



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

FERNANDA LOPES DE MESQUITA VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE ÓLEO DE
COPAIFERA SPP. PELA TÉCNICA DE RMN E QUIMIOMETRIA**

Brasília-DF

2/2020

FERNANDA LOPES DE MESQUITA VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE ÓLEO DE
COPAIFERA SPP. PELA TÉCNICA DE RMN E QUIMIOMETRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso em Química Tecnológica apresentada ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de bacharelado em Química Tecnológica.

Orientador: Prof. Dra. Aline Lima de Oliveira Paterno

Coorientador: Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

BRASÍLIA-DF

2/2020

FERNANDA LOPES DE MESQUITA VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE ÓLEO DE
COPAIFERA SPP. PELA TÉCNICA DE RMN E QUIMIOMETRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de Brasília para a obtenção do
título de bacharelado em Química
Tecnológica.

Brasília, 12 de maio de 2021

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Aline Lima de Oliveira Paterno

Prof. Ângelo Henrique de L. Machado

Prof. Cyro Lucas Silva Chagas

Prof.^a Talita de Almeida Fernandes

AGRADECIMENTOS

Obviamente não serão nessas poucas linhas que conseguirei expressar minha gratidão às pessoas que me ajudaram até aqui, tanto no meu crescimento pessoal quanto profissional.

Agradeço primeiramente a Deus que me ilumina todos os dias e que sempre colocou em meu caminho pessoas especiais. É Ele que me dá forças para continuar a lutar pelos meus sonhos.

Aos meus pais, Janette das Graças Lopes Mesquita e Wellington de Mesquita Vieira, que além de todo amor que me dão, me apoiam, me incentivam em toda a minha jornada, não duvidam dos meus sonhos e dão todo suporte para eu conquistá-los. Estendo minha gratidão à toda minha família.

Ao meu namorado Vinícius Vieira Evangelista por estar comigo desde o Ensino Médio me apoiando, comemorando comigo as conquistas e passando comigo pelos obstáculos.

Aos meus orientadores Prof.^a Dra^a Aline Lima de Oliveira Paterno e Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga que apesar de todo o trabalho que já exercem aceitaram me orientar não somente nesse trabalho de conclusão de curso, mas em demais projetos de pesquisa. Seus ensinamentos fizeram enorme diferença na construção desse trabalho e na minha formação.

Ao Alessandro C. de Oliveira Moreira, pelo fornecimento das amostras e ajuda no trabalho.

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

À Finep pelo apoio financeiro na compra do equipamento de Ressonância Magnética Nuclear e ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica que auxiliaram na execução desse trabalho.

Aos meus amigos, por todo apoio e confiança em mim. Inclusive aos meus amigos de curso, que dividiram experiências e aprendizados comigo que com certeza me ajudaram.

Por fim, agradeço a todos os professores e funcionários do Instituto de Química-UnB e de toda Universidade de Brasília que contribuíram direta ou indiretamente na minha formação.

RESUMO

O óleo de copaíba é um produto natural muito utilizado na medicina popular e como matéria-prima da indústria farmacêutica e cosmética. Diferenças entre espécies ou locais de extração podem ocasionar alterações na composição de um mesmo óleo vegetal, o que destaca a importância do seu controle de qualidade. A quimiometria aliada a métodos analíticos instrumentais, como a ressonância magnética nuclear (RMN), vem sendo muito utilizada no controle de qualidade de diversos produtos. Assim, esse trabalho propõe utilizar a técnica de RMN associada à quimiometria para diferenciar e caracterizar amostras de óleo de copaíba obtidas de diferentes regiões do Brasil. Para isso, espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de 26 amostras de óleo de copaíba foram adquiridos e submetidos a análises quimiométricas, por meio da análise de componentes principais (PCA), que permitem o reconhecimento de padrões entre as amostras e origens, bem como indicam as principais variáveis responsáveis pelo agrupamento. Os resultados mostraram que as amostras de *Copaifera langsdorffii* apresentam diferença de composição em relação às amostras de outras espécies. Amostras de óleo de copaíba obtidas de espécies indefinidas apresentaram agrupamentos no PCA e dendrogramas que podem indicar espécies diferentes entre as amostras com espécies indefinidas. Após as análises quimiométricas, também foram realizados experimentos de RMN bidimensionais com o objetivo de identificar a estrutura das moléculas que possam estar diferenciando o óleo extraído da espécie de *Copaifera langsdorffii* daquele obtido de outras espécies de *Copaifera* (*Copaifera* sp.). A partir dos sinais observados nos gráficos de pesos e a análise de espectros de RMN 2D, foi possível determinar a estrutura de três terpenos (ácido hardwickiico, óxido de cariofileno e ácido caurenóico) responsáveis pela diferenciação das amostras.

ABSTRACT

Copaiba oil is a natural product widely used in popular medicine and as raw material for pharmaceutical and cosmetic industry. Differences between species or extraction sites can cause changes in the composition of the same vegetable oil, which highlights the importance of its quality control. Chemometric combined with instrumental analytical methods, such as nuclear magnetic resonance (NMR), has been widely used in the quality control of several products. Thus, this work proposes to use the NMR technique associated with chemometric to differentiate and characterize samples of copaiba oil obtained from different regions of Brazil. For this, ^1H and ^{13}C NMR spectra of 26 samples of copaiba oil were acquired and submitted to chemometric analysis, through the principal component analysis (PCA), which allow the recognition of patterns between the samples and origins, as well as indicate the main variables responsible for the grouping. The results showed that the samples of *Copaifera langsdorffii* show difference in composition in relation to the other samples. Samples of copaiba oil obtained from undefined species showed clusters in the PCA and dendrograms that may indicate different species among samples with undefined species. After chemometric analyzes, two-dimensional NMR experiments were also carried out in order to identify the structure of the molecules that may be differentiating the oil extracted from the *Copaifera langsdorffii* species from that obtained from other *Copaifera* species (*Copaifera* sp.). From the signals observed in the weight graphs and the analysis of 2D NMR spectra, it was possible to determine the structure of three terpenes (hardwickic acid, caryophyllene oxide and kaurenoic acid) responsible for the differentiation of the samples.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Amostras de óleo de copaíba puro utilizadas nas análises.18
- Figura 2 – Espectros de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) das amostras de óleo de copaíba. (Azul) espectros das amostras da espécie *Copaifera langsdorffii* e (vermelho) espectros de *Copaifera* spp. Em destaque região de deslocamento químico entre 6,00 e 7,50 ppm.....22
- Figura 3 – Espectros de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) das amostras de óleo de copaíba com supressão do sinal do solvente. (Azul) espectros das amostras da espécie *Copaifera langsdorffii* e (vermelho) espectros de *Copaifera* spp.....23
- Figura 4 – Dendrograma obtido a partir dos dados dos espectros de RMN de ^1H com pré-processamento *mean center*, com separação majoritária das amostras em clusteres de acordo com suas características. (L) indica as amostras de *Copaifera langsdorffii*, (SP) indica as amostras de outras espécies, e das regiões Acre (AC), Pará (PA), Goiás (GO), mistura de amostras do Goiás (MIX), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG) e amostras compradas online de origem e espécies indefinidas (IND).24
- Figura 5 – Dendrograma obtido a partir dos dados dos espectros de RMN de ^{13}C com pré-processamento *mean center*, com separação majoritária das amostras em clusteres de acordo com suas características. (L) indica as amostras de *Copaifera langsdorffii*, (SP) indica as amostras de outras espécies, e das regiões Acre (AC), Pará (PA), Goiás (GO), mistura de amostras do Goiás (MIX), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG) e amostras compradas online de origem e espécies indefinidas (IND).25
- Figura 6 – Escores de PC1xPC2 dos espectros de RMN de ^1H com pré-processamento *mean center*. (L) indica as amostras de *Copaifera langsdorffii*, (SP) indica as amostras de outras espécies, e das regiões Acre (AC), Pará (PA), Goiás (GO), mistura de amostras do Goiás (MIX), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG) e amostras compradas online de origem e espécies indefinidas (IND). Símbolos e cores representam os clusteres identificados na Figura 3. ..26

Figura 7 – Escores de PC3 (B) dos espectros de RMN de ^1H com pré-processamento <i>mean center</i> . (L) indica as amostras de <i>Copaifera langsdorffii</i> , (SP) indica as amostras de outras espécies, e das regiões Acre (AC), Pará (PA), Goiás (GO), mistura de amostras do Goiás (MIX), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG) e amostras compradas online de origem e espécies indefinidas (IND). Símbolos e cores representam os clusteres identificados na Figura 4.	27
Figura 8 – Gráfico de pesos da PC1 dos espectros de RMN de ^1H com pré-processamento <i>mean center</i>	28
Figura 9 – Gráfico de pesos da PC2 dos espectros de RMN de ^1H com pré-processamento <i>mean center</i>	29
Figura 10 – Gráfico de pesos da PC1 dos espectros de RMN de ^1H com pré-processamento <i>mean center</i>	29
Figura 11 – Escores de PC1 e PC2 dos espectros de RMN de ^{13}C . (L) indica as amostras de <i>Copaifera langsdorffii</i> , (SP) indica as amostras de outras espécies, e das regiões Acre (AC), Pará (PA), Goiás (GO), mistura de amostras do Goiás (MIX), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG) e amostras compradas online de origem e espécies indefinidas (IND). Símbolos e cores representam os clusteres identificados na Figura 4.	31
Figura 12 – Gráfico de pesos da PC1 dos espectros de RMN de ^{13}C com pré-processamento <i>mean center</i>	32
Figura 13 – Gráfico de pesos da PC2 dos espectros de RMN de ^{13}C com pré-processamento <i>mean center</i>	32
Figura 14 – Espectro de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra OCP-18 do óleo de copaíba obtido de uma espécie indefinida (<i>Copaifera</i> sp.).	34
Figura 15 – Espectro de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da amostra OCP-18 do óleo de copaíba obtido de uma espécie indefinida (<i>Copaifera</i> sp.).	34
Figura 16 – Estrutura bidimensional (A) e tridimensional (B) do Ácido Hardwickiico.	35
Figura 17 – Espectro de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra OCP-02 do óleo de copaíba obtido da espécie <i>Copaifera langsdorffii</i>	39

Figura 18 – Espectro de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da amostra OCP-02 do óleo de copaíba obtido da espécie <i>Copaifera langsdorffi</i>	39
Figura 19 – Estrutura bidimensional (A) e tridimensional (B) do Óxido de Cariofileno.	40
Figura 20 – Estrutura bidimensional (A) e tridimensional (B) do Ácido Caurenóico.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações de aquisição, origem e espécie das 26 amostras analisadas.	19
Tabela 2 – Informações dos parâmetros usados na aquisição dos espectros de RMN.	21
Tabela 3 – Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , dados de HMBC, COSY, NOESY e TOCSY do Ácido Hardwickiico encontrado na amostra OCP-18 e comparação com dados da literatura. ¹¹	36
Tabela 4 – Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , dados de HMBC, COSY, NOESY e TOCSY do Óxido de Cariofileno encontrado na amostra OCP-02 e comparação com dados da literatura. ¹²	41
Tabela 5 – Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , dados de HMBC, COSY, NOESY e TOCSY do Ácido Caurenóico encontrado na amostra OCP-02 e comparação com dados da literatura. ¹³	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AC	Acre
BBFO	Sonda Broadband Observe
C	Carbono
<i>C. langsdorffi</i>	<i>Copaifera langsdorffi</i>
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
COSY	COrrrelation SpectroscopY (Correlação Espectroscópica)
D1	Delay (tempo de espera)
dd	duplo duplete
DF	Distrito Federal
DS	Dummy Scans (Número de Varreduras fictícias)
FID	Free Induction Decay (Decaimento Livre de Indução)
GO	Goiás
H	Hidrogênio
HD	High Definition (Alta Definição)
HCA	Hierarchical Cluster Analysis (Análise Hierárquica de Clusters)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Correlação de Ligação Múltipla Heteronuclear)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation (Correlação Heteronuclear Única Quântica)
IND	Indefinido
IQ	Instituto de Química
L	<i>Copaifera langsdorffi</i>

lit.	Literatura
MG	Minas Gerais
MHz	Mega Hertz
MIX	Mistura
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (Espectroscopia do Efeito Nuclear Overhauser)
NS	Number of Scans (Número de varreduras)
OCP	Óleo de Copaíba Puro
P90	Pulso de 90
PA	Pará
PC	Principal Component (Componente Principal)
PCA	Principal Component Analysis (Análise do Componente Principal)
PPM	Partes Por Milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN-2D	Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional
SP	<i>Copaifera</i> sp.
sp. ou spp.	Espécie ou espécies indefinidas
t	triplete
T1	Tempo de Relaxação Longitudinal
TD	Timer Domain (número de pontos)
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	TOTAL Correlation Spectroscopy (Espectroscopia de Correlação Total)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
μL	Microlitros
μs	Microssegundos
δ	Deslocamento Químico
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
MHz	Mega Hertz
mg	Miligramma
mm	Milímetro
s	Segundos
T	Tesla
W	Watts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1. Descrição e preparo da amostra.....	17
2.2. Análise de RMN.....	19
2.3. Processamento dos espectros.....	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	21
4. CONCLUSÃO.....	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
Anexo I – Espectros de RMN bidimensionais da amostra de <i>Copaifera langsdorffii</i> OCP-02.	50
Anexo II – Espectros de RMN bidimensionais da amostra de <i>Copaifera</i> sp. OCP- 18.	55

1. INTRODUÇÃO

Árvores comumente conhecidas como "árvore de copaíba" são plantas que pertencem à família *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinoideae* e gênero *Copaifera* sp. e que apresentam no interior do seu tronco um óleo-resina ou bálsamo com conhecidas propriedades medicinais, cosméticas e industriais. A árvore de copaíba é comumente encontrada na América Latina e África Ocidental.¹ É uma árvore nativa e encontrada em várias regiões do Brasil. Dentro do gênero *Copaifera* existem várias espécies, porém, as mais encontradas no Brasil são: *Copaifera officinalis* L., *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera confertiflora*, *Copaifera langsdorffii*, *Copaifera cariacea* e *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke.¹ Além disso, poucas espécies foram estudadas quimicamente e as análises se limitam ao óleo-resina.²

O líquido viscoso extraído do tronco da árvore de copaíba é chamado de óleo-resina por se tratar de um exsudato composto por ácidos resinosos, além de outros compostos voláteis. A variedade dos componentes do óleo natural da copaíba está relacionada à fatores abióticos, como por exemplo a sazonalidade ou o local em que foi extraído.³ A composição química que se sobressai na maioria dos óleos-resinas de copaíba é de sesquiterpenos como o α -humuleno, α - e β -selineno, β -bisaboleno, β -cariofileno, óxido de cariofileno e ácido caurenóico, dentre os quais podem apresentar propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, bactericidas e insetífugos.^{2,3} Devido a esses efeitos medicinais, o óleo de copaíba tem sido utilizado na medicina popular.²

A crescente utilização desse recurso florestal torna necessário um maior controle de qualidade do óleo comercializado. Contudo, esse maior controle é dificultado pelas variações que podem ocorrer na composição do óleo devido a existência de espécies do gênero *Copaifera*. Dessa forma, é importante conhecer a espécie da qual o óleo de copaíba foi extraído, para assim poder garantir as propriedades que este pode oferecer em função dos componentes que possui. Porém, a alta complexidade e variabilidade de composição encontrada nos óleos de copaíba são um desafio para o desenvolvimento de métodos analíticos que sejam capazes de suprir essa demanda.

