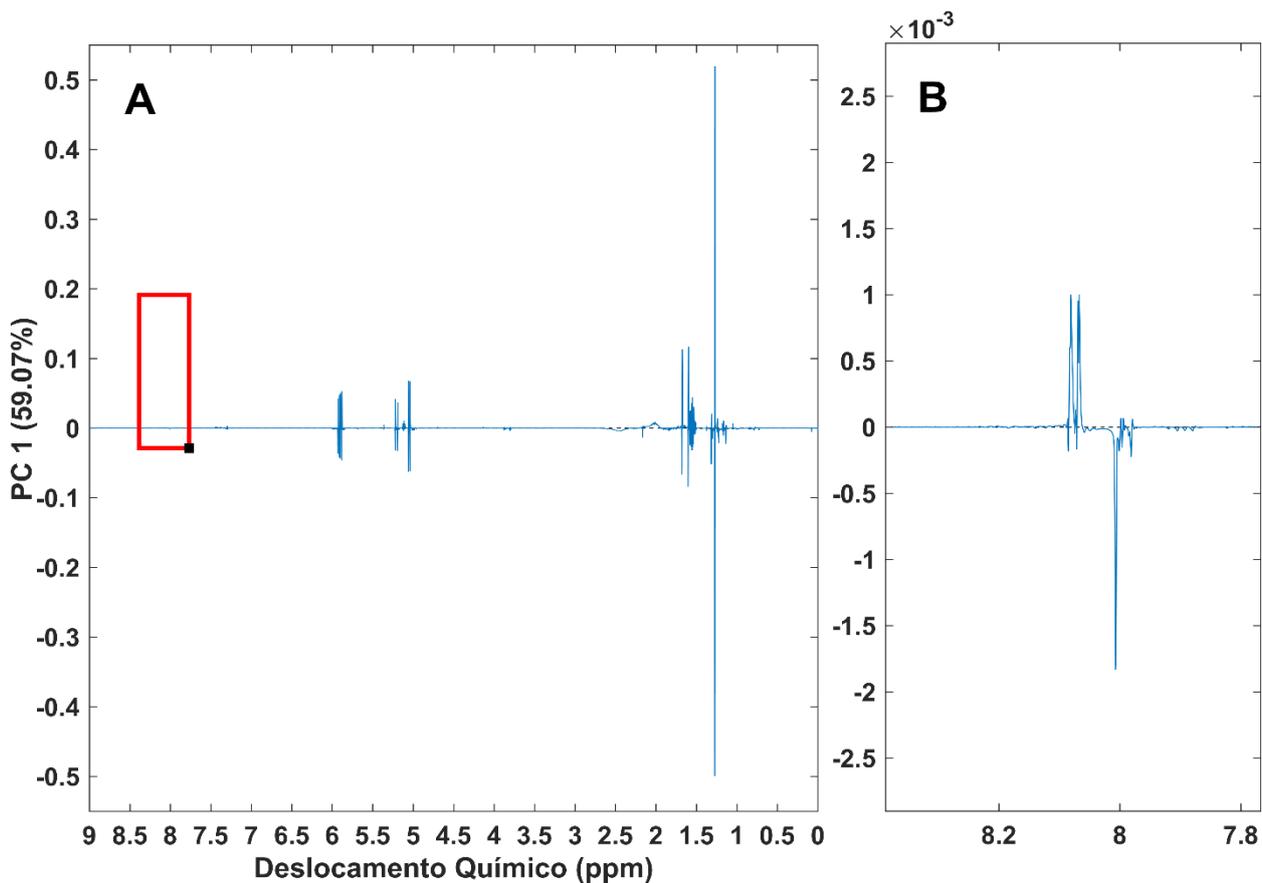
Após as observações feitas pela análise dos dendrogramas de HCA, foram realizadas análises de PCA, para analisar se era possível identificar pelos pesos de cada componente principal os principais compostos responsáveis pelo agrupamento das amostras.

Foram feitas as análises de PCA com os dados de RMN de  $^1\text{H}$ . Na Figura 31 está representado o gráfico de PC1xPC2, ou seja, as duas primeiras componentes principais, que juntas explicam 74,44% da variância entre as amostras. Destaca-se que as cores e símbolos apresentados na figura se referem aos clusteres identificados no dendrograma da Figura 30. Nos escores da PC1, observa-se principalmente o agrupamento das amostras do Peru em escores mais negativos ( $<-40$ ) juntamente com a maioria das amostras da marca A1 (amostras representadas por losangos vermelhos e verde escuro). As demais amostras da marca A1 apresentam uma dispersão ao longo da PC1. Já na informação de apenas de PC2, o que se observa de mais nítido é a separação da maioria das amostras da classe A1 em escores positivos. A presença dos clusteres observados no dendrograma é mais percebida com a observação conjunta das informações de PC1 e PC2 (resultado do gráfico bidimensional da Figura 31). Juntando as duas PCs se observa que 4 das amostras do Peru se agrupam com escores negativos de PC1 e PC2 e que apenas algumas amostras da marca brasileira A1 são semelhantes.



**Figura 31.** Escores de PC1 no eixo X (59,07% de variância explicada) e PC2 no eixo Y (15,37% de variância explicada). A1-11 são amostras do Brasil e AP são amostras do Peru.

O gráfico de pesos de PC1 (Figura 32), revela as variáveis nos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  que mais influenciam para a separação que é observada no gráfico da Figura 31.



**Figura 32.** Gráfico de pesos da PC1 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  somente das amostras autênticas e do Peru com pré-processamento *mean center*. A região destacada em vermelho indica o sinal do benzoato de benzila em 8,07 ppm (A). Ampliação da região destacada (B).

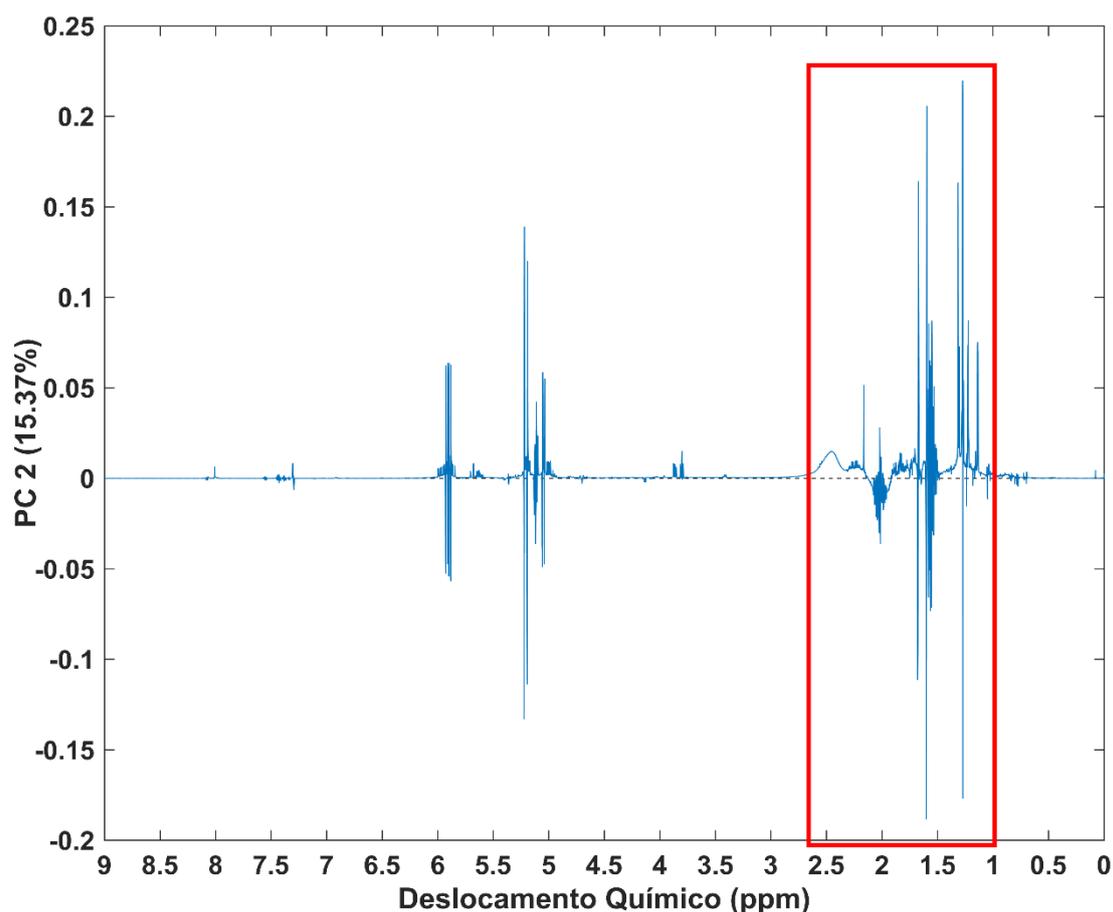
Em escores negativos estão os sinais que mais influenciam no agrupamento das amostras do Peru com algumas amostras da marca A1, sendo os sinais mais intensos e, conseqüentemente, que mais contribuem para o agrupamento, os sinais em: 1,68 ppm; 1,60 ppm 1,31 ppm; 1,27 ppm; 1,22 ppm e 1,14 ppm. Outros sinais, menos intensos, mas que também contribuem para a diferenciação dessas amostras são: 8,00 ppm; 7,30 ppm; 5,60 a 5,70 ppm; 5,20 ppm; 5,17 ppm; 4,98 a 5,02 ppm; 3,79 a 3,88 ppm; 2,45 ppm (banda larga); 2,16 ppm; 1,74 a 1,94 ppm; 1,68 ppm; 1,38 a 1,60 ppm; 1,31 ppm; 1,30 ppm; 1,27 ppm; 1,18 a 1,23 ppm; 1,13 a 1,16 ppm; 1,00 ppm; 0,85 ppm; 0,84 ppm; 0,80 ppm; 0,79 ppm; 0,72 ppm.

Já os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  que mais contribuem para o agrupamento que é observado nos escores positivos de PC1 são os sinais em: 1,67 ppm; 1,59 ppm; 1,31 ppm e 1,27 ppm. Além desses, os sinais de menor intensidade, mas que ainda assim contribuem para essa separação das amostras são: 8,07 ppm; 7,33 a 7,50 ppm; 7,30 ppm; 7,55 ppm; 5,36 ppm; 5,09 a 5,13 ppm; 4,70

ppm; 4,14 ppm; 4,13 ppm; 1,94 a 2,16 ppm; 1,68 a 1,74 ppm; 1,51 a 1,67 ppm; 1,37 ppm; 1,31 ppm; 1,27 ppm; 1,24 ppm; 1,18 ppm; 1,16 ppm; 1,13 ppm; 1,05 ppm; 0,83 ppm; 0,77 ppm; 0,72 ppm; 0,70 ppm.