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica que vem sendo utilizada com sucesso no controle de produtos com matrizes complexas⁴, como é o caso do óleo de copaíba.⁵ Os espectros de RMN podem fornecer dados sobre a composição da mistura, por meio da estrutura química dos compostos presentes na amostra de estudo, bem como sobre a concentração de cada um desses compostos.⁶

Com a riqueza de informações que o espectro de RMN possui, a análise destes espectros pode ser difícil e de alta complexidade, principalmente quando uma amostra possui na sua matriz vários compostos com deslocamentos químicos próximos que geram sobreposição de sinais.⁷ Tendo em vista a grande quantidade de sinais presentes no espectro de RMN, a quimiometria se mostra uma estratégia interessante para a análise dessa grande quantidade de dados, de forma a obter o máximo de informação útil.⁸ Dessa forma, pode-se contribuir para extração de informações importantes, que auxiliam na comparação de amostras a fim de classificar a origem, a autenticidade, dentre outras propriedades. A quimiometria tem sido um instrumento muito utilizado na química analítica atualmente, bem como em diversas outras áreas, como medicinal, computacional, nas indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias.⁸

Para um bom uso das técnicas quimiométricas é necessário que a aquisição dos dados seja feita de forma padronizada para todas as amostras. Além disso, após a aquisição dos dados, pode ser necessária a realização de um pré-processamento. No caso das análises por RMN, deve ser feito, por exemplo, o alinhamento dos sinais das diferentes amostras, uma vez que, mesmo que as análises tenham sido realizadas de forma padronizadas, existem interferentes que podem causar alterações, mesmo que mínimas, de uma aquisição para outra.⁷ Outro pré-processamento que pode ser realizado é o ajuste da relação sinal-ruído por meio de método *binning*. Porém, esse método deve ser usado com cuidado, para que informações importantes dos espectros não sejam perdidas.

A análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) é um dos modelos de análise exploratória e reconhecimento de padrões mais usados na quimiometria. O modelo tem como objetivo reduzir o número de dimensões/variáveis do conjunto de dados, sem perder informações

relevantes. A intenção de reduzir é combinar variáveis originais que apresentam correlação entre si, para produzir novas variáveis que facilitem a análise dos dados adquiridos.⁹ A PCA pode ainda ajudar na identificação de padrões de similaridade entre as amostras e variáveis.⁹

Neste trabalho, as técnicas de RMN e PCA foram utilizadas para o reconhecimento de padrões de amostras de óleos de copaíba de diferentes espécies, origens de extração ou venda. Os óleos analisados foram extraídos ou comprados em diferentes regiões do Brasil que possuem clima, vegetação e solo diferentes e que, portanto, podem influenciar na composição do óleo. Por meio das diferenças observadas, esse trabalho busca caracterizar os óleos de diversas regiões e possibilitar comparações na análise de amostras futuras. Além disso, após as análises quimiométricas, esse trabalho se propôs a identificar a estrutura das moléculas que permitam a diferenciação do óleo obtido da espécie de *Copaifera langsdorffii* daquele obtido de outras espécies de *Copaifera* (*Copaifera* sp.) por meio dos espectros de RMN bidimensionais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Descrição e preparo da amostra

Neste trabalho, foram estudadas 26 amostras de óleo de copaíba puro (Figura 1), extraído ou comprado de diferentes regiões do Brasil: 1 amostra do Distrito Federal, 13 amostras do estado de Goiás; 1 amostra de Minas Gerais, 2 amostras do Pará, 4 amostras do Acre. Além disso, também foram analisadas 4 amostras adquiridas em comércio eletrônico e, portanto, de espécie e região desconhecidas, e 1 amostra composta pela mistura das amostras do Centro Oeste e Minas Gerais. Além das informações referentes à localidade, das 26 amostras disponíveis, aquelas numeradas de 1 a 19 são da espécie *Copaifera langsdorffii*, enquanto as numeradas 20 a 26 são pertencentes a outra(s) espécie(s), sendo deste momento em diante identificadas como *Copaifera* sp. Na Tabela 1 encontram-se os dados de cada amostra analisada.

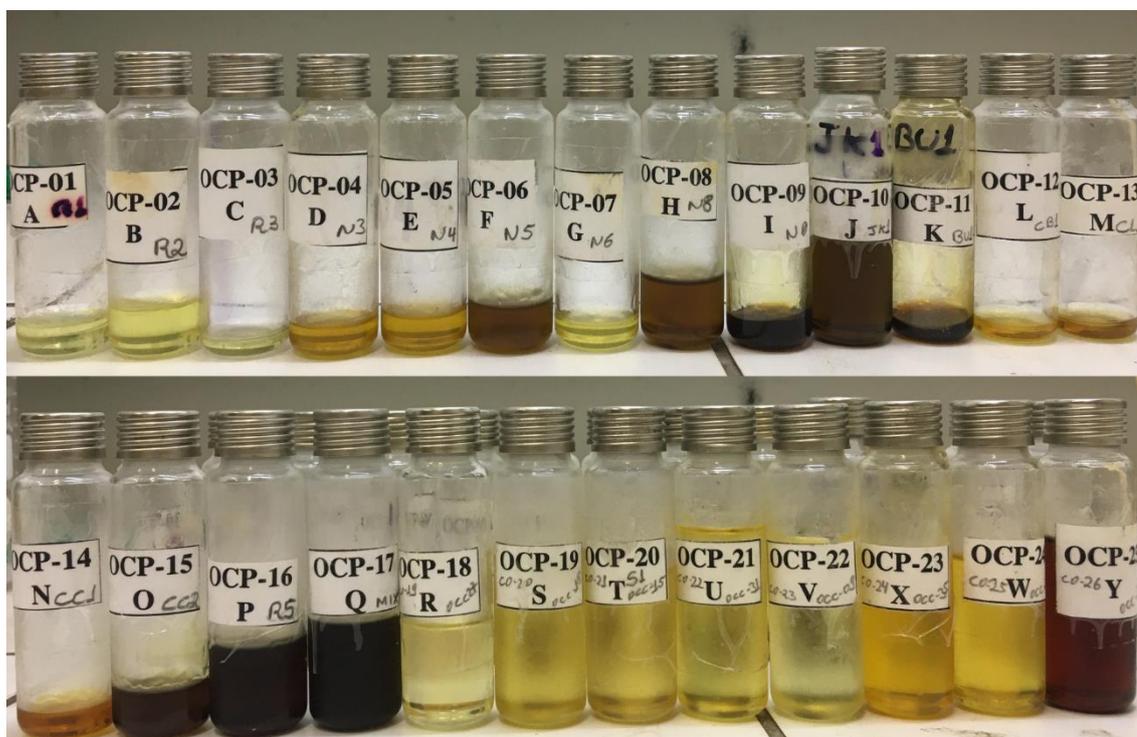


Figura 1. Amostras de óleo de copaíba puro utilizadas nas análises.

Tabela 1. Informações de aquisição, origem e espécie das 26 amostras de óleo de copaíba analisadas.

OCP	Forma de Aquisição	Origem	Espécie
01	Coletado diretamente do tronco	Formosa - GO	<i>C. langsdorffii</i>
02	Coletado diretamente do tronco	Formosa – GO	<i>C. langsdorffii</i>
03	Coletado diretamente do tronco	Formosa – GO	<i>C. langsdorffii</i>
04	Coletado diretamente do tronco	Formosa – GO	<i>C. langsdorffii</i>
05	Coletado diretamente do tronco	Formosa – GO	<i>C. langsdorffii</i>
06	Coletado diretamente do tronco	Formosa – GO	<i>C. langsdorffii</i>
07	Coletado diretamente do tronco	Formosa – GO	<i>C. langsdorffii</i>
08	Coletado diretamente do tronco	Formosa – GO	<i>C. langsdorffii</i>
09	Adquirido de extrativista	Formosa – GO	<i>C. langsdorffii</i>
10	Adquirido de extrativista	Formosa – GO	<i>C. langsdorffii</i>
11	Adquirido de extrativista	Buritis – MG	<i>C. langsdorffii</i>
12	Adquirido de extrativista	Cabeceiras – GO	<i>C. langsdorffii</i>
13	Adquirido na feira	Planaltina – DF	<i>C. langsdorffii</i>
14	Adquirido de extrativista	São Domingos – GO	<i>C. langsdorffii</i>
15	Adquirido de extrativista	São Domingos – GO	<i>C. langsdorffii</i>
16	Adquirido de extrativista	Formosa – GO	<i>C. langsdorffii</i>
17	Mistura das amostras acima	Mistura	<i>C. langsdorffii</i>
18	Adquirido na feira	Rio Branco – AC	<i>Copaifera</i> sp.
19	Adquirido no comércio eletrônico	Indefinida	<i>Copaifera</i> sp.
20	Adquirido de extrativista	Santarém – PA	<i>Copaifera</i> sp.
21	Adquirido de extrativista	Santarém – PA	<i>Copaifera</i> sp.
22	Adquirido na feira	Rio Branco - AC	<i>Copaifera</i> sp.
23	Adquirido no comércio eletrônico	Rio Branco – AC	<i>Copaifera</i> sp.
24	Adquirido de extrativista	Indefinida	<i>Copaifera</i> sp.
25	Adquirido no comércio eletrônico	Indefinida	<i>Copaifera</i> sp.
26	Adquirido na feira	Rio Branco – AC	<i>Copaifera</i> sp.

Por ser uma matriz complexa, com a presença de uma grande variedade de terpenos, a solubilização do óleo de copaíba se mostrou difícil. Assim, foram realizados testes de proporção entre a amostra e o solvente CDCl_3 , até que fosse encontrada uma proporção, entre as massas de amostra e solvente, em que toda a amostra fosse solubilizada.

As amostras de óleos de copaíba foram pesadas entre 81 e 99 mg ($\pm 0,01$ mg) em eppendorfs utilizando uma balança XP205 da Mettler Toledo. Aos eppendorfs foram adicionadas entre 400 e 500 μL do solvente CDCl_3 com uma seringa de vidro. O clorofórmio deuterado (CDCl_3) é um solvente volátil, portanto a proporcionalidade entre amostra e solvente foi garantida pela massa de ambos.

A solubilização do óleo se mostrou rápida, de modo que não foi necessário o uso de banho ultrassônico.

As amostras OCP-02 e OCP-18, posteriormente utilizadas para identificar a estrutura de moléculas de forma a diferenciar as espécies de *Copaifera langsdorffii*, foram preparadas da mesma forma, porém com adição de TMS (Tetrametilsilano).

2.2. Análise de RMN

Os espectros monodimensionais de ^1H e ^{13}C e bidimensionais (^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^1H NOESY) de RMN foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Ascend III HD 600 operando em campo magnético de 14 T e, portanto, à frequência de 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C . O espectrômetro de RMN é equipado com sonda BBFO (5mm) e está situado no Laboratório de RMN, do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília. Inicialmente foram realizados testes para avaliar os parâmetros de aquisição que trariam melhores resultados (espectros bem resolvidos) em menor tempo possível.

Os parâmetros ajustados foram Pulso de 90 (P90) que é o tempo necessário para aplicação da radiofrequência em uma frequência ideal para ter uma excitação de maior quantidade de núcleos. Dummy Scans (DS), definido como o número de varreduras fictícias, não acumuladas ao FID. São usadas para alcançar condições de estado estacionário relativas ao relaxamento t_1 . Número de Varreduras (Number of Scans - NS), número de espectros acumulados. Número de pontos (Time domain - TD) se refere ao número de pontos brutos a serem adquiridos. Quanto maior o TD, maior a resolução, porém maior o tempo de aquisição. Portanto, foi necessário estabelecer um TD cujo espectro obtido apresentasse boa resolução com um tempo razoável de aquisição. Tempo de espera (D1) é o atraso entre uma varredura e outra. Os valores são citados na Tabela 2.

Tabela 2. Informações dos parâmetros usados na aquisição dos espectros de RMN.