Assim, os sinais do linalol acima de 5,00 ppm são observados tanto em escores positivos quanto negativos no gráfico de pesos de PC1. Os sinais entre 1,00 e 2,00 ppm, que é uma região referente a metilas, metilenos e metinas e de grande sobreposição de sinais, também influenciam em escores negativos e positivos no gráfico de pesos de PC1.

Além das informações extraídas do gráfico de pesos da primeira componente principal, os sinais que mais influenciam nos agrupamentos observados na PC2 puderam ser analisados através do gráfico de pesos da PC2 (Figura 33).

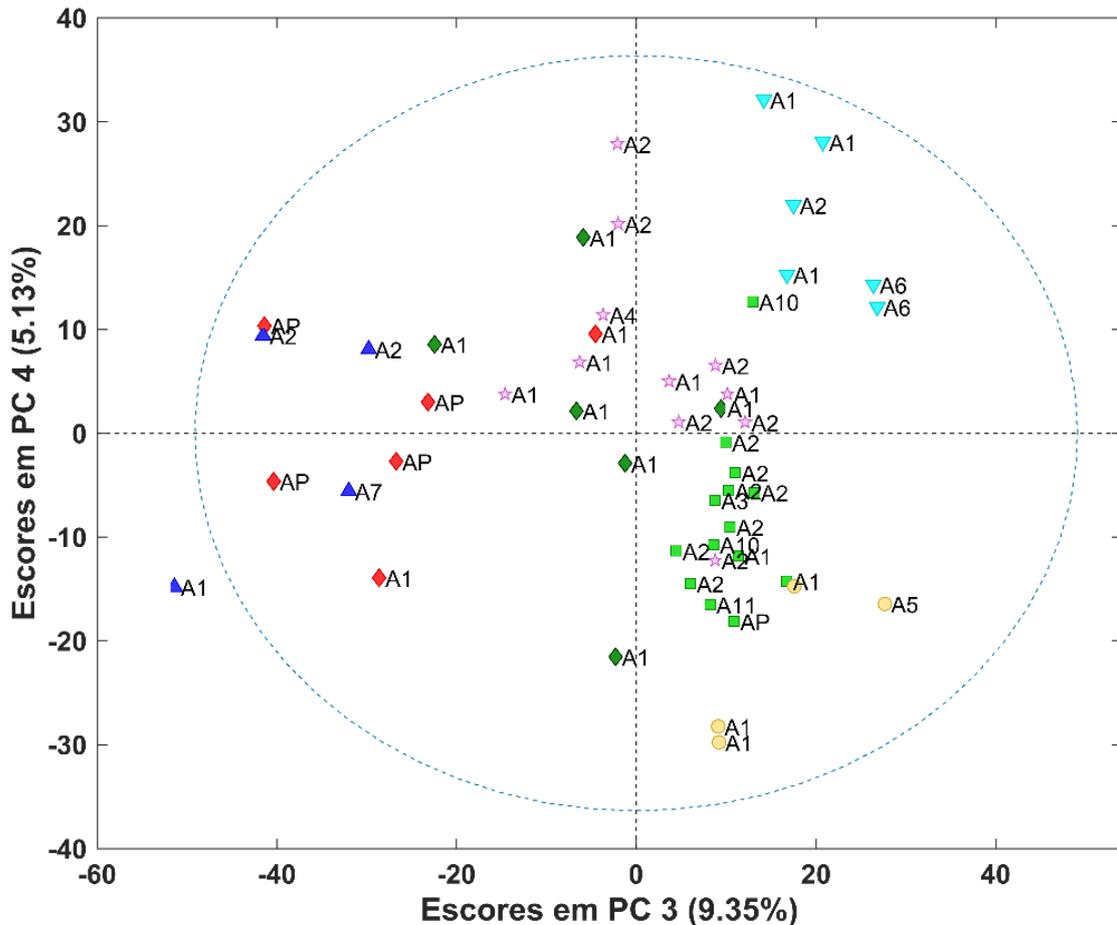


**Figura 33.** Gráfico de pesos da PC2 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  somente das amostras autênticas e do *Peu* com pré-processamento *mean center*. Destaque em vermelho da região em que estão as variáveis mais influentes que diferenciam as amostras em PC2.

Na Figura 33 pode-se destacar que os sinais mais intensos e que mais contribuem nos escores positivos são: 2,16 ppm; 2,45 ppm (banda larga); 2,02 ppm; 1,67 ppm; 1,50 a 1,59 ppm; 1,31 ppm; 1,27 ppm; 1,22 ppm; 1,14 ppm. Os demais sinais que também contribuem para os escores positivos de PC2, mas com menor intensidade, são: 8,00 ppm; 7,30 ppm; 5,59 a 5,70 ppm; 4,93 a 5,01 ppm; 3,86 ppm; 3,80 ppm; 3,41 ppm; 2,14 a 2,3 ppm; 1,68 a 1,91 ppm; 1,62 ppm; 0,85 a 1,05 ppm; 0,72 ppm; 0,69 ppm. Em escores negativos, os sinais que mais influenciam nas amostras do Peru são: 1,96 a 2,07 ppm; 1,68 ppm; 1,60 ppm; 1,51 a 1,58 ppm; 1,27 ppm; 1,24 ppm; 1,05 ppm. Os sinais de menor intensidade, mas que também contribuem são: 8,07 ppm; 7,29 ppm; 5,36 ppm; 4,70 ppm; 4,13 ppm; 1,18 ppm; 0,80 ppm; 0,79 ppm; 0,77 ppm; 0,70 ppm.

Observa-se que alguns sinais apresentam valores de deslocamento químico iguais ou muito próximos para escores positivos e negativos, isso se deve ao fato de que esses sinais estão em regiões de muita sobreposição, mas são referentes a hidrogênios diferentes. Os sinais do linalol acima de 5,00 ppm também influenciam tanto em escores positivos quanto negativos de PC2.

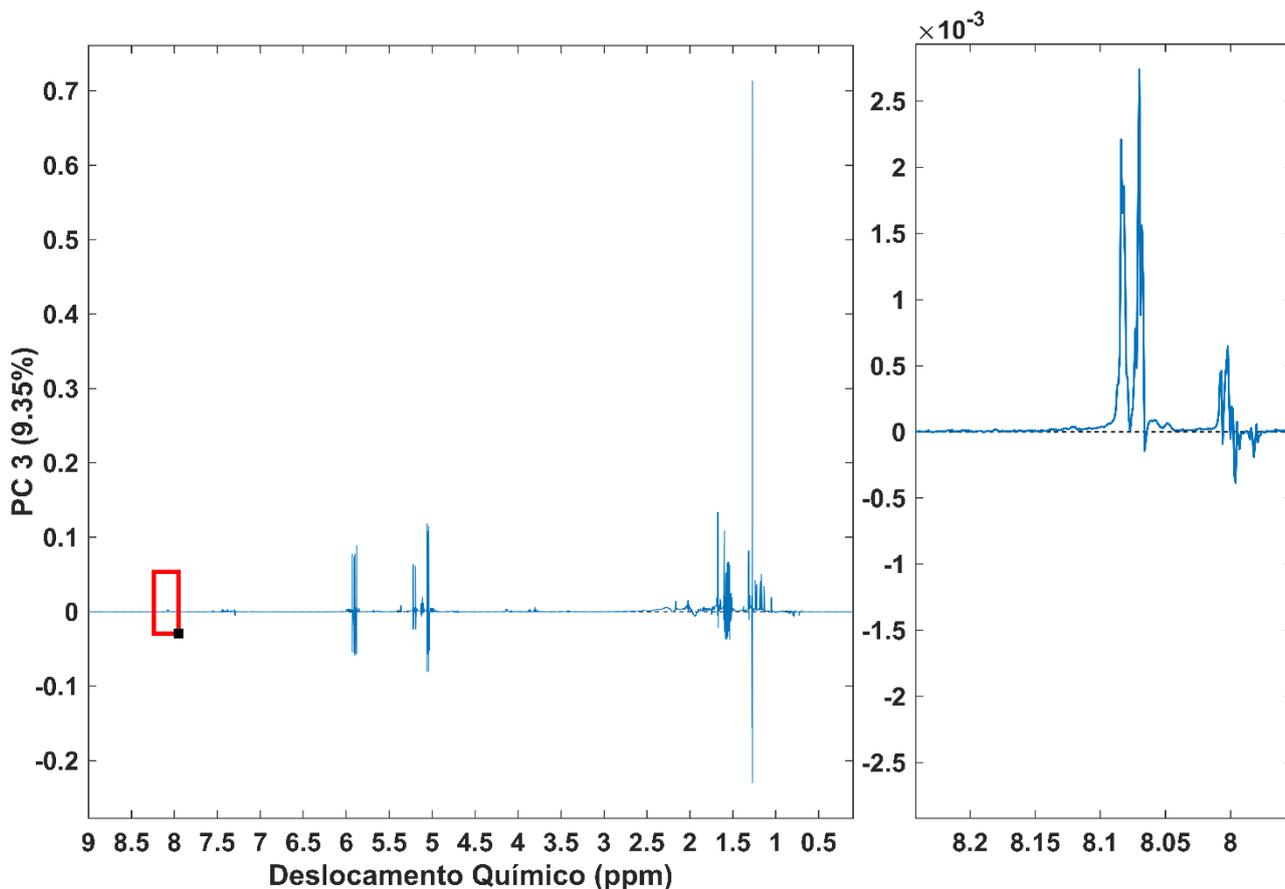
Da mesma forma que foram analisadas as PC's 1 e 2, também foram analisadas as PC3 e PC4, que somadas explicam 14,48% da variância entre as amostras. Na Figura 34, o gráfico de PC3xPC4 revela algumas informações diferentes de PC1 e PC2. Em PC3, a maior diferença observada é que em escores negativos estão as amostras do Peru agrupadas às amostras que em PC1 e PC2 estavam sendo diferenciadas (triângulos azuis escuros). Em escores positivos está um grupo de amostras da marca A1 (triângulo invertido azul claro), que anteriormente estavam agrupadas com as amostras do Peru em PC1 e PC2. Portanto, essa componente principal (PC3) leva em conta variáveis que distinguem essas amostras antes não distinguidas.



**Figura 34.** Escores de PC3 no eixo X (9,35% de variância explicada) e PC4 no eixo Y (5,13% de variância explicada). A1-11 são amostras do Brasil e AP são amostras do Peru.

Já a PC4 pode revelar variáveis que expliquem semelhanças na composição de algumas amostras de marcas distintas. Mas os principais agrupamentos diferenciados são os de triângulo invertido em azul claro que estão em escores positivos de PC4 e o agrupamento representado pelos círculos amarelos em escores negativos de PC4. Os demais agrupamentos estão mais dispersos nos escores positivos e negativos.