	¹ H	¹³ C	HMBC	HSQC	COSY	NOESY	TOCSY
P90*	12µs	12µs	12µs	12µs	12µs	12µs	12µs
DS	8	128	64	64	64	64	64
NS	32	512	16	16	8	8	8
TD	65536	131072	8192 e 1024	2048 e 1024	4096 e 768	4096 e 768	4096 e 768
D1	2s	0,5s	1s	1s	1s	1s	1s

*a 75W

2.3. Processamento dos espectros

O processamento dos espectros de RMN foi realizado no programa TopSpin 4.0.7. Os espectros utilizados nas análises quimiométricas foram alinhados pelo sinal do solvente (CDCl₃). Os espectros utilizados para as análises estruturais foram alinhados pelo sinal de TMS. Também foram ajustadas a fase e linha de base de cada espectros.

No programa MestreNova 6.0.2-5475, foi feito um processamento com binning de 0,005 ppm. Os dados foram salvos no formato .txt e exportados para uma planilha no formato .xlsx. A planilha foi importada no programa MatLab R2017a, onde foi calculada a PCA e a Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA, do inglês Hierarchical Cluster Analysis) através do pacote computacional PLS-Toolbox 8.81 para comparação das amostras, os quais empregaram o pré-processamento centrado na média (*mean-centering*).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os testes de dissolução da amostra em CDCl_3 mostraram que a melhor proporção para análise de RMN era de 1:7,5 (m/m) de amostra:solvente. O ajuste foi realizado pela massa de cada amostra, ou seja, primeiramente a amostra foi pesada e posteriormente a massa do solvente foi adicionada na proporção indicada.

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 2) apresentaram uma grande sobreposição de sinais na região entre 0,50 e 2,70 ppm, o que dificulta a observação de possíveis diferenças entre as amostras. Em contrapartida, na região entre 6,00 e 7,50 ppm foi possível observar diferenças no deslocamento químico e na intensidade de alguns sinais que permitiram caracterizar a presença de algum terpeno que diferencie as espécies (destaque da Figura 2).

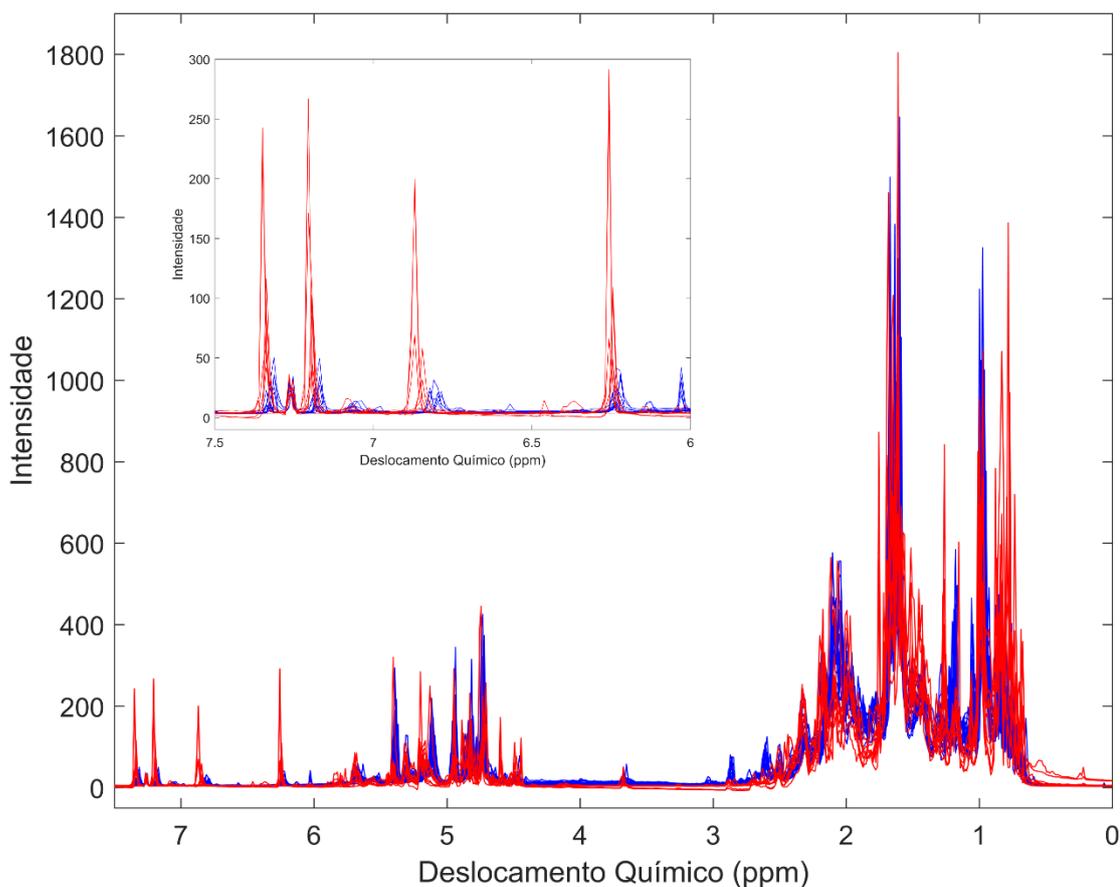


Figura 2. Espectros de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) das amostras de óleo de copaíba. (Azul) espectros das amostras da espécie *Copaifera langsdorffii* e (vermelho) espectros de *Copaifera* spp. Em destaque região de deslocamento químico entre 6,00 e 7,50 ppm.

Já nos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 3), as diferenças espectrais foram mais facilmente observadas na região de 60 ppm e entre 160 e 190 ppm, que também são regiões características de sinais de terpenos.

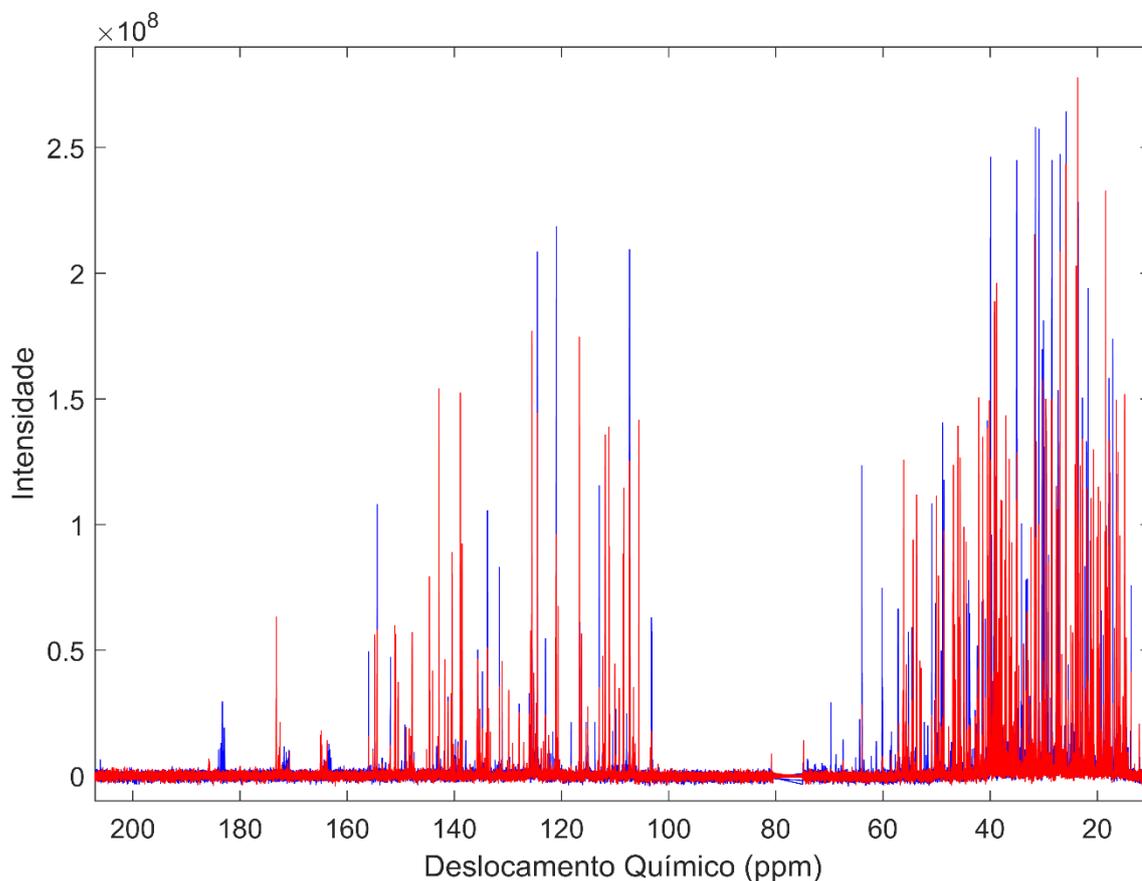


Figura 3. Espectros de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) das amostras de óleo de copaíba com supressão do sinal do solvente. (Azul) espectros das amostras da espécie *Copaifera langsdorffii* e (vermelho) espectros de *Copaifera* spp.

Para uma afirmação mais conclusiva sobre a identidade do terpeno, foi necessária a realização de experimentos de RMN bidimensionais, como por exemplo experimentos ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC.

Com a comparação entre os espectros de RMN, foi possível notar algumas diferenças importantes. Para obter mais detalhes e confirmar a existência de padrões entre as amostras, foram construídos dendrogramas com os dados dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para avaliar o agrupamento das amostras com base em sua similaridade.

As amostras foram nomeadas conforme a espécie e a região em que foram adquiridas ou extraídas. No dendrograma construído a partir dos dados dos espectros de RMN de ^1H (Figura 4), foi observada uma quase total separação das amostras de espécie *Copaifera langsdorffii* das amostras de *Copaifera* sp. Além disso, pôde-se observar a separação por regiões: amostras provenientes do Centro-Oeste, essencialmente as amostras de Goiás e uma amostra do Distrito Federal, e outra de Minas Gerais se agrupam, enquanto as amostras do Acre e Pará, que são da região Norte, tendem a ficar mais próximas, demonstrando terem mais similaridade.

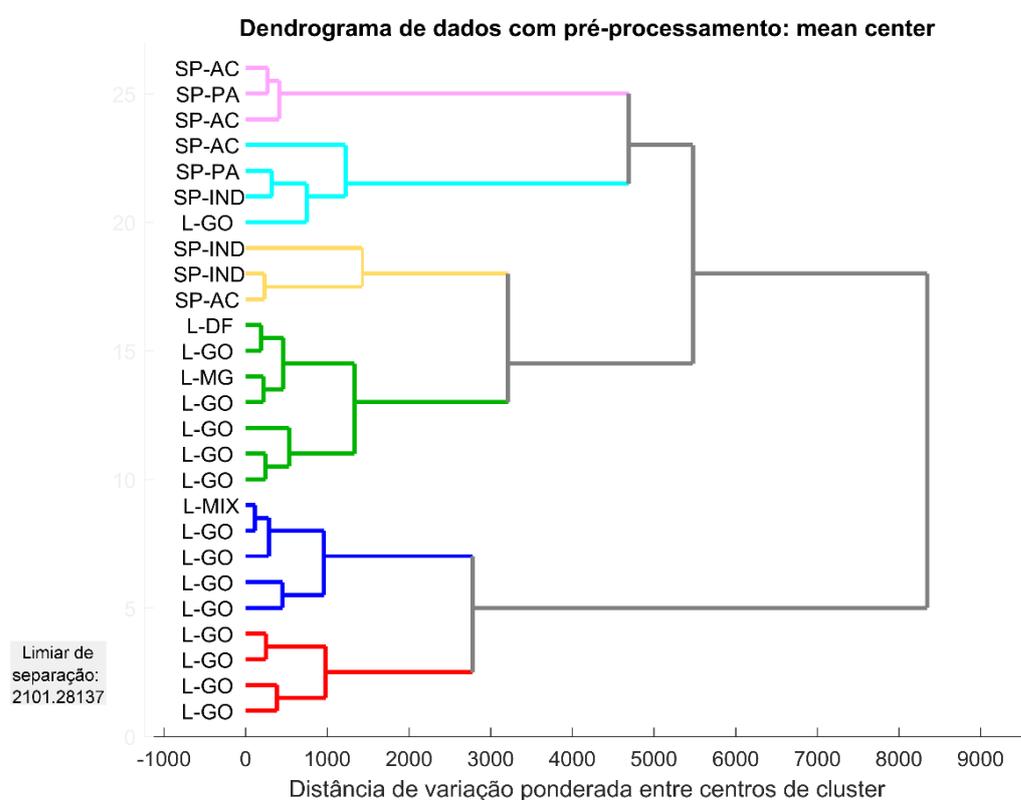


Figura 4. Dendrograma obtido a partir dos dados dos espectros de RMN de ^1H com pré-processamento *mean center*, com separação majoritária das amostras em clusters de acordo com suas características. (L) indica as amostras de *Copaifera langsdorffii*, (SP) indica as amostras de outras espécies, e das regiões Acre (AC), Pará (PA), Goiás (GO), mistura de amostras do Goiás (MIX), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG) e amostras compradas online de origem e espécies indefinidas (IND).