No gráfico de pesos da PC3 (Figura 35), os valores de escores negativos são os que mais influenciam nas amostras do Peru. Os sinais mais intensos que contribuem para esse resultado são: 1,67 ppm; 1,51 a 1,60 ppm; 1,31 ppm; 1,27 ppm e os sinais menos intensos que contribuem são: 7,29 ppm; 4,72 ppm; 4,69 ppm; 1,91 a 1,97 ppm; 1,00 ppm; 0,85 ppm; 0,84 ppm; 0,82 ppm; 0,80 ppm; 0,78 ppm; 0,72 ppm.

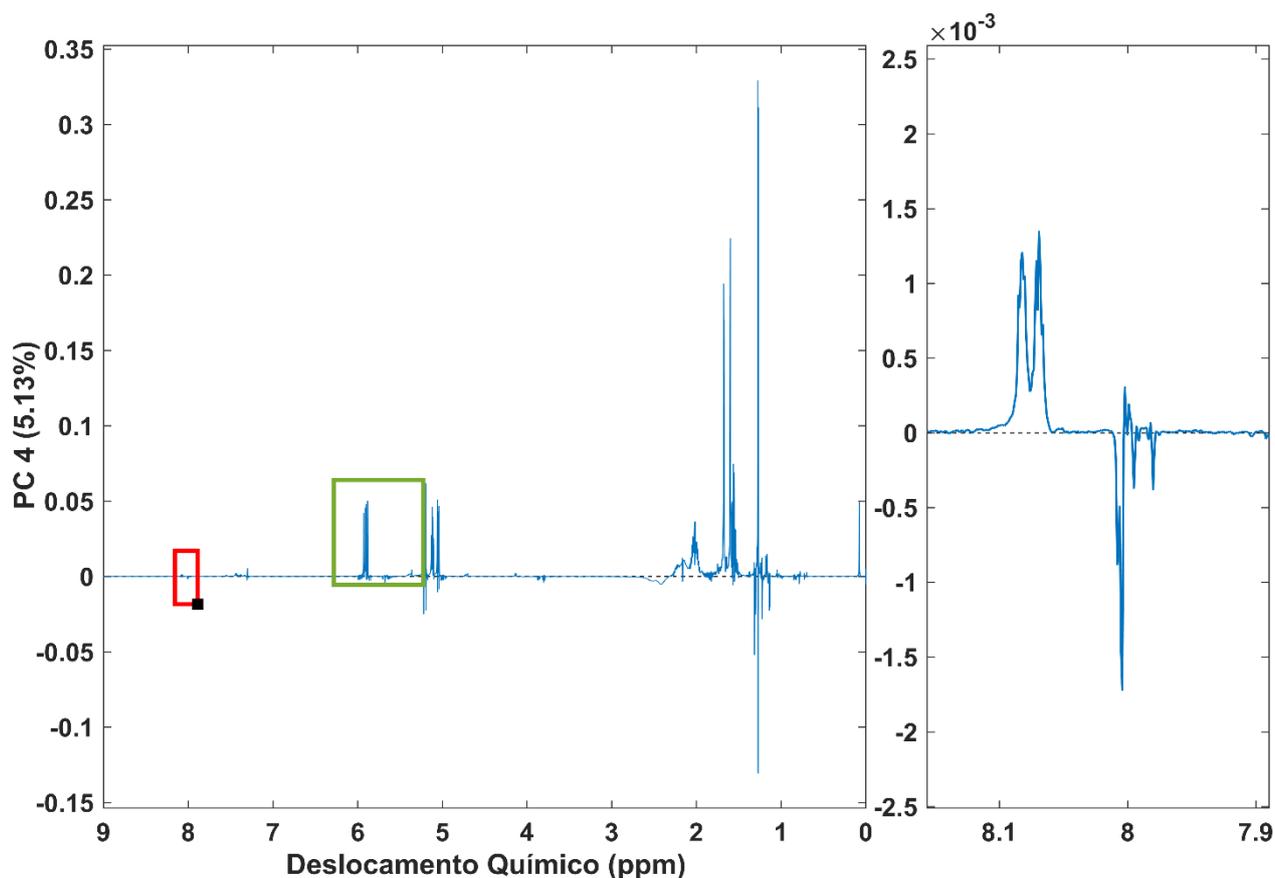


**Figura 35.** Gráfico de pesos da PC3 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  somente das amostras autênticas e do Peru com pré-processamento *mean center*. As regiões destacadas em vermelho indicam o sinal do benzoato de benzila em 8,07 ppm (A). Ampliação da região destacada (B).

Já os sinais com valores de escores positivos são os que diferenciam as demais amostras em relação às amostras do Peru, ou seja, são sinais que são menos predominantes nessas amostras. Esses sinais são: 1,67 ppm; 1,51 a 1,60 ppm; 1,31 ppm; 1,30 ppm; 1,28 ppm; 1,27 ppm; 1,24 ppm; 1,22 ppm; 1,18 ppm; 1,16 ppm; 1,14 ppm; 1,05 ppm. Sinais de menor influência nas amostras do Peru são: 8,07 ppm; 7,55 ppm; 7,33 a 7,45 ppm; 7,30 ppm; 5,36 a 5,41 ppm; 5,2 ppm; 5,18 ppm; 5,11 ppm; 4,98 a 5,02 ppm; 4,13 ppm; 3,86 ppm; 3,80 ppm; 2,22 a 2,61 ppm (banda larga); 1,98 a 2,18 ppm; 1,68 a 1,90 ppm; 1,64 ppm; 1,50 ppm; 1,49 ppm; 1,33 a 1,42 ppm; 0,70 ppm. Novamente, assim como observado no gráfico de pesos de PC1 e PC2, esses resultados mostram que os sinais de linalol em 5,90 ppm, são importantes para discriminar as amostras tanto em escores positivos quanto negativos.

A PC4 tem seu gráfico de pesos apresentado na Figura 36 e possui os seguintes sinais que mais influenciam em escores positivos: 5,90 ppm; 5,20

ppm; ppm; 5,11 ppm; 5,05 ppm; 1,89 a 2,29 ppm; 1,47 a 1,77 ppm, além desses mais intensos, outros que tem contribuição nos escores positivos, são: 8,07 ppm; 7,55 ppm; 7,44 ppm; 7,43 ppm; 7,38 ppm; 7,33 ppm; 7,30 ppm; 5,36 ppm; 4,70 ppm; 4,13 ppm; 1,24 ppm; 1,23 ppm; 1,18 ppm; 1,16 ppm; 1,05 ppm; 0,78 ppm; 0,70 ppm. Já os sinais mais intensos em escores negativos são: 5,22 ppm; 5,19 ppm; 1,31 ppm; 1,3 ppm; 1,27 ppm; 1,22 ppm; 1,14 ppm e sinais menos intensos em 8,00 ppm; 7,31 ppm; 5,59 a 5,70 ppm; 5,09 a 4,94 ppm; 3,87 ppm; 3,80 ppm; 2,45 ppm; 0,85 ppm; 0,84 ppm; 0,82 ppm; 0,78 ppm.



**Figura 36.** Gráfico de pesos da PC4 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  somente das amostras autênticas e do Peru com pré-processamento *mean center*. Destaque em vermelho referente a região do sinal do benzoato de benzila em 8,07 ppm e em verde região dos sinais de linalol (A). Ampliação da região destacada em vermelho (B).

Ao unir as informações dos gráficos de pesos das 4 componentes principais, nota-se que a região em que ocorre a maior diferença entre as amostras autênticas e as amostras do Peru, de modo geral, é a região entre 2,5 ppm e 1,0 ppm, principalmente nos gráficos de pesos de PC1, PC2 e PC3. Provavelmente, esses sinais referem-se a compostos minoritários. Porém, por serem sinais em uma região de grande sobreposição se torna difícil a

caracterização dos possíveis componentes. Mesmo sendo algum componente minoritário, o fato desses sinais diferenciarem as amostras demonstra a variabilidade da composição do OE de pau-rosa mesmo entre amostras de uma mesma espécie.

Outro ponto que chama a atenção é que, no gráfico de pesos de PC4, os valores de escores positivos de maior influência nos resultados são os sinais atribuídos ao linalol em 5,90 ppm; 5,20 ppm; 5,05 ppm; 2,01 ppm; 1,68 ppm; 1,60 ppm, conforme apresentados na Tabela 4. Além do linalol, em escores positivos de PC4 também estão presentes os sinais do benzoato de benzila (8,07 ppm; 7,55 ppm; 7,44 ppm; 7,43 ppm; 7,38 ppm; 7,34 ppm; 5,36 ppm), como citados na Tabela 12. Portanto, entre as variáveis que estão separando as amostras em PC4, estão o linalol e o benzoato de benzila.

Além disso, os escores positivos de PC3 também tem a influência dos sinais do benzoato de benzila. Como 4 amostras do Peru estão em escores negativos, pode-se concluir que essa substância diferencia a maioria das amostras do Brasil e do Peru. Da mesma forma, alguns sinais do benzoato de benzila em PC1 e PC2 também influenciam em escores positivos, ou seja, são sinais que contribuem menos nas amostras do Peru, ou seja, esse composto deve estar presente em menor quantidade nessas amostras.

## 6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho, o potencial da técnica de RMN associada a Quimiometria foi avaliado, em especial por meio dos métodos de HCA, PCA e PLS-DA, para a discriminação de amostras autênticas e não autênticas de OE de pau-rosa. Os resultados mostraram que os sinais de linalol, composto majoritário dos óleos extraídos da espécie *Aniba rosiodora*, é um dos fatores que mais influência a classificação do OE de pau-rosa autêntico. Por meio da técnica de RMNq de  $^1\text{H}$  foi possível quantificar o teor de linalol nas amostras e concluir que as amostras autênticas apresentam alto teor de linalol (60-78%). A partir do modelo univariado foi possível então concluir um dos fatores que pode classificar as amostras de OE de pau-rosa como autênticas é a amostra apresentar teores de linalol acima de 54,6%.

Porém, utilizar exclusivamente o teor de linalol não foi suficiente para classificar corretamente todas as amostras entre autênticas e não autênticas. Amostras das marcas U3, U10, U22 e U23, que apresentaram alto teor de linalol, são corretamente classificadas como não-autênticas apenas ao se identificar adulterações ou algum composto incomum à composição do óleo essencial (ex.: álcool benzílico ou etílico). Então, para diminuir o erro na classificação das amostras, buscou-se combinar o alto teor de linalol com a presença de algum componente minoritário do OE de pau-rosa. O método que se mostrou mais eficiente nessa classificação foi propor que a razão de áreas do linalol e do composto minoritário benzoato de benzila ( $A_{\text{linalol}}/A_{\text{benzoato de benzila}}$ ) deve ser igual ou maior que 49 e que a razão  $A_{\text{região entre 4,90 e 2,90 ppm}}/A_{\text{linalol}}$  (5,90 ppm) seja de até 1,0, dessa forma foi possível classificar as amostras entre autênticas e não autênticas. Sendo que apenas uma amostra não autêntica (LPF-19, marca U10) foi classificada como autêntica em todos os métodos de classificação proposto.