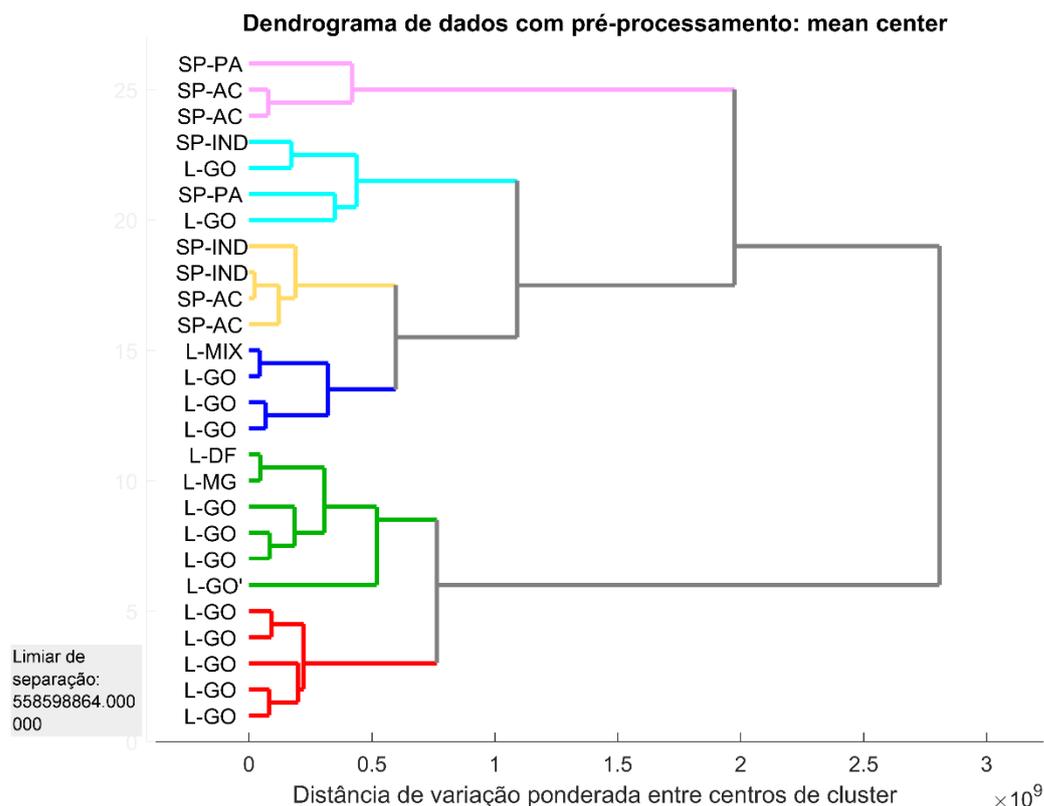


Figura 5. Dendrograma obtido a partir dos dados dos espectros de RMN de ^{13}C com pré-processamento *mean center*, com separação majoritária das amostras em clusters de acordo com suas características. (L) indica as amostras de *Copaifera langsdorffii*, (SP) indica as amostras de outras espécies, e das regiões Acre (AC), Pará (PA), Goiás (GO), mistura de amostras do Goiás (MIX), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG) e amostras compradas online de origem e espécies indefinidas (IND).

De forma semelhante, no dendrograma obtido a partir dos dados de RMN de ^{13}C (Figura 5), percebeu-se uma separação principal entre as espécies e uma separação considerável por região. Os resultados da HCA sugerem, que do ponto de vista de separação por espécies e por origem, há pouca diferença entre usar os dados de RMN de ^1H e ^{13}C , visto que os resultados obtidos são semelhantes.

Após a análise de HCA, foram analisados os gráficos de PCA, tanto dos dados de RMN de ^1H quanto de ^{13}C (Figuras 6 e 7). Uma diferença observada entre os dois conjuntos de dados foi no número de componentes principais necessárias para explicar a informação dos espectros. Com os dados dos espectros de RMN de ^1H , foram necessárias 3 componentes principais, enquanto para os dados de RMN de ^{13}C , apenas 2 componentes principais já explicavam

as mesmas diferenças observadas nas 3 PC's dos dados de ^1H . Essa diferença provavelmente se deve à maior resolução dos espectros de RMN de ^{13}C .

Nos dados de RMN de ^1H , as três primeiras componentes principais explicaram 62,18% da variação das amostras. No gráfico de escores de PC1xPC2 (Figura 6), consegue-se principalmente notar a separação das amostras de acordo com as espécies. Nesse gráfico, foi possível ver as mesmas separações que ocorrem no dendrograma da Figura 4. De forma geral, amostras de *Copaifera langsdorffi* apresentaram valores mais elevados de PC1 e menores de PC2, enquanto o contrário foi observado para as amostras de *Copaifera* sp.

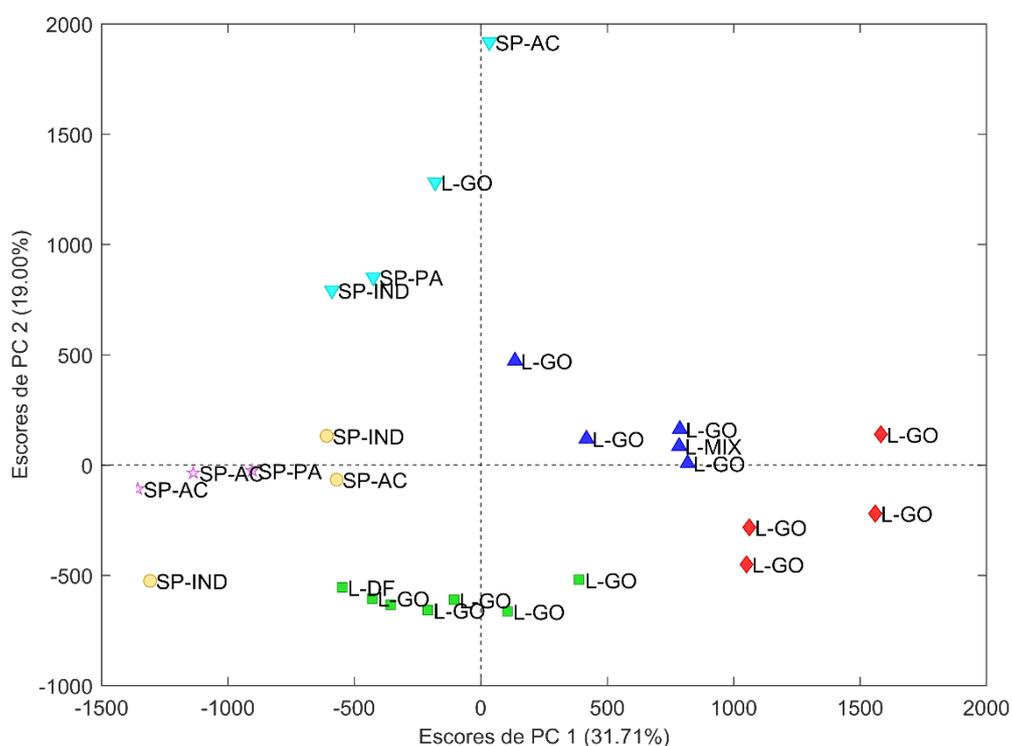


Figura 6. Escores de PC1xPC2 dos espectros de RMN de ^1H com pré-processamento *mean center*. (L) indica as amostras de *Copaifera langsdorffi*, (SP) indica as amostras de outras espécies, e das regiões Acre (AC), Pará (PA), Goiás (GO), mistura de amostras do Goiás (MIX), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG) e amostras compradas online de origem e espécies indefinidas (IND). Símbolos e cores representam os clusters identificados na Figura 3.

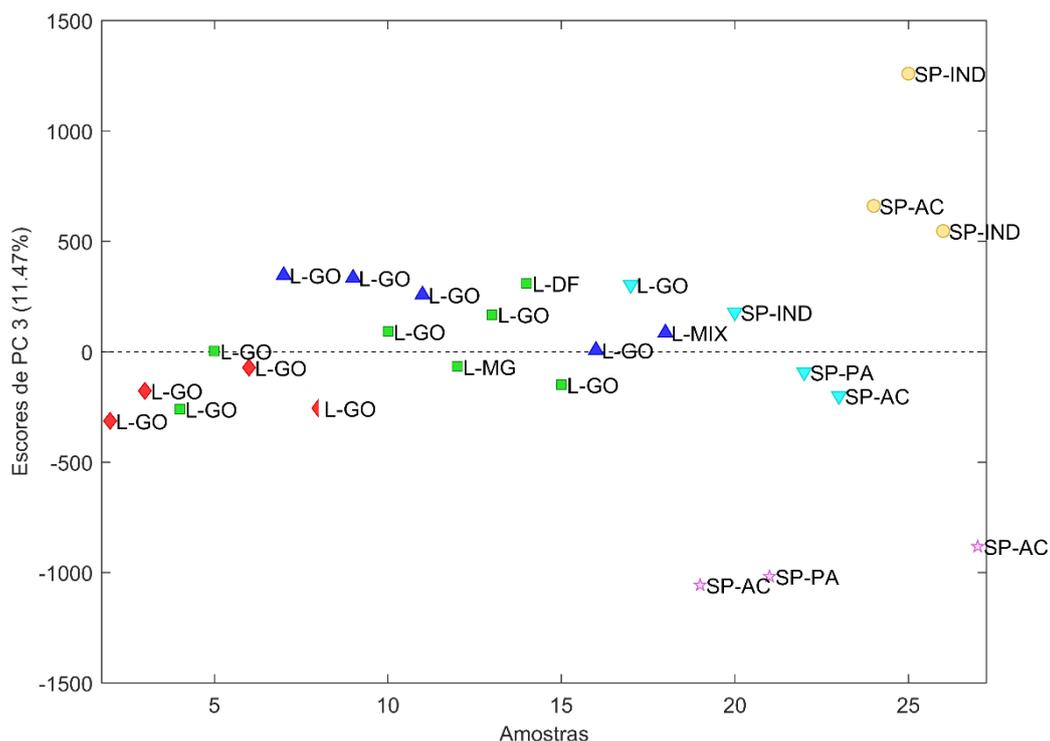


Figura 7. Escores de PC3 (B) dos espectros de RMN de ^1H com pré-processamento *mean center*. (L) indica as amostras de *Copaifera langsdorffii*, (SP) indica as amostras de outras espécies, e das regiões Acre (AC), Pará (PA), Goiás (GO), mistura de amostras do Goiás (MIX), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG) e amostras compradas online de origem e espécies indefinidas (IND). Símbolos e cores representam os clusters identificados na Figura 4.

A informação presente em PC3 (Figura 7) explica o comportamento, principalmente de 6 amostras, que se separam em dois grupos de três amostras. Essas amostras parecem se distinguir das demais em função da região de coleta, visto que tanto na PC1 quanto na PC2, as amostras indicadas por estrelas roxas e círculos amarelos estão próximas (Figura 7).

Através dos gráficos de pesos de cada componente principal, foi possível observar quais sinais tem maior influência nos escores e assim associar as diferenças apresentadas nas Figuras 2, 3, 4 e 5. O gráfico de escores de PC1xPC2 (Figura 6), separa mais as amostras de acordo com as espécies, sendo os valores positivos característicos das amostras da espécie *Copaifera langsdorffii*. Dessa forma, os sinais do gráfico de pesos que são positivos em PC1 e negativos em PC2 são os mais característicos dessa espécie. Em contrapartida, os sinais que são negativos na PC1 e positivos na PC2 caracterizaram mais as amostras de *Copaifera* sp. No gráfico de pesos da PC1

(Figura 8), foi possível notar uma maior diferença nos sinais entre 6,00 e 7,50 ppm e entre 0,00 e 3,00 ppm que não foram observadas na Figura 1 devido à sobreposição. Essa informação destaca a importância da PCA em identificar as variáveis (deslocamentos químicos) responsáveis pela variação observada no gráfico de escores.

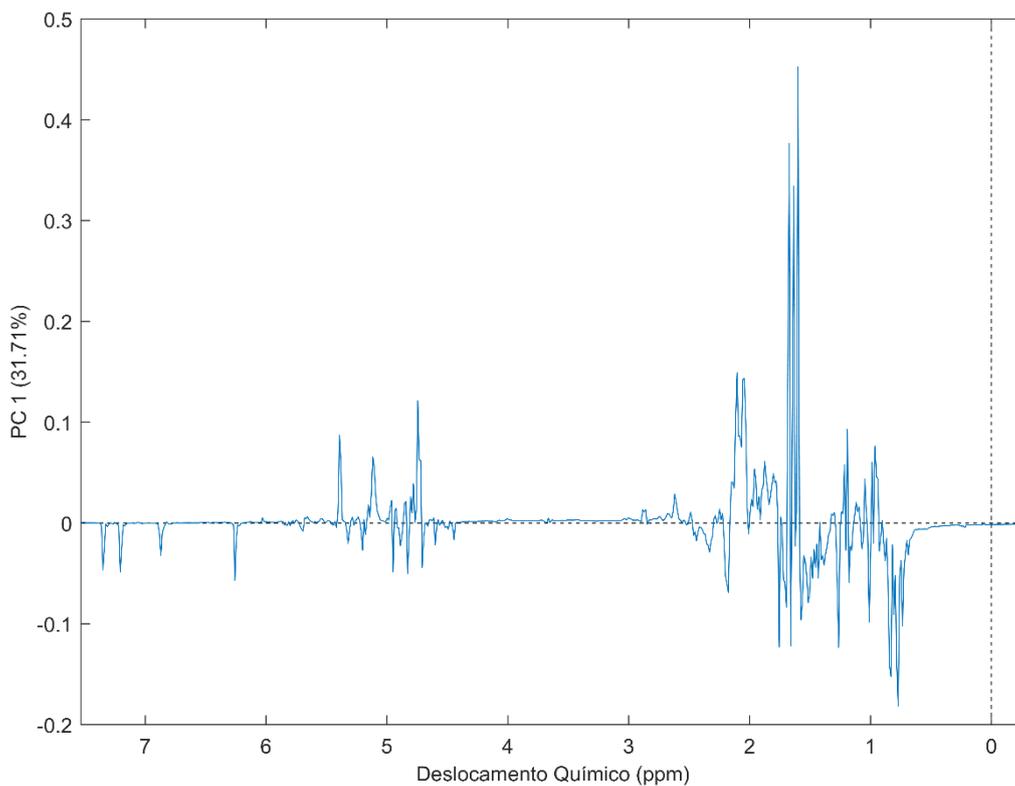


Figura 8. Gráfico de pesos da PC1 dos espectros de RMN de ^1H com pré-processamento *mean center*.

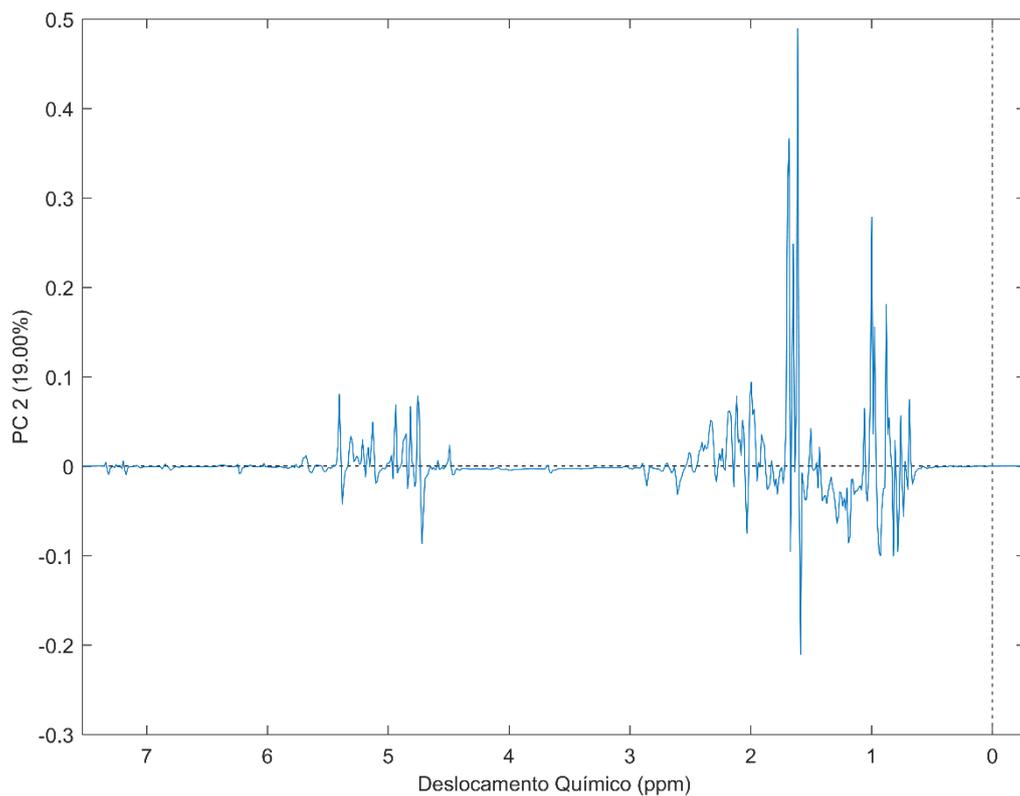


Figura 9. Gráfico de pesos da PC2 dos espectros de RMN de ^1H com pré-processamento *mean center*.

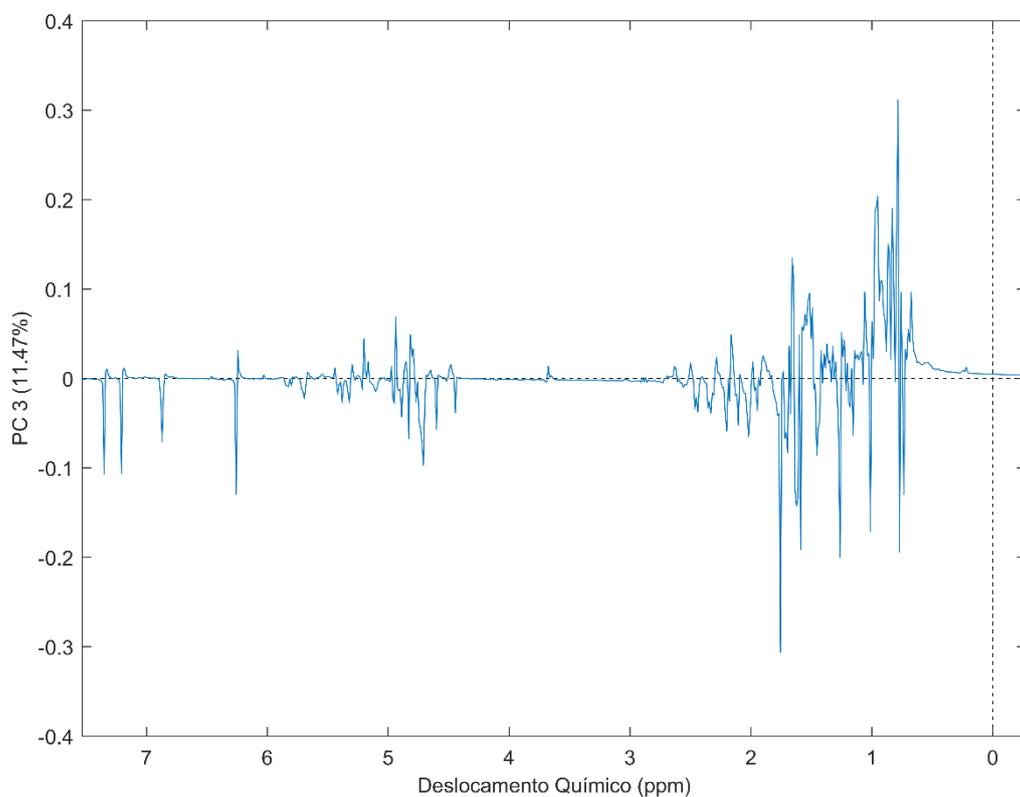


Figura 10. Gráfico de pesos da PC3 dos espectros de RMN de ^1H com pré-processamento *mean center*.

O gráfico de pesos da PC2 (Figura 9) também revelou a presença de variáveis importantes para a separação das espécies na região de maior sobreposição de sinais, as quais estão em deslocamentos químicos semelhantes aos observados em PC1, como pôde ser notado na Figura 9. A Figura 10 mostra os pesos de PC3, que parecem refletir mais a diferença entre as de *Copaifera* sp. do norte do país. Nas figuras 8, 9 e 10, observou-se a região característica entre 6,00 e 7,50 ppm como relevante, assim como alguns sinais entre 0,80 e 2,00 ppm.

No gráfico de escores de PC1xPC2 usando os dados de RMN de ^{13}C (Figura 11), que explicam 47,23% da variância dos dados, a separação ocorre essencialmente de maneira similar à observada nos dados de RMN de ^1H (Figura 6), mostrando que ambos os experimentos carregam as mesmas informações sobre a separação de espécies e origem das amostras.

Na PC1, pôde-se notar uma separação por espécie e até mesmo por região. As amostras de *Copaifera langsdorffii*, que são características das amostras do Centro-Oeste e Minas Gerais, se encontram mais na região de valores positivos. Já as amostras de *Copaifera* sp., encontradas mais no Norte do Brasil, se encontram em valores negativos. A PC2 mostra principalmente a diferença entre as espécies de *Copaifera* sp., estando em um cluster na parte superior, ou seja, positiva para PC2, em um cluster centralizado e outro nos valores negativos para PC2. Essa separação sugere a presença de espécies diferentes entre as amostras de *Copaifera* sp., sendo essa a mesma separação observada na PC3 dos dados de RMN de ^1H (Figura 7).

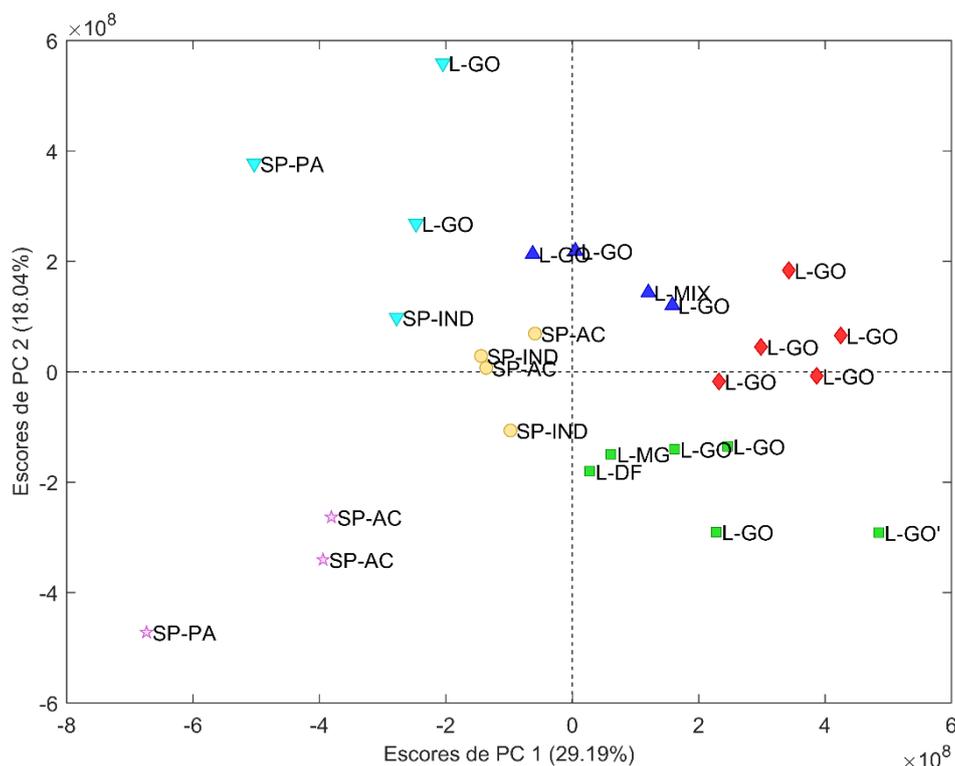


Figura 11. Escores de PC1 e PC2 dos espectros de RMN de ¹³C. (L) indica as amostras de *Copaifera langsdorffii*, (SP) indica as amostras de outras espécies, e das regiões Acre (AC), Pará (PA), Goiás (GO), mistura de amostras do Goiás (MIX), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG) e amostras compradas online de origem e espécies indefinidas (IND). Símbolos e cores representam os clusters identificados na Figura 4.

Uma vez que o gráfico de escores de PC1 apresentou uma maior separação entre as espécies, os valores de escores mais positivos para PC1 caracterizam as amostras da espécie *Copaifera langsdorffii*. Logo, no gráfico de pesos apresentado na Figura 12, apesar da dificuldade de visualização das diferenças devido a densidade de sinais, foi possível observar uma variação de intensidades, que pode ser referente à algum terpeno que esteja presente de forma distinta na espécie *Copaifera langsdorffii*. Tendo em vista que os escores apenas de PC2 não permitiram separar bem as amostras por espécie ou região, o gráfico de pesos apresentado da Figura 13 foi de mais difícil interpretação. Contudo, deve-se destacar que a informação de PC2 junto com PC1 permitem separar é bem duas amostras provenientes do Acre, duas do Pará e uma de Goiás, indicando que PC2 que explica mais a diferença entre as amostras de *Copaifera sp.*(Figura 11).

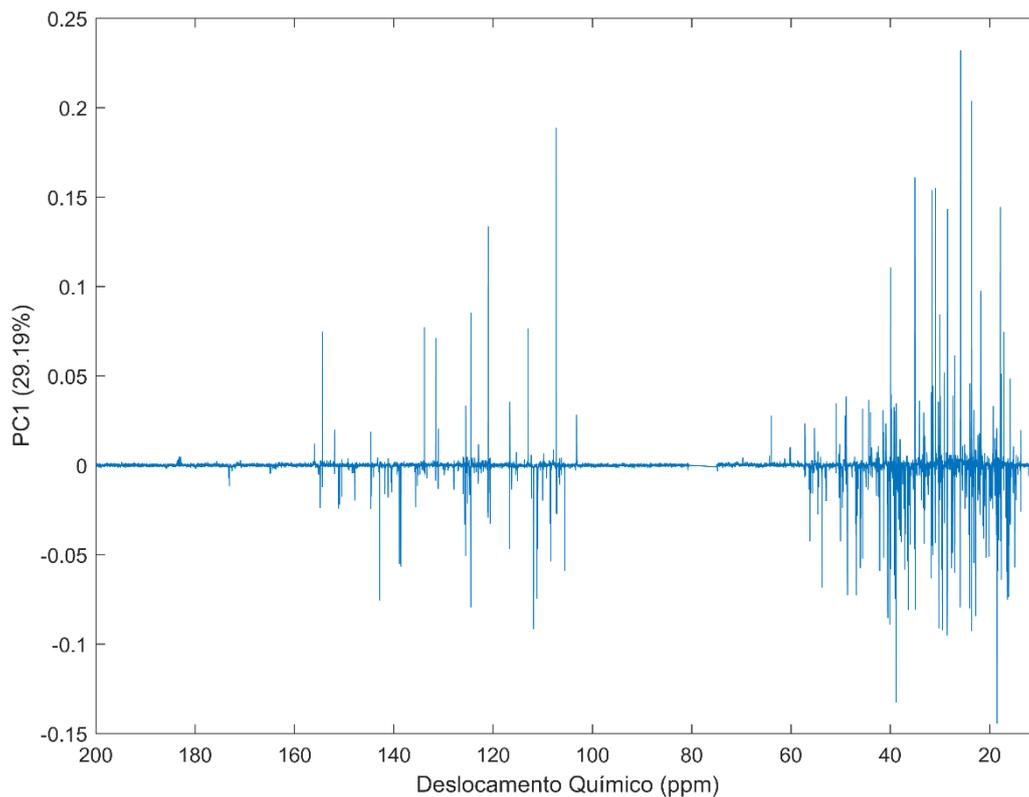


Figura 12. Gráfico de pesos da PC1 dos espectros de RMN de ^{13}C com pré-processamento *mean center*.