O método de quantificação de linalol em amostras de OE de pau-rosa por RMN se mostrou promissor. O método de RMNq de  $^1\text{H}$  é um método simples, que exige um preparo simplificado das amostras e não exige um padrão de referência da própria substância. Esse fato é importante principalmente no caso de padrões de amostras naturais que são mais difíceis

de aquisição e com alto valor econômico. Contudo, foi encontrado um erro sistemático ao realizar a validação das análises pelo método CG-EM. Apesar do desvio ter sido determinado e corrigido com fator de correção, pelo nosso conhecimento, essa é a primeira vez que a ocorrência desse tipo de desvio sistemático foi observada, o que merece atenção para uma investigação mais detalhada para encontrar a fonte do desvio e se isso se tratou de um artefato ou fenômeno que pode se repetir em outros tipos de amostras. As figuras de mérito permitiram concluir que o método de RMN apresenta boa exatidão e uma precisão melhor quando comparada às análises de CG-EM. Além disso, o valor de incerteza estimado em 2,3% atende aos requisitos de controle de qualidade geralmente empregados nesse setor, assim como a relação Sinal/Ruído se mostrou adequada para a detecção e quantificação do linalol em todas as amostras analisadas. Por fim, destaca-se novamente que a técnica de RMN não requer a preparação de padrões para a calibração do equipamento por meio de uma curva analítica.

Além dos métodos de classificação de amostras autênticas e não autênticas, através dessa pesquisa, também foi possível avaliar algumas diferenças entre as amostras autênticas do Brasil em relação às do Peru através da análise exploratória utilizando PCA. Essa análise sugere a maior influência da concentração de benzoato de benzila na separação das amostras do Peru, além de diferenças na região de 2,50 e 1,00 ppm, que devem ser devido a outros compostos minoritários.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUZID, S. Use of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Analysis of Fennel Essential Oil. **Natural Product Sciences**, v. 22, n. 1, p. 30-34, dez. 2016.

ALENCAR, J. C.; FERNANDES, N. P. Desenvolvimento de árvores nativas em ensaios de espécies. 1. Pau rosa (*Aniba duckei* Kostermans). **Acta Amazonica**, v. 8, n. 4, p. 523-541, dez. 1978.

ALMEIDA, N. S., et al. A Validated NMR Approach for MDMA Quantification in Ecstasy Tablets. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 9, p. 1944-1950, set. 2018.

AMAZONAS, D. R., et al. Chemical and Genotypic Variations in *Aniba rosiodora* from the Brazilian Amazon Forest. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 69, dez. 2020.

ANDREW, E. R. Nuclear Magnetic Resonance and the Brain. **Brain Topography**, v. 5, n. 2, p. 129-133, dez. 1992.

APROTOSOAIE, A. C., et al. Linalool: A Review on a Key Odorant Molecule With Biological Properties. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. 4, p. 193-219, jul. 2014.

ARAÚJO, V. C. et al. Óleos essenciais da Amazônia contendo linalol. **Acta Amazônica**, v. 1, p.45-47, 1971.

BAKKALI, F., et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, fev. 2008.

BARATA, L. E. S. A economia verde – Amazônia. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 31-35, 2012

BARDING, G. A., SALDITOS, R., LARIVE, C. K. Quantitative NMR for bioanalysis and metabolomics. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 1165-1179, jul. 2012

BARSTOW, M. 2021. *Aniba rosiodora*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2021. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-3.RLTS.T33958A88301381.en>. Acesso em: 12/11/2022.

BENEDITO L. E. C., MALDANER, A. O., OLIVEIRA, A. L. An external reference <sup>1</sup>H qNMR method (PULCON) for characterization of high purity cocaine seizures. **Analytical Methods**, v. 10, p. 489-495, fev. 2018.

BERTRAM, H. C., et al. Effect of Magnetic Field Strength on NMR-Based Metabonomic Human Urine Data. Comparative Study of 250, 400, 500, and 800 MHz. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 18, p. 7110-7115, set. 2007.

BHARTI, S. K., ROY, R. Quantitative  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry (TrAC)**, v. 35, p. 5-26, mai. 2012.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. *Portaria Normativa Nº 37-N, de 3 de abril de 1992*. Reconhece como Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção a relação que se apresenta. Diário Oficial da União, Nº 66, Seção 1, 06 de abril de 1992, p. 4302, Brasília, DF, 1992.

BRASIL. Ministério da Economia. Secretaria de Comércio Exterior. *Manual de utilização dos dados estatísticos do comércio exterior brasileiro*. Brasília, DF, abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. *Exportações e Importações: Comércio Exterior do Brasil (COMEX STAT), 1989-2021*. Acesso em: 09/11/2022

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. *Resolução – RDC, n. 2, de 15 de janeiro de 2007*, Brasília, DF, 2007. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. *Resolução – RDC, n. 166, de 25 de julho de 2017*, Brasília, DF, 2017. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. *Portaria MMA nº 443, de 17 de dezembro de 2014*. DOU Nº 245 Seção 1, 18 de dezembro de 2014. p. 110-121, Brasília, DF, 2014.

BRETON, R. C.; REYNOLDS, W. F. Using NMR to identify and characterize natural products. **The Royal Society of Chemistry**, v. 30, p. 501-524, 2013.

BRETON, R. G. Pattern recognition in chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 149, p. 90-96, dez. 2015.

CAMARGO, S. B.; VASCONCELOS, D. F. S. A. Atividades biológicas de Linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpene. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 3, p. 381-387, set./dez. 2014.

CASTRO, T. R. L. Rendimento do Óleo Essencial de Pau-Rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) Coletado na Floresta Nacional do Tapajós, Pará. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), 63., 2011, Goiânia. **Anais eletrônicos**. Goiânia, GO: SBPC/UFG, 2011.

CERCEAU, C. I., et al. A validated  $^1\text{H}$  NMR method for quantitative analysis of  $\alpha$ -bisabolol in essential oils of *Eremanthus erythropappus*. **Talanta**, v. 161, p. 71-79, dez. 2016.

CERCEAU, C. I., et al.  $^1\text{H}$  NMR and GC for detection of adulteration in commercial essential oils of *Cymbopogon* ssp. **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 1, p. 88-97, jan. 2020.

CITES, Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, Nineteenth meeting of the Plants Committee, Geneva, abr. 2011.

CLARIDGE, T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. 2nd. ed. Oxford, UK, 2009.

CONTIM, L. A. S., CONTIM, L. S. R. A tecnologia produtiva do pau-rosa (*Aniba rosaedora* Ducke) como aliada no desenvolvimento sustentável da região amazônica. **Inclusão Social, Brasília, DF**, v. 12, n. 1, p. 199-207, jul./dez. 2018.

CORDELLA, C., et al. Recent Developments in Food Characterization and Adulteration Detection: Technique-Oriented Perspectives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1751-1764, fev. 2002.

CULP, R. A.; NOAKES, J. E. Identification of Isotopically Manipulated Cinnamic Aldehyde and Benzaldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 5, p. 1249-1255, 1990.

DEBIK, J., et al. Multivariate analysis of NMR-based metabolomic data. **NMR in Biomedicine**, v. 35, n. 2, p. 1-21, fev. 2022.

DE LA CRUZ, et al. Estimativa da incerteza de medição em análise cromatográfica: abordagem sobre a quantificação de carbamato de etila em cachaça. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1578-1584, ago. 2010.

DO, T. K. T., et al. Authenticity of essential oils. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 66, p. 146-157, mar. 2015.

DREIER, L., WIDER, G. Concentration measurements by PULCON using X-filtered or 2D NMR spectra. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 44, p. S206-S212, jul. 2006.

EBRAHIMI, P., et al. Chemometric Analysis of NMR Spectra. In: Webb. G. A. (Ed.). **Modern Magnetic Resonance**, Springer, v. 1, 2017.

EVERTON, G. O., et al. Chemical profile and antimicrobial potential of essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Ocimum basilicum* Linn and *Aniba rosaedora* Ducke. **Scientia Plena**, v. 16, n. 6, jun. 2020.

FELTRACO, L. L., ANTUNES, M. V., LINDEN, R. Determinação de etanol e voláteis relacionados em sangue e fluido oral por microextração em fase sólida em *headspace* associada à Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2401-2406, out. 2009.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas, SP: Unicamp, 2015.

FREITAS, J. V. B., et al. Chemometric Analysis of NMR and GC datasets for chemotype characterization of essential oils from different species of *Ocimum*. **Talanta**, v. 180, p. 329-336, abr. 2018.

FORSHEED, J., et al. A comparison of methods for alignment of NMR peaks in the context of cluster analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 5, p. 824-832, ago. 2005.

GUIMARÃES, A. G., et al. Atividade Farmacológica de Monoterpenos. In: Souza, G. H. B., Mello, J. C. P. de, Lopes, N. P. (Org.). **Farmacognosia: coletânea científica**. Ouro Preto: UFOP, 376 p., 2011.

HALABALAKI, M., et al. Recent advances and new strategies in the NMR-based identification of natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 25, p. 1-7, fev. 2014.

HANNEGUELLE, S., et al. Authentication of Essential Oils Containing Linalool and Linalyl Acetate by Isotopic Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 81-87, jan. 1992.

HASSAN, M. M. A., MOSSA, J. S. Benzyl Benzoate. **Analytical Profiles of Drug Substances**, v. 10, p. 55-74, 1981.

HATZAKIS, E. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 00, nov. 2018.

HIMMELREICH, U., et al. Rapid Etiological Classification of Meningitis by NMR Spectroscopy Based on Metabolite Profiles and Host Response. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, p. 1-8, abr. 2009.

HOLLIS, D. P. Caffeine Mixtures by Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 35, n. 11, p. 1682-1684, out. 1963

HOLMES, E., et al. The Assessment of Plant Metabolite Profiles by NMR-Based Methodologies. **Planta Medica**, v. 72, n. 9, p. 771-785, jul. 2006.

HOLZGRABE, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 57, n. 2, p. 229-240, ago. 2010.

HOMMA, A. K. O. O extrativismo do óleo essencial de pau-rosa na Amazônia. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 32p., jul. 2003.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Avaliação de dados de medição: Guia para a expressão de incerteza de medição – GUM 2008. Rio de Janeiro, 2012.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. *Certificado de Material de Referência* N° DIMCI 1506/2019b, Rio de Janeiro, mar. 2022.

IUCN. International Union for Conservation of Nature. Red list of threatened species, 2021.

JESUS, I. S. de; NOGUEIRA, F. B.; FONSECA, A. M. Redução de compostos carbonílicos: os talos de mamoeiro (*Carica papaya*) como reagente biocatalisador. **Scientia Plena**, v. 9, n. 7, ago. 2013.

JONES, C. NMR assays for carbohydrate-based vaccines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 5, p. 840-850, ago. 2005.