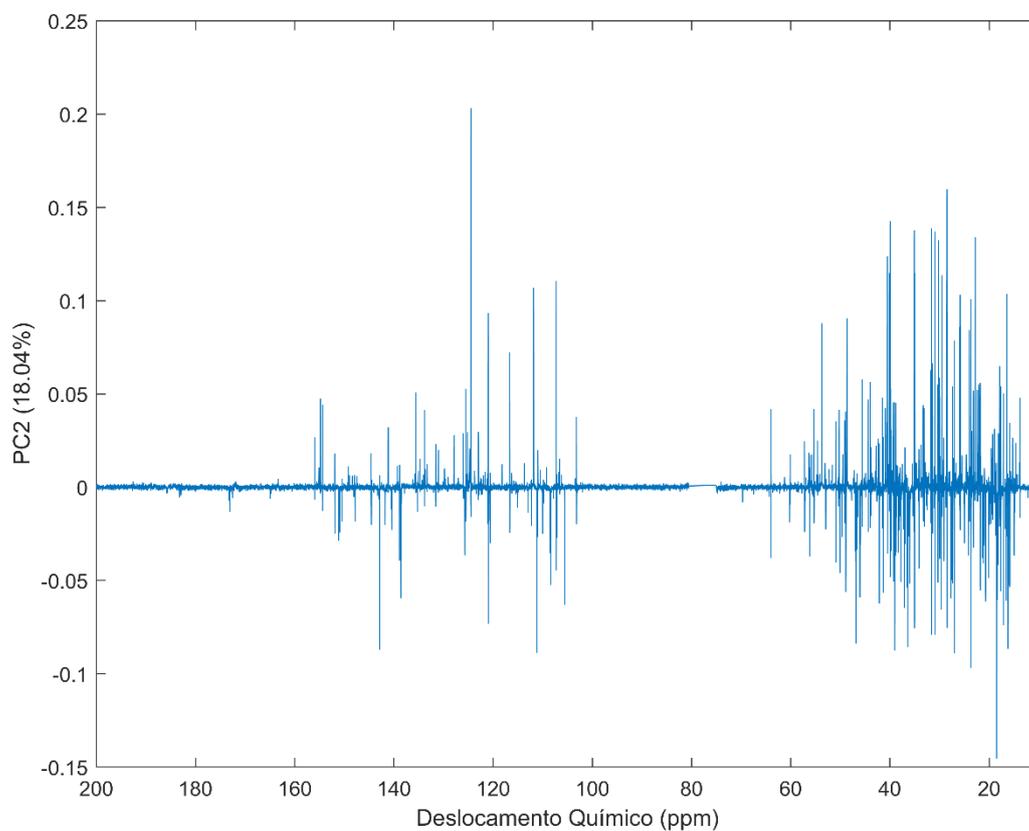


Figura 13. Gráfico de pesos da PC2 dos espectros de RMN de ^{13}C com pré-processamento *mean center*.

Após as análises quimiométricas, foi possível identificar os sinais de RMN de compostos responsáveis pela diferenciação das espécies de *Copaifera langsdorffii*. Com o objetivo de identificar a estrutura das moléculas responsáveis por essa diferenciação, foram adquiridos os espectros bidimensionais de RMN (^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^1H NOESY) das amostras OCP-02 e OCP-18. Essas amostras foram escolhidas conforme observações nos gráficos de pesos (Figuras 8, 9, 10, 12 e 13). A OCP-02 que é uma amostra de óleo de copaíba obtida de *Copaifera langsdorffii* e foi escolhida aleatoriamente entre as amostras da mesma espécie que possuía sinais de ^1H entre 2,5 e 3,0 ppm mais intensos e, assim, tivesse sinais mais evidentes nos espectros mono- e bidimensionais. A amostra OCP-18, que não possui espécie definida (*Copaifera* sp.), foi escolhida entre as amostras com maior intensidade nos sinais de RMN de ^1H acima de 6,0 ppm e abaixo de 1,0 ppm, além de sinais mais intensos no espectro de ^{13}C acima de 180 ppm e na região entre 100 e 110 ppm e, da mesma forma como descrito anteriormente, tenham sinais que facilitaram a análise dos espectros. Os espectros bidimensionais obtidos estão apresentados no Anexo 1 e 2.

Nas Figuras 14 e 15 estão apresentados os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , respectivamente, obtidos para a amostra OCP-18 do óleo de copaíba de espécie indefinida.

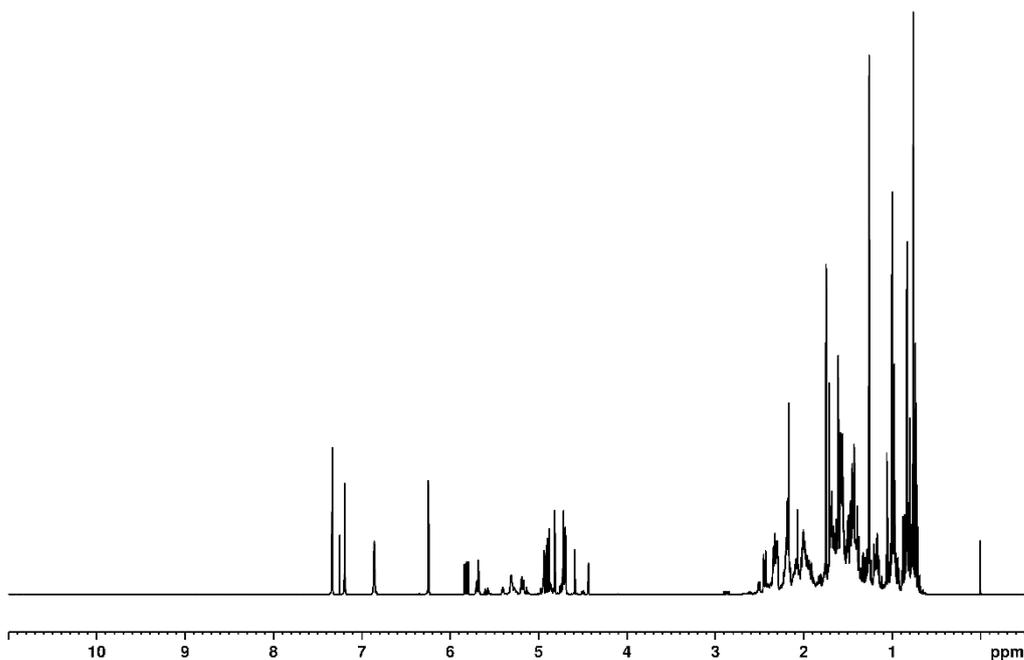


Figura 14. Espectro de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra OCP-18 do óleo de copaíba obtido de uma espécie indefinida (*Copaifera* sp.).

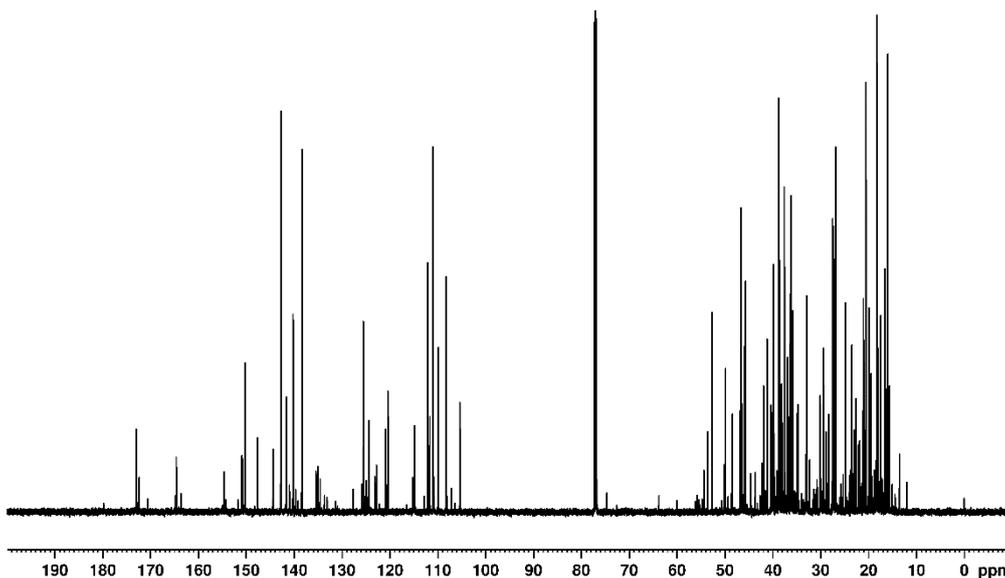


Figura 15. Espectro de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da amostra OCP-18 do óleo de copaíba obtido de uma espécie indefinida (*Copaifera* sp.).

Pela análise dos espectros mono- (Figura 14 e 15) e bidimensionais (Anexo 1) foi possível identificar que o ácido hardwickiico, que está entre um dos diterpenos predominantes do óleo de copaíba¹⁰, foi um componente importante na diferenciação da espécie desconhecida. Na Figura 16 encontra-se a estrutura

e numeração do ácido mencionado. Na Tabela 3 são apresentados os deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios pertencentes à estrutura, além das correlações existentes, tanto ^1H - ^1H quanto ^{13}C - ^1H , que confirmam que estes sinais pertencerem ao ácido hardwickiico. Além disso, a comparação com dados da literatura, apresentada na Tabela 3, também auxiliaram na confirmação da estrutura desse composto.

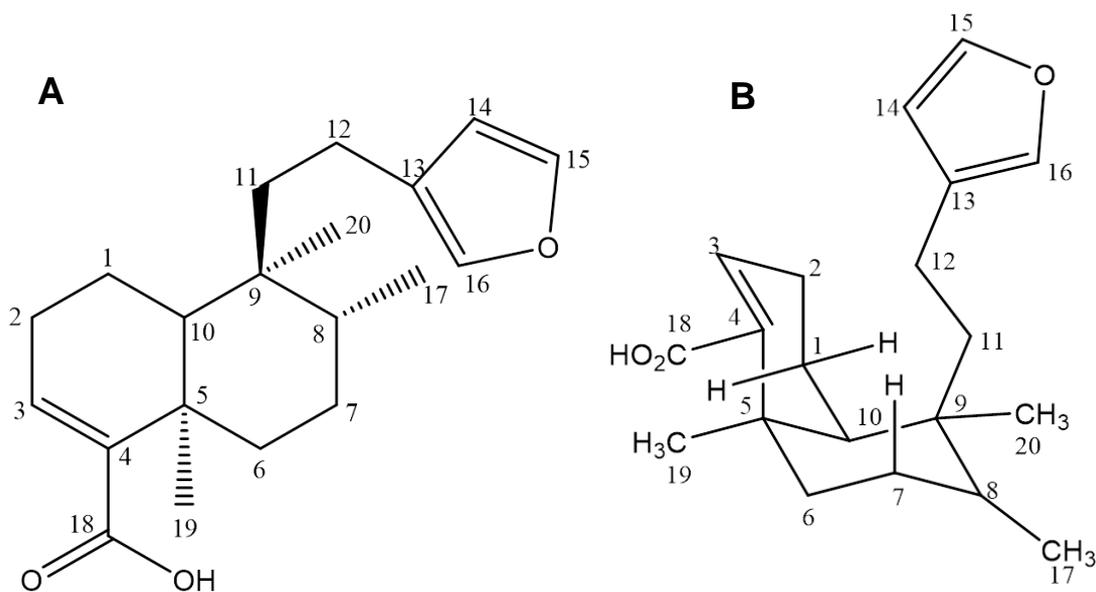


Figura 16. Estrutura bidimensional (A) e tridimensional (B) do Ácido Hardwickiico.

Tabela 3. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , dados de HMBC, COSY, NOESY e TOCSY do Ácido Hardwickiico encontrado na amostra OCP-18 e comparação com dados da literatura.¹¹

	^{13}C δ_{H} (ppm)	^1H δ_{H} (ppm) J (Hz)	HMBC	COSY	NOESY	TOCSY	^{13}C (lit) δ_{H} (ppm)	^1H (lit ¹¹) δ_{C} (ppm)
1	17,5	1,69	C-2, C-3, C-5, C-9 C-10	2,19; 2,32 ^f ; 6,86 ^f	0,76 ^f ; 2,32 ^f ; 2,19 ^f	1,38; 6,86 ^f	17,5	1,7
2	27,3	1,42	C-4			1,38	27,3	1,42
3	140,2	6,86 (dd, 2,8; 4,4)	C-2 ^f , C-4 ^f , C-5, C-18		2,17; 2,32	1,49 ^f ; 2,19; 2,30; 1,39; 1,69 ^f	140,2	6,82
4	141,6	-					141,5	-
5	37,6	-					37,6	-
6	35,9	2,45; 1,17	C-5, C-7 ^f , C-8, C-10		1,26; 2,19		35,9	2,4 1,17
7	27,5	2,19; 2,32	C-9 ^f	1,57	1,57; 1,65		27,5	sr
8	36,3	1,57	C-10, C-11, C-17, C-20		1,38; 0,83; 0,76	0,83	36,3	sr
9	38,8	-					38,9	-
10	46,7	1,38 (dd, 11,0;1,0)	C-5, C-7, C-9, C-11, C-19, C-20		1,69; 2,17; 2,32	1,69; 6,86 ^f	46,7	1,36
11	38,7	1,55; 1,65	C-12	2,32; 2,17 ^f	0,76; 0,83; 2,17; 2,32		38,7	1,52 1,64
12	18,2	2,17; 2,32	C-13, C-14, C-16 ^f			1,55; 1,65 ^f	18,2	sr
13	125,6	-					125,6	-
14	110,9	6,25 (dd, 1,6; 0,8)	C-13, C-15, C-16	7,33	7,33 ^f	7,33	111,0	6,23
15	142,7	7,33 (t, 1,7)	C-13, C-16				142,7	7,32
16	138,4	7,19 (largo)	C-13				138,4	7,18
17	16,0	0,83	C-6, C-7, C-9				16,0	0,81
18	173,0	-					172,5	-
19	20,5	1,26	C-4, C-5, C-6	1,17 ^f	0,76; 0,83; 1,49		20,6	1,24
20	18,3	0,76	C-9, C-11				18,3	0,74

f- sinal fraco

Como descrito anteriormente, o gráfico de pesos (Figura 8) revela uma diferença nos espectros de RMN de ^1H quanto a diferença entre espécies. Os sinais negativos na PC1 são de amostras que não são de *Copaifera langsdorffii*, logo os sinais entre 6,00 e 7,50 ppm são característicos das amostras que não tem espécie definida. A região de deslocamento químico em 6,00 e 7,50 ppm é referente a hidrogênios olefínicos em anéis. Na Figura 16, pode-se observar que a estrutura do ácido hardwickiico possui quatro hidrogênios que são ligados à carbonos de dupla ligação. O H-3 tem deslocamento químico 6,86 ppm. A faixa aproximada para hidrogênios de carbonos de dupla é entre 4,50 e 6,50 ppm devido ao efeito de anisotropia da dupla ligação. Esse hidrogênio, por estar próximo ao grupo ácido carboxílico ainda sofre uma diminuição da densidade eletrônica e da blindagem, levando a um o aumento do valor de deslocamento químico. Com os hidrogênios H-14 (δ 6,25), H-15 (δ 7,33) e H-16 (δ 7,19,) também ocorre um aumento nos valores de deslocamento químico devido a desblindagem causada pelo efeito indutivo do oxigênio. Esses são os quatro sinais da região que mais diferenciam os espectros de *Copaifera langsdorffii* das demais amostras. Com os espectros bidimensionais, é possível comprovar que esses sinais pertencem a mesma estrutura química.

Outros sinais que se intensificam nas amostras de espécie indefinida através dos gráficos de peso são os sinais com deslocamento químico abaixo de 1,00 ppm. Esses valores são característicos de hidrogênios de metilas, que também estão presentes na molécula.

Pelo espectro bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC é possível observar as correlações entre os carbonos e os hidrogênios diretamente ligados. Os sinais em região de menor sobreposição, podem ser facilmente identificados, como é o caso dos carbonos associados aos hidrogênios da região entre 6,00 e 8,00 ppm. A região que caracteriza carbonos olefínicos está localizada entre 100 e 150 ppm. A eletronegatividade, hibridização e anisotropia são fatores que interferem nos deslocamentos químicos dos sinais de carbono, assim como nos deslocamentos químicos dos sinais de hidrogênio. Os sinais dos átomos C-13 (δ 125,6) e C-14 (δ 110,9) possuem deslocamentos menores do que C-3 (δ 140,6), C-4 (δ 141,2), C-15 (δ 142,7) e C-16 (δ 138,4) justamente pela proximidade de grupos funcionais mais eletronegativos, como o ácido carboxílico e éter. Algo a

se notar é que, os espectros de RMN de ^{13}C das amostras de *Copaifera langsdorffii* não apresentam sinais entre 135,0 e 145,0 ppm. Isso sugere que o ácido hardwickiico não tem influência nessas amostras como tem na OCP-18. Porém, não é possível avaliar a ausência dessa molécula nas amostras de *Copaifera langsdorffii* devido ao baixo limite de detecção (sensibilidade) da técnica de RMN.

O experimento ^1H - ^1H TOCSY permite confirmar hidrogênios que estejam em um mesmo sistema de *spins* e, portanto, cujo acoplamento seja maior que três ligações. Isso pode ser verificado desde que não haja interrupção por um carbono quaternário ou um heteroátomo. O espectro de TOCSY auxiliou principalmente na confirmação dos hidrogênios H-10, H-1, H-2 e H-3, além dos hidrogênios H-14 e H-15.

Por meio dos valores de deslocamento químico e pelos sinais de correlação dos espectros bidimensionais, foi possível assim confirmar a estrutura do ácido hardwickiico. Os dados de RMN obtidos na literatura para o ácido hardwickiico também corroboram com a estrutura identificada.

Da mesma forma, por meio da análise dos gráficos de pesos que estão relacionados às PC's que diferencia as amostras de *Copaifera langsdorffii* das demais (Figuras 8 e 12) e dos espectros bidimensionais da amostra OCP-02 da espécie *Copaifera langsdorffii* (Anexo 2), foi possível identificar a estrutura da molécula de óxido de cariofileno. Nas Figuras 17 e 18 estão apresentados os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , respectivamente. Apesar da grande sobreposição de sinais observada no espectro de carbono, especialmente na região entre 0,5 e 2,5 ppm, com auxílio do gráfico de pesos, foi possível identificar os sinais desse sesquiterpeno.

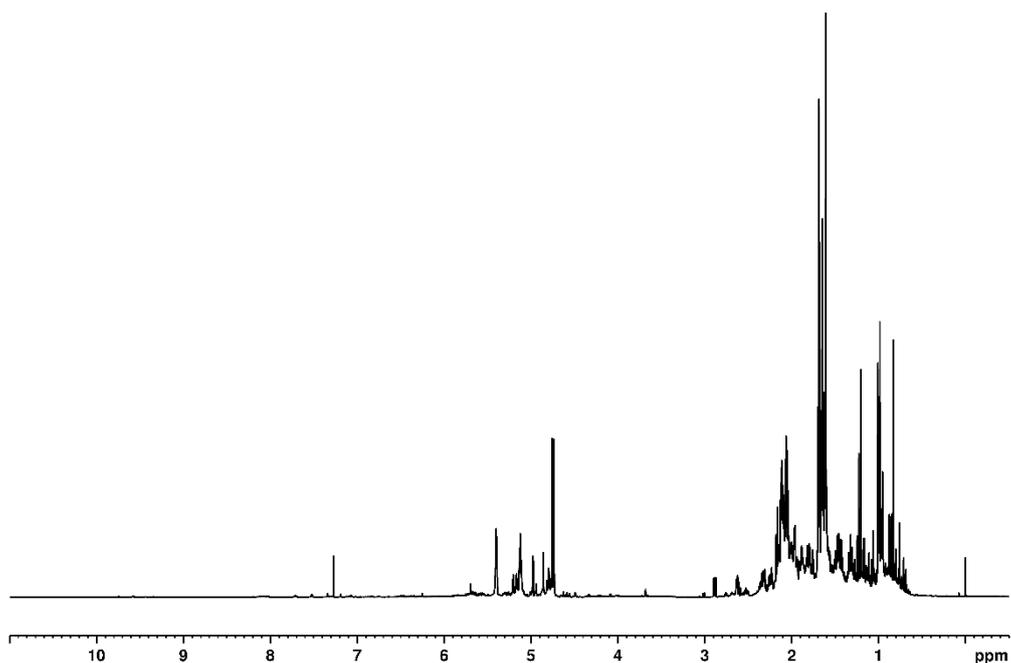


Figura 17. Espectro de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra OCP-02 do óleo de copaíba obtido da espécie *Copaifera langsdorffii*.

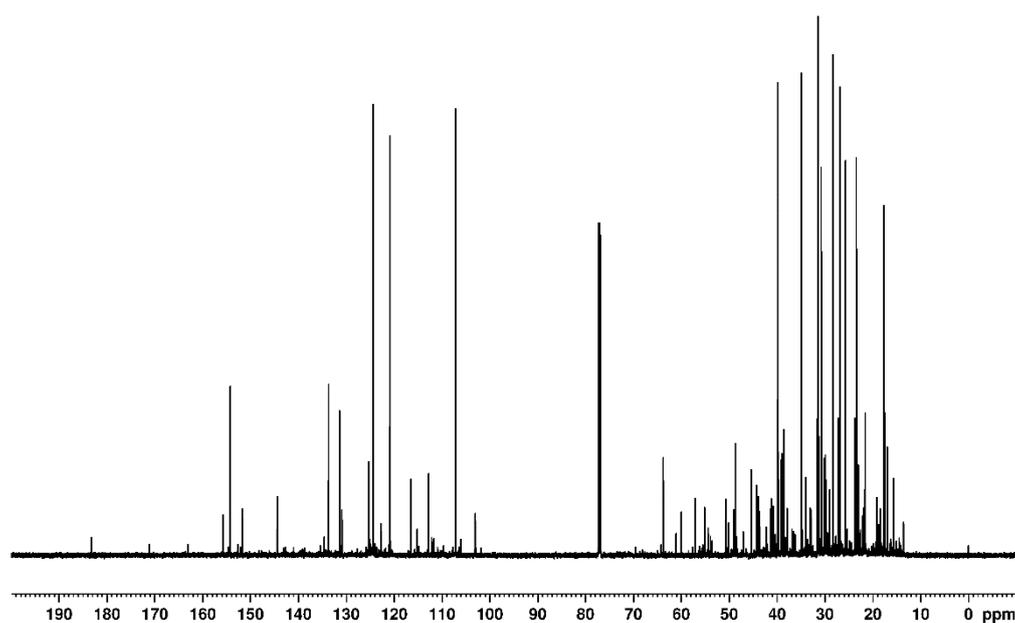


Figura 18. Espectro de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da amostra OCP-02 do óleo de copaíba obtido da espécie *Copaifera langsdorffii*.

Na Figura 19, encontra-se a estrutura e numeração do sesquiterpeno óxido cariofileno, responsável pela discriminação das amostras da espécie *Copaifera langsdorffii*. Na Tabela 4 estão apresentados os valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C pertencentes à estrutura, além das correlações existentes, tanto ^1H - ^1H quanto ^{13}C - ^1H , que comprovaram estes

sinais pertencerem ao óxido cariofileno. Além disso, a comparação com dados da literatura, apresentados na Tabela 4, também auxiliaram na confirmação da estrutura.

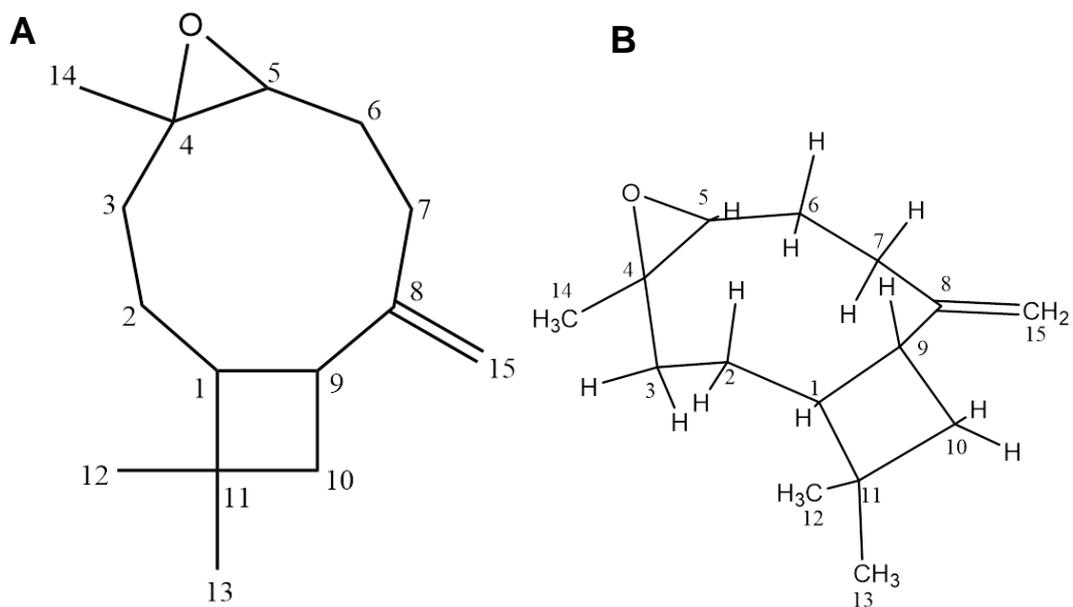


Figura 19. Estrutura bidimensional (A) e tridimensional (B) do Óxido de Cariofileno.

Tabela 4 . Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , dados de HMBC, COSY, NOESY e TOCSY do Óxido de Cariofileno encontrado na amostra OCP-02 e comparação com dados da literatura.¹²

	^{13}C δ_{H} (ppm)	^1H δ_{H} (ppm) J (Hz)	HMBC	COSY	NOESY	TOCSY	^{13}C (lit) δ_{H} (ppm)	^1H (lit ¹²) δ_{H} (ppm)
1	50,8	1,76	C-2 ^f , C-3, C-8, C-9, C-11, C- 12, C-13	1,42; 1,64 ^f	0,99 ^f ; 1,42 ^f	0,98 ^f ; 2,08 ^f ; 1,64; 1,42 ^f ; 2,61 ^f	50,70	1,77
2	27,2	1,42 1,64	C-3 ^f , C-4 ^f , C-9 ^f	0,99; 2,08		2,08; 0,99 ^f	27,19	1,43 1,64
3	39,1	0,99 2,08	C-4, C-5 ^f , C-14		1,64		39,13	0,97 2,10
4	59,9	-					59,83	-
5	63,8	2,88 (dd, 10,5; 4,3)	C-4 ^f , C-6	2,24; 1,33 ^f	0,99 ^f ; 1,33 ^f ; 1,76 ^f ; 2,24 ^f	1,33; 2,11; 2,24 ^f ; 2,34	63,75	2,88
6	30,2	1,33 2,24	C-7, C-8 ^f	2,11; 2,34			30,20	1,32 2,26
7	29,8	2,11 2,34	C-5, C-8, C-9 ^f , C-15		1,33		29,75	2,11 2,33
8	151,8	-					151,82	-
9	48,7	2,61	C-8, C-15	1,68; 1,62	1,62; 1,68	1,62; 1,68 ^f	48,72	2,62
10	39,8	1,62 1,68	C-1, C-8, C-9- C-11, C-12, C- 13				39,73	1,63 1,70
11	34,0	-					34,01	-
12	29,9	0,98	C-11, C-13				21,60	1,00
13	21,6	1,01	C-11		1,68 ^f		29,88	0,98
14	16,9	1,20	C-4, C-5		2,08 ^f		16,98	1,20
15	112,8	4,85 (d, 1,3) 4,97 (d, 1,3)	C-8		1,62 ^f		112,74	4,97 4,85

f – sinal fraco

Diferente do ácido hardwickiico, os sinais que se referem à estrutura do óxido de cariofileno são os sinais de hidrogênio positivos na PC1 do gráfico de pesos na Figura 8, assim como os sinais positivos na PC1 da Figura 12. Nos espectros de RMN de ^1H é possível perceber que os sinais entre 2,00 e 3,00 ppm e entre 4,50 e 5,50 ppm tem uma forte influência para a separação das amostras de *Copaifera langsdorffii*. Há alguns sinais entre 1,00 e 2,00 ppm que também diferenciam as amostras dessa espécie, porém é uma região de muita sobreposição de sinais e mesmo com os espectros bidimensionais é difícil associá-los a determinada molécula com precisão.