JUNGNICKEL, J. L., FORBES, J. W. Quantitative Measurement of Hydrogen Types by Integrated Nuclear Magnetic Resonance. **Analytical Chemistry**, v. 35, n. 8, p. 938 – 942, jul. 1963.

KAISAR, K. A., et al. Chapter 5 - Metabolic Profiling. In: Holzgrabe, U., Wawer I., Diehl, B. (org). *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, **Elsevier**, p. 233-267, 2008.

KOHN, L. K., et al. In vitro antiviral activity of Brazilian plants (*Maytenus ilicifolia* and *Aniba rosaeodora*) against bovine herpesvirus type 5 and avian metapneumovirus. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 10, p. 1269-1275, ago. 2012.

KÖNIG, W. A.; HOCHMUTH, D. H. Enantioselective Gas Chromatography in Flavor and Fragrance Analysis: Strategies for the Identification of Known and Unknown Plant Volatiles. **Journal of Chromatographic Science**, v. 42, n. 8, p. 423-439 set. 2004.

KOWALSKI, B. R. Chemometrics: Views and Propositions. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 15, n. 4, p. 201-203, 1975.

KRAINOVIC, P. K., et al. Sequential management of commercial rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) plantations in Central Amazonia: Seeking sustainable models for essential oil production. **Forests**, v. 8, n. 438, p. 1-28, nov. 2017.

LARA, C. S., et al. Linalool enantiomeric distribution in rosewood-reminiscent populations in Central Amazon. **Journal of Essential Oil Research**, v. 30, n. 6, p. 464-469, jul. 2018.

LARA, C. S., COSTA, C. R., SAMPAIO, P. T. B. O mercado de sementes e mudas de pau rosa (*Aniba* spp. no Estado do Amazonas). **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 59, n. 3, p. 1-8, jan. 2021.

LIAN, S. H. C., GAY, I. D. A <sup>13</sup>C Solid-State NMR Study of the Chemisorption and Decomposition of Ethanol on MgO. **Journal of Catalysis**, v. 101, n. 2, p. 293-300, out. 1986.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família *Lauraceae* Linal. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, jan./dez. 2001.

MALZ, F. JANCKE, H. Validation of quantitative NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 5, p. 813-823, ago. 2005.

MALZ, F. Chapter 2 – Quantitative NMR in the Solution State NMR. In: Holzgrabe, U., Wawer I., Diehl, B. (org). *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, Elsevier, p. 43-62, 2008.

MAY, P. H., BARATA, L. E. S. Rosewood Exploration in the Brazilian Amazon: Options for sustainable production. **Economic Botany**, v. 58, n. 2, p. 257-265, 2004.

MEHL, F. et al. Differentiation of lemon essential oil based on volatile and non-volatile fractions with various analytical techniques: a metabolomic approach. **Food Chemistry**, v.143, p. 325-335, jan. 2014.

MOGHADDAM, M., MEHDIZADEH, L. Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. Soft Chemistry and Food Fermentation. In: Grumezescu, A. M., Holban, A. M. **Handbook of Food Bioengineering**. Academic Press, p. 379-419, 2017.

MONAKHOVA, Y. B., KUBALLA, T., LACHENMEIER, D. W. Chemometric Methods in NMR Spectroscopic Analysis of Food Products. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 68, p. 755-766, ago. 2013.

MONAKHOVA, Y. B., HOLZGRABE, U., DIEHL, B. W. K. Current role, and future perspectives of multivariate (chemometric) methods in NMR spectroscopic analysis of pharmaceutical products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 580-589, jan. 2018.

MONAKHOVA, Y. B., et al. Determination of the purity of pharmaceutical reference materials by <sup>1</sup>H NMR using the standarless PULCON methodology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 100, p. 381-386, nov. 2014.

MORAIS, A. A. de., et al. Óleos essenciais de espécies do gênero *Aniba*. **Acta Amazonica**, v. 2, n. 1, p. 41-44, abr. 1972.

MOSANDL, A. Authenticity Assessment: A Permanent Challenge in Food Flavor and Essential Oil Analysis. **Journal of Chromatographic Science**, v 42, n. 8, p. 440-449, set. 2004

MOU, F., et al. Reusable Ionic Liquid-Catalyzed Oxidative Esterification of Carboxylic Acids with Benzylic Hydrocarbons via Benzylic Csp<sup>3</sup>-H Bond Activation under Metal-Free Conditions, **The Royal Society of Chemistry**, v. 7, n. 37, p. 23041-23045, abr. 2017.

NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NURANI, L. H., et al. Metabolite Fingerprinting Using 1H-NMR Spectroscopy and Chemometrics for Classification of Three Curcuma Species from Different Origins. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7626, dez. 2021.

OHASHI, S. T.; ROSA, L. S.; SANTANA, J. A. Brazilian Rosewood Oil: Sustainable Production and Oil Quality Management. **Perfumer & Flavorist**, v. 22, n. 2, p. 1-2, 4-5, mar. /abr. 1997.

OHMENHAEUSER, M., et al. Qualitative and Quantitative Control of Honeys Using NMR Spectroscopy and Chemometrics. **International Scholarly Research Notices Analytical Chemistry**, v. 2013, p. 1-9, mai. 2013.

PACHOLCZYK-SIENICKA, B.; CIEPIELOWSKI, G.; ALBRECHT, L. The Application of NMR Spectroscopy and Chemometrics in Authentication of Spices. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 382, jan. 2021.

PASTORE, T. C. M., et al. A green and direct method for authentication of rosewood essential oil by handheld near infrared spectrometer and one-class classification Modeling. **Microchemical Journal**, v. 182, nov. 2022.

PAULI, G. F., JAKI, B. U., LANKIN, D. C. Quantitative 1H NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis. **Journal Natural Products**, v. 68, n. 1, p. 133-149, 2005.

PAVIA, et al. **Introduction to Spectroscopy**, 4. ed. Canada, Cengage Learning, 2010.

POPESCU, R., et al. Discrimination of vegetable oils using NMR spectroscopy and chemometrics. **Food Control**, v. 48, p. 84-90, fev. 2015.

RAVID, U., et al. Enantiomeric Composition of Linalol in the Essential Oils of *Ocimum* Species and in Commercial Basil Oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 12, n. 4, p. 293-296, jul. 1997.

RIVERO-CRUZ, B., et al. Qualitative and Quantitative Analysis of the Active Components of the Essential Oil from *Brickellia veronicaefolia* by Nuclear

Magnetic Resonance Spectroscopy. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1172-1176, jul. 2006.

RIZZO, V., PINCIROLI, V. Quantitative NMR in synthetic and combinatorial chemistry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 851-857, abr. 2005.

ROSA, L. S., et al. Crescimento e sobrevivência de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) oriundas de três procedências, em função de diferentes níveis de sombreamento, em condições de viveiro. Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará. **FCAP**, v. 28, p.37-62, 1997.

SALGUEIRO, L.; MARTINS, A. P.; CORREIA, H. Raw materials: the importance of quality and safety. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 253-271, jan. 2010.

SAMPAIO, L. de F. S., et al. Linalool from Rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) Oil Inhibits Adenylate Cyclase in the Retina, Contributing to Understanding its Biological Activity. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 1, p. 73-77, mai. 2012.

SCHRIPSEMA, J.; SILVA, S. M. da.; DAGNINO, D. Differential NMR and chromatography for the detection and analysis of adulteration of vetiver essential oils. **Talanta**, v. 237, p. 1-12, jan. 2022.

SPECTRAL DATABASE FOR ORGANIC COMPOUNDS SDBS. **SDBS Compounds and Spectral Search**. Disponível em: < <http://sdb.sdb.aist.go.jp>>

SHI, L. et al. Selective reduction of aldehydes and ketones to alcohols with ammonia borane in neat water. **Green Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 1372-1375, mar. 2012.

SILVA, G. B. da., **Isolamento, caracterização, quantificação e avaliação da pureza enantiomérica de linalol, carvona e limoneno em óleos essenciais de espécies aromáticas**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2011.

SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: do produto natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SOUZA, R. C. Z., et al. The Famous Amazonian Rosewood Essential Oil: Characterization and Adulteration Monitoring by Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting. **Analytical Letters**, v. 44, n. 15, p. 2417-2422, out. 2011.

TAVARES, L. A., FERREIRA, A. G. Análises quali- e quantitativa de cafés comerciais via ressonância magnética nuclear. **Química Nova**, v. 29, n. 5, out. 2006.

TELES, A. M., et al. *Aniba rosaeodora* (Var. *amazonica* Ducke) Essential Oil: Chemical Composition, Antibacterial, Antioxidant and Antitrypanosomal Activity. **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2021.

TRYGG, J., HOLMES, E., LUNDSTEDT, T. Chemometrics in Metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p. 469-479, 2007.

URE, A. D., O'BRIEN, J. E., DOOLEY, S. Quantitative NMR Spectroscopy for the Analysis of Fuels: A Case Study of FACE Gasoline F. **Energy Fuels**, v. 33, n. 11, p. 11741-11756, set. 2019.

WANG, et al. Research Progress of NMR in Natural Product Quantification. **Molecules**, v. 26, n. 20, p. 6308, out. 2021.

WINNING, H., et al. Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 190, n. 1, p. 26-32, jan. 2008.

WOLD, S.; MARTENS, H.; WOLD, H. The Multivariate Calibration Problem in Chemistry Solved by the PLS Method. In: Kagström, B., Ruhe, A. (Ed.). **Matrix Pencils**. Pite Havsbad, Sweden: Springer, 1982.

WOLFENDER, J., et al. Accelerating Metabolite Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography–High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, in **Silico Databases, and Chemometrics. Analytical Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 704-742, 2019.

WISHART, D. S., et al. NMR and Metabolomics – A Roadmap for the Future. **Metabolites**, v. 12, n. 8, p. 678, ago. 2022.

ZIELINSKA, A., et al. Qualitative and quantitative analysis of energy drinks using  $^1\text{H}$  NMR and HPLC methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 213, p. 1-9, mai. 2022.

ZURIARRAIN, A., et al. Quantitative determination of ethanol in cider by  $^1\text{H}$  NMR spectrometry. **Food Control**, v. 50, p. 758-762, abr. 2015.

	<p>Serviço Público Federal Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro)</p>
---	---

## *Certificado de Material de Referência*

  
 DIMCI\_1506/2019c  
 Número do Certificado

## ANEXO A

**Identificação do item**  
Material de Referência Certificado (MRC) de Dimetilsulfona

**Unidade produtora**  
Divisão de Metrologia Química (Dquim)

**Numeração do lote**  
MRC 8783.0001

**Código do serviço**  
8783

**Data de emissão:** A data de emissão deste certificado é correspondente à data da última assinatura eletrônica presente ao final do certificado.

**Declaração**

O MRC e seu certificado atendem aos requisitos das normas ABNT NBR ISO 17034 [1] e ABNT NBR ISO/IEC 17025 [2] e ao guia ABNT ISO GUIA 31 [3]. Este certificado é válido apenas para o item acima, não sendo extensivo a quaisquer outros e somente pode ser reproduzido de forma integral.

Este certificado é consistente com as Capacidades de Medição e Calibração (CMCs) que estão incluídas no apêndice C do Acordo de Reconhecimento Mútuo (MRA) estabelecido pelo Comitê Internacional de Pesos e Medidas (CIPM). Confira os termos do MRA, todos os institutos participantes reconhecem entre si a validade dos seus certificados de medição para cada uma das grandezas, faixas e incertezas de medição declaradas no Apêndice C (para mais detalhes ver <http://www.bipm.org>).

[https://sei.inmetro.gov.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_inprimir\\_web&acao\\_origem=arvore\\_visualizar&id\\_documento=15941028&infra\\_sistema=1000001008&infra\\_unidade\\_atual=1100000898&infra\\_hash=06996c16dd81888b4a2884d60ea141192b14c59a83254207516173a45897d2c](https://sei.inmetro.gov.br/sei/controlador.php?acao=documento_inprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=15941028&infra_sistema=1000001008&infra_unidade_atual=1100000898&infra_hash=06996c16dd81888b4a2884d60ea141192b14c59a83254207516173a45897d2c)

**Figura 1.** Certificado de Análise de Material de Referência. Pureza do padrão de DMSO<sub>2</sub> utilizado na quantificação pelo método de PULCON pela técnica de RMN.

**Descrição e preparação do MRC**

Este MRC consiste de dimetilsulfona (Tabela 1) em pó fino de pureza elevada. O material utilizado para certificação foi obtido de produtor comercial, padronizado em peneiras, homogeneizado e envasado em frasco de vidro âmbar, com tampa de borracha e laço de alumínio, contendo aproximadamente 4 g.

Tabela 1: Dados da dimetilsulfona

Fórmula molecular	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S	Fórmula estrutural	
Massa molar (± incerteza combinada)	(94,1354 ± 0,0051) g/mol [4]		
Chemical abstracts service (CAS)	67-71-0		

**Uso pretendido**

Este MRC destina-se ao uso como padrão interno para análises de RMNq e para outros ensaios que demandem material com valor certificado de pureza.

**Valor certificado**

O valor certificado é o que apresenta a mais elevada confiança na sua exatidão e para o qual todas as fontes de erro conhecidas ou potenciais foram pesquisadas e consideradas.

O valor certificado com sua incerteza expandida (U) para um nível de confiança de aproximadamente 95 % e fator de abrangência k=2 está discriminado a seguir:

**Fração em massa de dimetilsulfona: (1000 ± 2) mg/g**

O valor certificado corresponde à pureza de (100,0 ± 0,2) %, em termos de massa. Este valor foi atribuído por balanço de massas e conferido por RMNq e depressão do ponto de fusão. Para determinar a incerteza expandida foi avaliada a contribuição da incerteza-padrão dos estudos de homogeneidade, estabilidade de curta e longa duração e caracterização [5].

**Valor informativo**

Valor informativo é um valor não certificado que não atende aos requisitos da ABNT NBR ISO 17034 para a certificação e pode ou não ser fornecido com incerteza associada. Esta incerteza pode refletir apenas a precisão das medições e não incluir todas as fontes de incerteza ou refletir uma falta de concordância estatística suficiente entre diferentes métodos.

Os valores informativos para as frações em massa de cálcio e alumínio neste MRC são 0,0015 e 0,0013 mg/g, respectivamente.

**Rastreabilidade metrológica**

O valor certificado para pureza possui rastreabilidade metrológica ao mol, unidade de quantidade de substância do Sistema Internacional de Unidades (SI), por meio da caracterização por balanço de massas e confirmação por RMNq e depressão do ponto de fusão, que são procedimentos de medição primários. O preparo gravimétrico das amostras com rastreabilidade metrológica ao kg, unidade de massa do SI, garantiu uma cadeia ininterrupta de calibrações.

A identidade do material foi comprovada pelas análises seguintes:

**Figura 2.** Certificado de Análise de Material de Referência. Pureza do padrão de DMSO<sub>2</sub> utilizado na quantificação pelo método de PULCON pela técnica de RMN.

## ANEXO B

**SIGMA-ALDRICH**

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA  
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

### Certificate of Analysis

**Product Name:** LINALOOL  
analytical standard  
**Product Number:** 51782  
**Batch Number:** BCBN5403V  
**Brand:** Fluka  
**CAS Number:** 78-70-6  
**Formula:** (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C=CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)(OH)CH=CH<sub>2</sub>  
**Formula Weight:** 154.25  
**Storage Temperature:** 2-8 C  
**Expiration Date:** AUG 2017  
**Quality Release Date:** 12 SEP 2014

#### TEST

#### SPECIFICATION RESULT

<b>APPEARANCE (COLOR)</b>	COLORLESS	COLORLESS
<b>APPEARANCE (FORM)</b>	LIQUID	LIQUID
<b>PURITY (GC AREA %)</b>	≥ 99.0 %	99.4 %
<b>PROTON NMR SPECTRUM</b>	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS

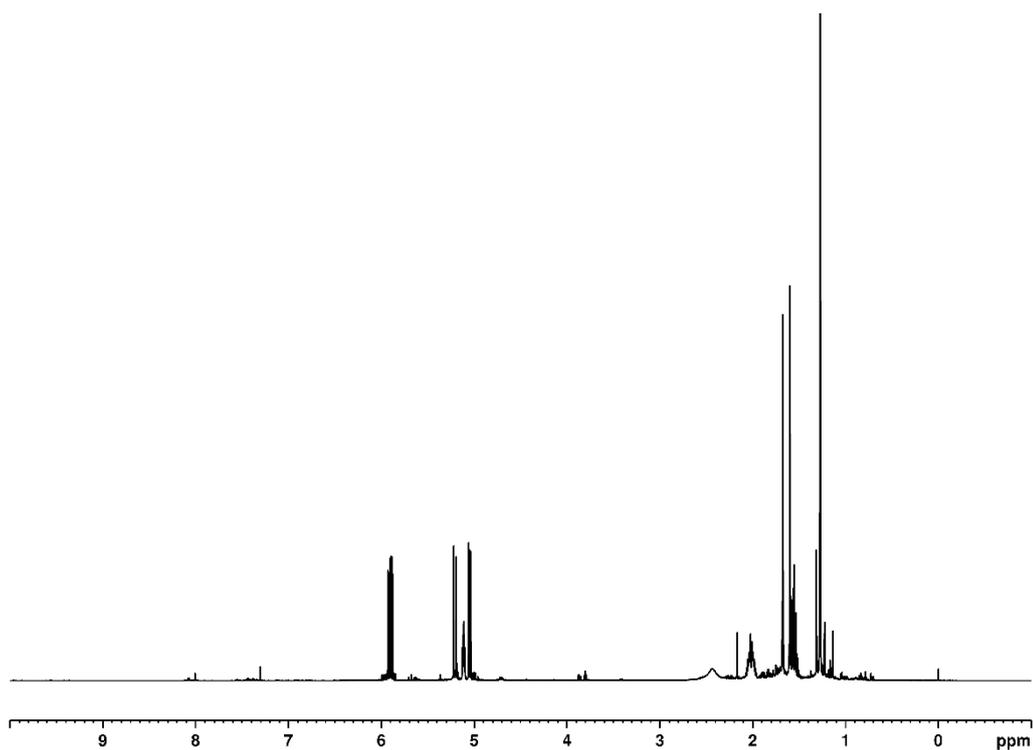


Dr. Claudia Geitner  
Manager Quality Control  
Buchs, Switzerland

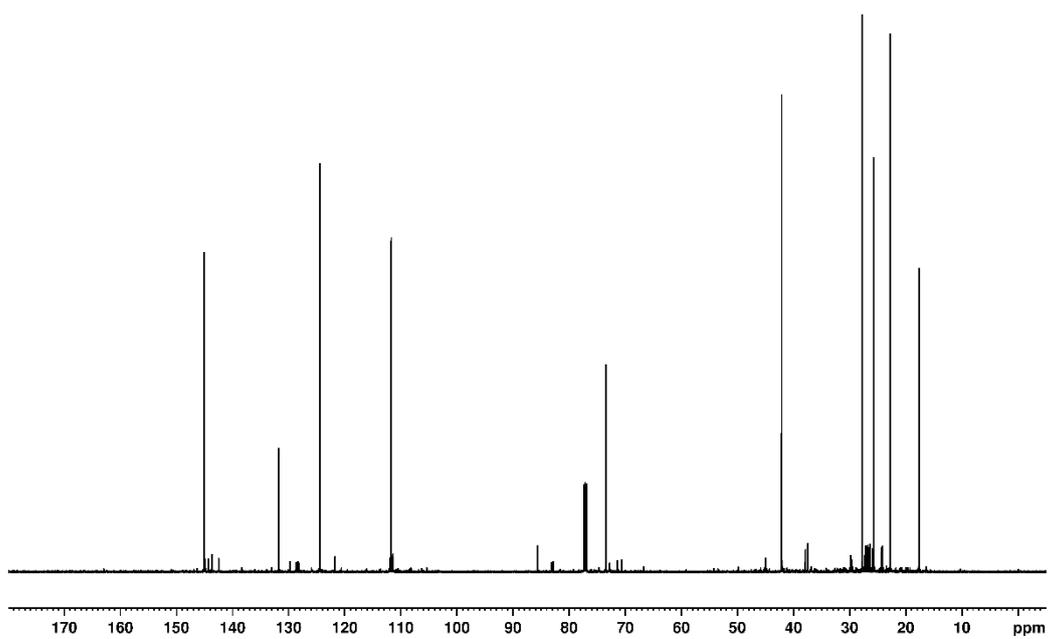
Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

**Figura 1.** Certificado de Análise de Material de Referência. Pureza do padrão do linalol utilizado na calibração do método de CG-EM.

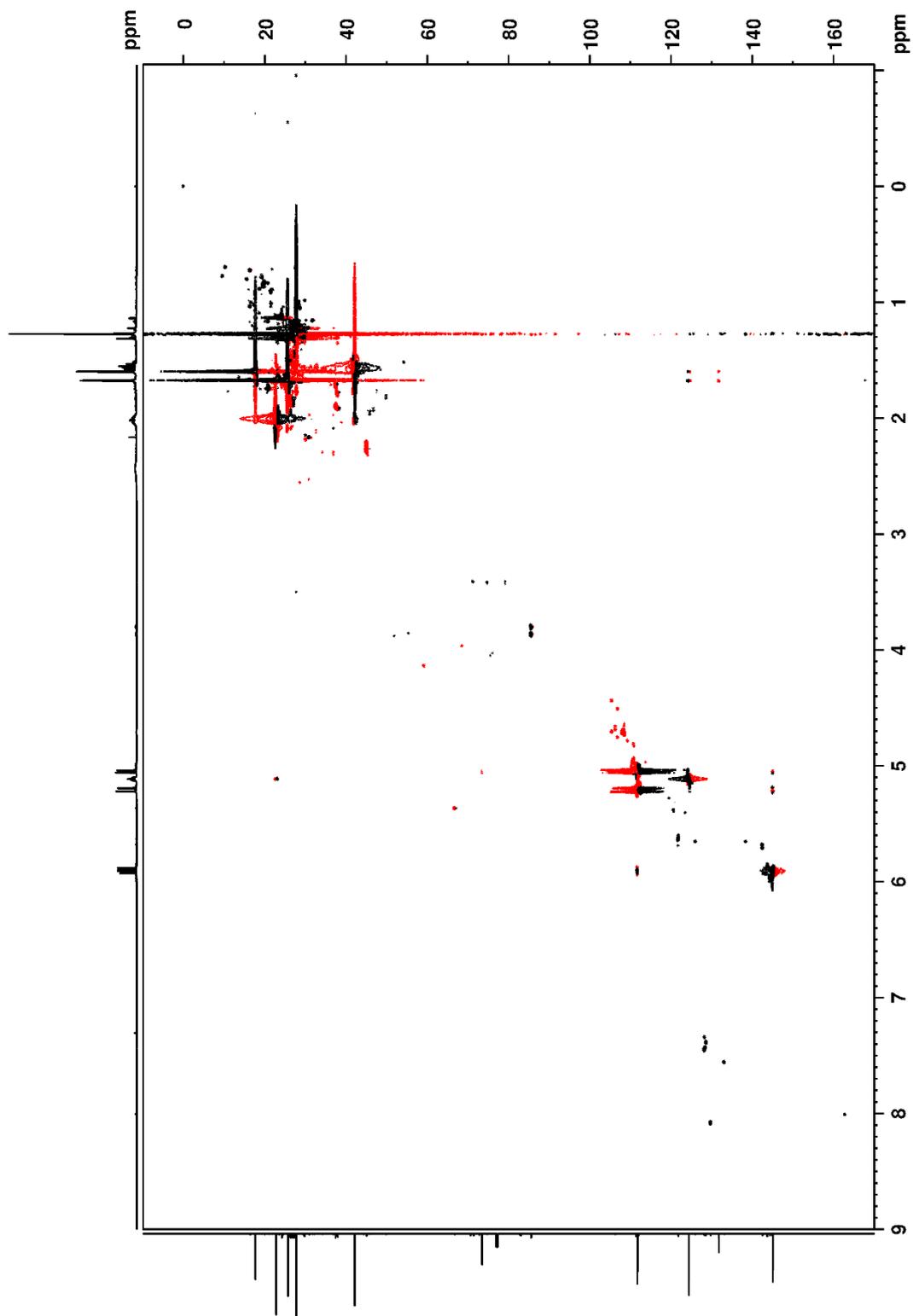
## ANEXO C



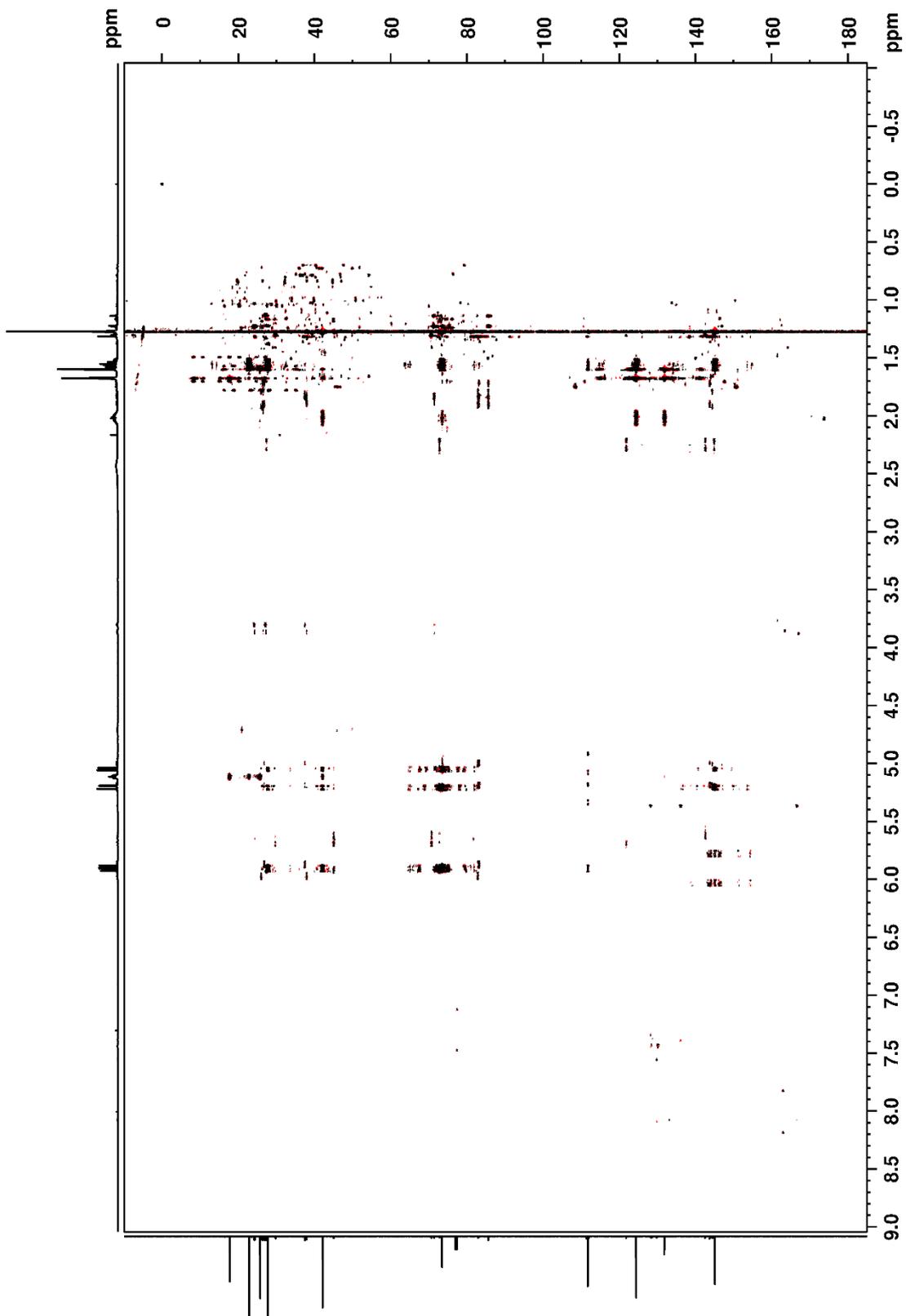
**Figura 1.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da amostra LPF-11-3.



**Figura 2.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da amostra LPF-11-3.



**Figura 3.** Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC da amostra LPF-11-3. Em preto sinais positivos e vermelho sinais negativos.



**Figura 4.** Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC da amostra LPF-11-3. Em preto sinais positivos e vermelho sinais negativo

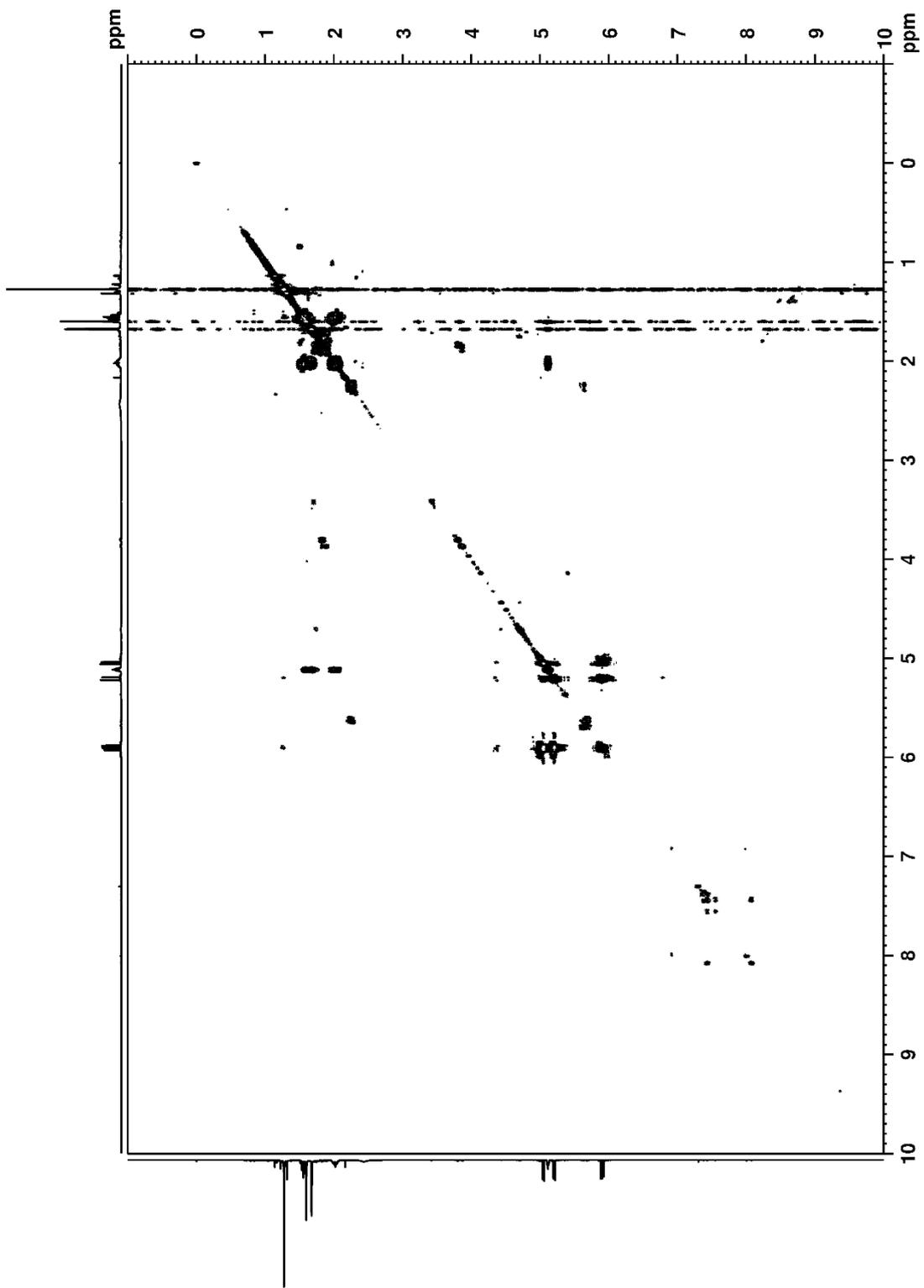


Figura 5. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY da amostra LPF-11-3.

## ANEXO D

Tabela 1. Teor de linalol por amostra.

Marca	Amostra (LPF)	Teor de Linalol (%)
A1	1	72,6
A1	2	75,1
A1	3	69,6
A1	4	76,8
A1	5	72,7
A1	6	69,4
A1	7	74,6
A1	8	69,2
A1	9	64,2
A1	10-1	60,8
A1	10-2	63,9
A1	11-1	65,6
A1	11-2	62,4
A1	11-3	61,7
A1	11-4	63,5
A1	11-5	64,1
A1	11-6	60,5
A1	11-7	70,1
A1	11-8	70,9
A1	11-9	70,9
A1	11-10	72,1
A2	12-1	77,1
A2	12-2	73,8
A2	12-3	72,9
A2	12-4	70,7
A2	12-5	73,3
A2	12-6	71,4
A2	12-7	72,8
A2	12-8	67,9
A2	13-1	77,0
A2	13-2	72,6
A2	13-3	77,7
A2	13-4	75,4
A2	13-5	74,2
A2	13-6	73,9
A2	13-7	78,3
A2	13-8	76,3
A3	15	72,2
A4	16	74,4
A5	50	62,5
A6	54	66,9
A6	55	67,6
A7	57	70,7
A9	62-2	72,1

A10	63	71,4
A11	65	68,5
U1	56	6,1
U2	49	1,1
U3	21	58,9
U4	58-2	5,4
U5	62-1	5,5
U6	25	16,0
U6	26	16,4
U6	27	15,5
U6	28	16,9
U6	44	10,2
U6	45	10,6
U8	33-1	4,9
U8	33-2	4,7
U8	34-1	5,1
U8	34-2	4,8
U8	43	0,2
U9	23-1	17,8
U9	23-2	17,8
U9	24-1	18,1
U9	24-2	17,8
U10	17	81,4
U10	18	0,4
U10	19	59,0
U10	20	0,3
U10	22	0,8
U11	46	0,9
U11	47	8,4
U12	14	22,6
U13	51	1,0
U13	52	29,7
U14	59	2,1
U15	53	5,4
U17	60	2,4
U17	61	2,4
U18	64-1	16,3
U18	64-2	17,8
U18	48	2,8
U20	39-1	0,7
U20	39-2	0,8
U20	39-3	0,8
U21	40-1	4,4
U21	40-2	4,6
U21	40-3	4,1
U21	40-4	4,1
U21	40-5	4,5
U21	40-6	4,4

U22	41-1	72,7
U22	41-2	76,1
U22	41-3	68,2
U22	41-4	71,2
U22	41-5	71,4
U22	41-6	71,5
U22	41-7	72,8
U22	41-8	75,2
U22	41-9	72,6
U22	41-10	78,1
U23	42-1	40,4
U23	42-2	39,0
U23	42-3	34,5
U23	42-4	40,9
U23	42-5	38,7
U23	42-6	39,5
U23	42-7	37,9
U23	42-8	63,7
U24	58-1	88,0

## ANEXO E

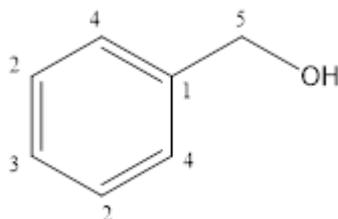


Figura 1. Estrutura do álcool benzílico.

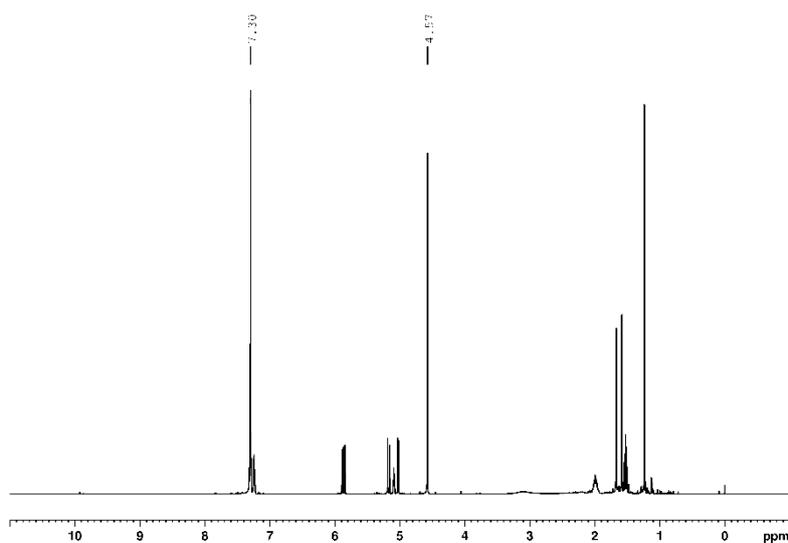


Figura 2. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da amostra LPF-42.1 da marca U23. Sinalizados os sinais do álcool benzílico.

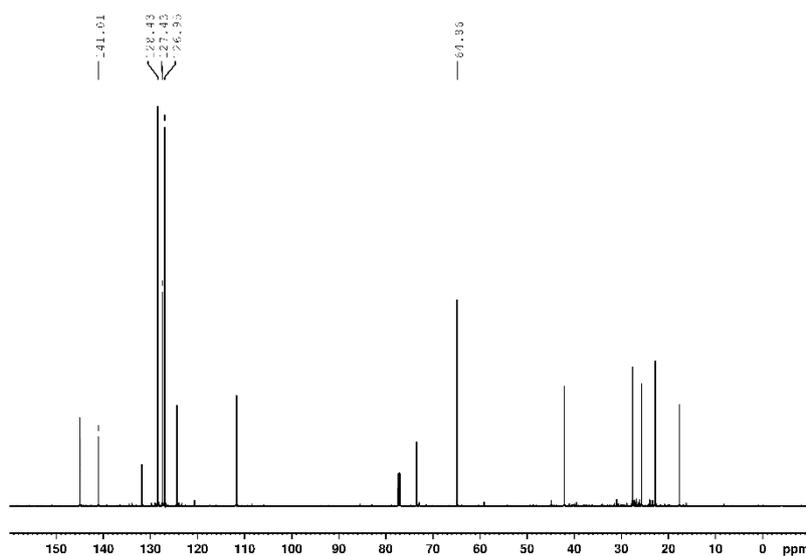
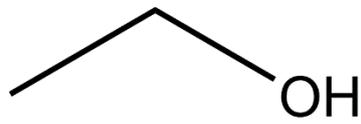


Figura 3. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da amostra LPF-42.1 da marca U23. Sinalizados os sinais do álcool benzílico.

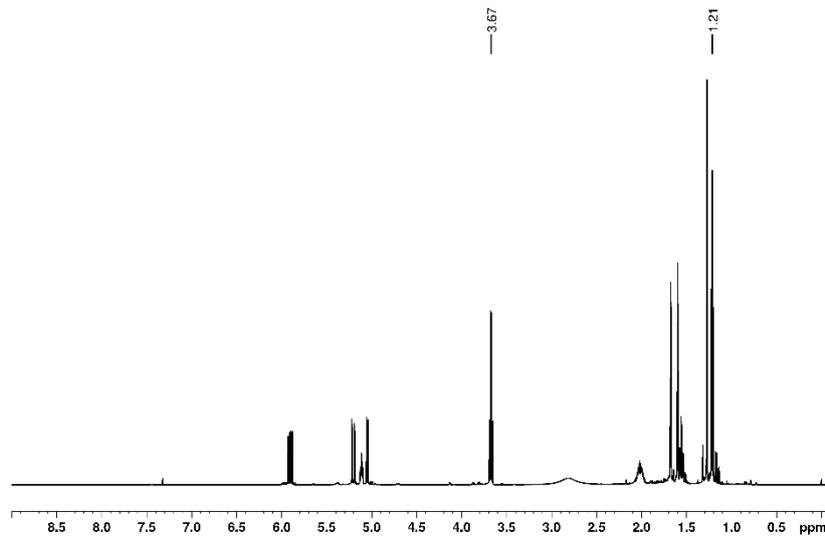
**Tabela 1.** Atribuição dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  do álcool benzílico e comparação com os dados da literatura (Shi, et al., 2012; Jesus, et al., 2013; SDBS).

	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm) lit.	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) lit.
1	141	-	140,9	-
2	128,4	7,30	128,4	7,30
3	127,4	7,30	127,4	7,30
4	126,9	7,30	126,9	7,30
5	64,9	4,57	64,7	4,60

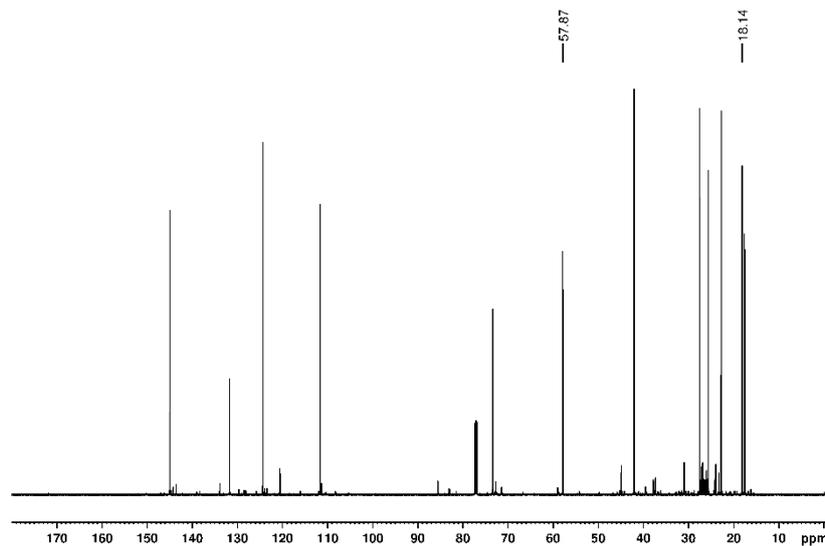
## ANEXO F



**Figura 1.** Estrutura do álcool etílico, com nome IUPAC etanol.



**Figura 2.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da amostra LPF-21 da marca U3. Sinalizados os sinais do álcool etílico.



**Figura 3.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da amostra LPF-21 da marca U3. Sinalizados os sinais do álcool etílico.

**Tabela 1.** Atribuição dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  do etanol e comparação com os dados da literatura (Zuriarrain, et al., 2015; Lian and Gay, 1986).

	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm) lit.	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) lit.
1	57,9	3,67	57,3	3,66
2	18,1	1,21	17,9	1,19

## DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifique e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 05 de setembro de 2023.

Assinatura do/a discente:

*Fernanda Lopes de Mesquita Vieira*

Programa: Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)

Nome completo: Fernanda Lopes de Mesquita Vieira

Título do Trabalho: Caracterização e Diferenciação do Óleo Essencial de Pau-Rosa (*Aniba rosiodora*) pela Técnica de Ressonância Magnética Nuclear Associada à Quimiometria.

Nível:  Mestrado ( ) Doutorado

Orientador/a: Dr<sup>a</sup>. Aline Lima de Oliveira Paterno