O óxido cariofileno possui um grupo epóxi e, portanto, possui carbonos que estão ligados a um oxigênio, que é um átomo mais eletronegativo e que altera o deslocamento químico de carbonos saturados para valores maiores. O valor do deslocamento químico desse grupo em geral está entre 40 e 80 ppm. Nos espectros de RMN de ^{13}C da amostra OCP-02, assim como as demais amostras de *Copaifera langsdorffii*, possuem sinais que caracterizam essas ligações (59,9 e 63,8 ppm). O grupo etóxi é facilmente identificado pois o hidrogênio ligado ao carbono próximo ao oxigênio possui um quarteto na região entre 3,20 e 3,80 ppm. No entanto, quando essa ligação faz parte de um anel, a desblindagem é menor devido à alta tensão do anel.⁷ Por esse motivo, esse sinal encontra-se entre 2,50 e 3,50 ppm, como observado para o óxido de cariofileno. O sinal do hidrogênio associado ao carbono adjacente ao oxigênio (H-5) é um duplo duplete em 2,88 ppm.

Outro sinal característico é o sinal da dupla ligação. Carbonos olefínicos têm deslocamento químico entre 100 e 150 ppm e seus hidrogênios entre 4,50 e 6,50 ppm. Sinais nessa região também foram observados nos espectros da amostra OCP-2 e são referentes ao C-8 (δ 151,8), que possivelmente possui maior deslocamento químico pela tensão do anel, e ao C-15 (δ 112,8) com seus hidrogênios em 4,85 e 4,97ppm.

Por meio dos valores de deslocamento químico e pelos sinais de correlação dos espectros bidimensionais, foi possível confirmar a estrutura do óxido de cariofileno. Os dados de RMN obtidos na literatura para o óxido de cariofileno também corroboram com a estrutura identificada.

Além do óxido de cariofileno, também foi possível identificar a estrutura do ácido caurenóico (Figura 20) na amostra OCP-02 obtida da espécie *Copaifera*

langsdorffi. Na figura 20 está apresentada a estrutura e numeração desse diterpeno. Na Tabela 5 são encontrados os valores de deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios pertencentes à estrutura, além das correlações existente, tanto ^1H - ^1H quanto ^{13}C - ^1H , que comprovaram estes sinais pertencerem ao ácido caurenóico. Além disso, a comparação com dados da literatura, apresentados na Tabela 5, também auxiliaram na confirmação da estrutura.

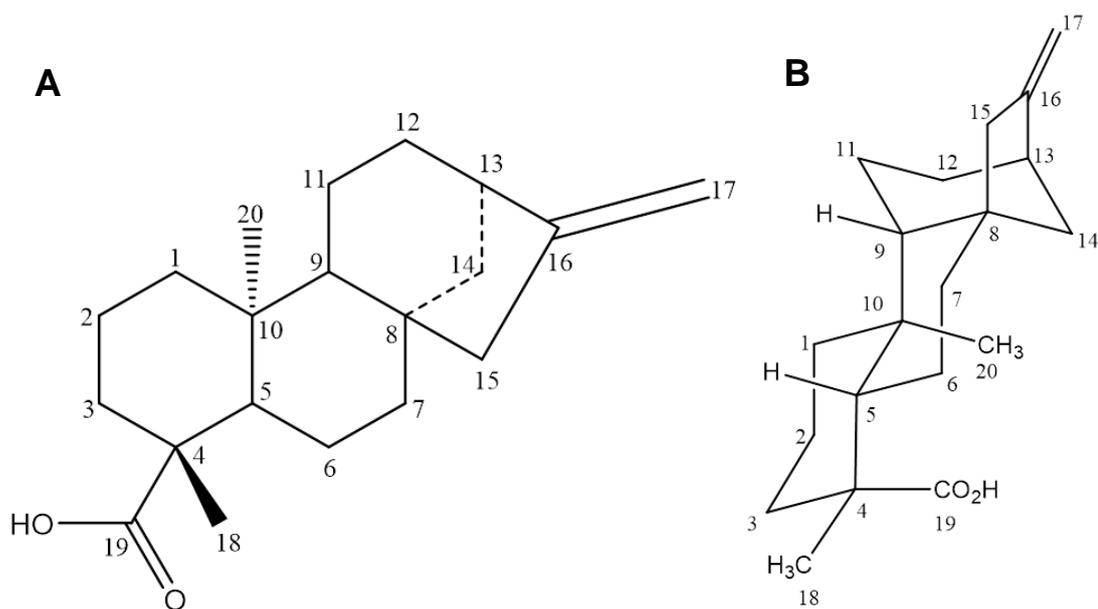


Figura 20. Estrutura bidimensional (A) e tridimensional (B) do Ácido Caurenóico.

Tabela 5 . Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , dados de HMBC, COSY, NOESY e TOCSY do Ácido Caurenóico encontrado na amostra OCP-02 e comparação com dados da literatura.¹³

	^{13}C δ_{H} (ppm)	^1H δ_{H} (ppm); J (Hz)	HMBC	COSY	NOESY	TOCSY	^{13}C (lit) δ_{H} (ppm)	^1H (lit ¹³) δ_{H} (ppm)
1	40,8	1,87 0,80		1,43; 1,87 ^f	1,05 ^f ; 1,43; 1,87; 0,95; 2,14	1,43; 0,99; 1,87; 2,14	40,6	1,86 0,79
2	19,1	1,87; 1,43					19,0	1,87; 1,41
3	37,9	2,14; 0,99	C-19				37,6	2,14; 0,98
4	43,6	-					43,4	-
5	57,0	1,05	C-10 ^f , C-19, C-20	1,45		1,83; 1,51; 1,44	56,9	1,04
6	21,7	1,83	C-5, C-7, C-8, C-10				21,7	1,81 1,70
7	41,3	1,44 1,51	C-5, C-8, C-14				41,1	1,48 1,40
8	44,2	-					43,3	-
9	55,1	1,05	C-8 ^f , C-11, C-12, C-15	1,44	1,86 ^f ; 2,01 ^f ; 2,08 ^f	1,61	55,0	1,03
10	39,7	-					39,2	-
11	18,44	1,56; 1,61					18,2	1,60; 1,54
12	33,1	1,60; 1,47	C-11 ^f , C-16 ^f				33,0	1,57; 1,44
13	43,9	2,63	C-8, C-11 ^f , C-16 ^f	1,60; 1,47 ^f ; 1,12	1,47; 1,60	1,12; 1,99; 1,47; 1,60	43,7	2,61
14	39,7	1,99; 1,12	C-7 ^f , C-8, C-15, C-16				39,5	1,97; 1,11
15	48,9	2,01; 2,08	C-8 ^f , C-9, C-14, C-16				48,8	2,03; 1,97
16	155,8	-					155,4	-
17	103,0	4,73 (d, 1,37) 4,79	C-13, C-15, C-16 ^f		2,01; 2,08		102,5	4,77 4,71
18	28,9	1,23 (singleto)	C-3, C-4, C-5, C-19		0,99; 1,83; 2,14		28,8	1,22
19	183,2	-					183,9	-
20	15,7	0,95	C-1, C-5, C-9, C-10		1,43; 1,61; 1,87; 1,99		15,4	0,93

f- fraco

Nos espectros obtidos para a amostra OCP-2 foram observados sinais característicos que indicam a presença do ácido caurenóico no óleo de copaíba de espécie *Copaifera langsdorffi*, como o sinal do C-19 (δ 183,2), característico de grupos carbonila de ácido carboxílico. Os sinais em 103,0 e 155,8 ppm são característicos de carbonos olefínicos e correspondem aos C-17 e C-18, respectivamente. Esses são sinais, segundo o gráfico de pesos apresentado na Figura 12, que se destacam na diferenciação da amostra de *Copaifera langsdorffi*. O C-17 está ligado a dois hidrogênios com deslocamento químico em 4,73 e 4,79 ppm.

Os sinais referentes ao primeiro anel (átomos identificados de 1-5) não possuem tantas correlações no espectro de ^1H - ^{13}C HMBC (Tabela 5) quanto aquelas observadas para o segundo (átomos identificados de 5-10) e terceiro anel (átomos identificados de 11-16) desse composto, dificultando a análise e a confirmação da estrutura do ácido caurenóico. Era esperada uma correlação no HMBC entre o C-4 com o H-5, entretanto não foi observada, mas H-18 possui uma correlação no HMBC com os Carbonos 4 e 5. De forma semelhante, o C-19 apresenta sinais de correlação com o H-3 e H-5 do primeiro anel no espectro de ^1H - ^{13}C HMBC, embora não seja observada uma correlação esperada do C-3 com H-5 e C-5 com H-3. Porém, os sinais δ 1,05, δ 1,43, δ 1,87, δ 0,95, δ 2,14 no espectro de ^1H - ^1H NOESY e os sinais δ 1,43, δ 0,99, δ 1,87, δ 2,14 no espectro de ^1H - ^1H TOCSY confirmaram a identificação da estrutura do ácido caurenóico. Além disso, a comparação com dados da literatura, apresentados na Tabela 5, também auxiliaram na confirmação da estrutura.

O ácido caurenóico é um dos diterpenos mais comumente encontrado no óleo-resina de copaíba e foi identificado em análises de CG-MS como éster metílico nas mesmas amostras utilizadas neste trabalho.¹⁰ Como os dados da literatura corroboram com a presença do ácido caurenóico na amostra de óleo de copaíba de espécie *Copaifera langsdorffi*, a falta de sinais de correlações HMBC no primeiro anel não são obstáculos significativos na identificação do ácido.

4. CONCLUSÃO

Pela análise dos espectros de RMN auxiliada pelo uso da PCA e HCA foi possível observar a presença de clusters e, assim, diferenciar as amostras de óleo de copaíba de acordo com as espécies e a região de origem. As amostras puderam ser diferenciadas por sinais que talvez não sejam tão expressivos e que, portanto, não seria possível caracterizar pela simples análise comparativa de espectros.

Comparando os resultados obtidos para as PCA dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C , pode-se constatar que os dois espectros permitiram chegar às mesmas conclusões. Porém, a realização dos experimentos de RMN de ^1H foi aproximadamente nove vezes mais rápida do que o experimento de ^{13}C . Portanto, restringindo as análises aos experimentos de RMN de ^1H , um maior número de aquisições seria realizado em menos tempo, aumentando o número de amostras analisadas. Outra vantagem seria a necessidade de uma menor concentração de amostra, já que o experimento de RMN de ^1H tem uma sensibilidade maior. Já a vantagem do RMN de ^{13}C seria o fato de apresentar sinais mais resolvidos. Contudo, o uso de Quimiometria revelou ser capaz de extrair as mesmas informações de ambos os dados espectrais.

Com a aquisição dos espectros de RMN-2D foi possível caracterizar três terpenos capazes de diferenciar as amostras de óleo de copaíba: ácido hardwickiico, óxido de cariofileno e ácido caurenóico. O sesquiterpeno óxido de cariofileno e o diterpeno ácido caurenóico estão presentes nas amostras de *Copaifera langsdorffi* e ausente nas demais amostras. Além desses terpenos encontrados nas amostras de espécie conhecida, o diterpeno ácido hardwickiico foi identificado em amostras do óleo de copaíba obtido para *Copaifera* spp. (que pode consistir em uma ou mais espécies diferentes de *Copaifera langsdorffi*) e não está presente nas amostras de *Copaifera langsdorffi*.

Esses resultados mostram que é possível, com a técnica de RMN, identificar a origem e provar autenticidade do óleo de copaíba usado como matéria-prima em indústria, seja farmacêutica, de cosméticos, dentre outras.

A identificação de moléculas que podem ser consideradas marcadores de uma espécie é importante para a indústria química, pois esses resultados são capazes de auxiliar no controle de qualidade de insumos, garantindo as propriedades dele.

Além disso, esse trabalho mostra como a associação da RMN à Quimiometria pode potencializar ainda mais o uso da técnica de RMN e trazer resultados importantes que a análise visual muitas vezes não permite.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- YAMAGUCHI, MIRIAM H., GARCIA, ROSÂNGELA F. *Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica*. Universidade Estadual de Maringá, Revista Saúde e Pesquisa, v. 5, n. 1, p. 137-146, jan./abr. 2012.
- 2- M. Lemos et al., *Copaifera langsdorffii: evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves*, Revista Brasileira de Farmacognosia 25 (2015) 238–245.
- 3- OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, O.A.; ZOGHBI, M.G.B. *Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (Copaifera spp.) no município de Moju, PA*. Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, Brasil. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.8, n.3, p.14-23, 2006.
- 4- Monakhova, Y.B., Kuballa, T. & Lachenmeier, D.W. *Chemometric methods in NMR spectroscopic analysis of food products*. Journal Analytical Chemistry 68, p. 755-766, 2013.
- 5- H. MONT1 et al., *Two diterpenoids from copaiba oil*, Phytochemistry, Vol. 42, No. 6, pp. 1653 1656, 1996.
- 6- X. Li, K. Hu. *Quantitative NMR Studies of Multiple Compound Mixtures*. Annual Reports on NMR Spectroscopy, Volume 90, 2017, p. 85-143.
- 7- PAVIA, LAPMAN, KRIZ, *Introduction to Spectroscopy*, 4. ed. Canada, Cenegage Learning, 2010.
- 8- FERREIRA, M.M.C. *Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações*. Campinas, SP. Editora da Unicamp, 2015.
- 9- RASMUS, Broa, AGE, K. Smilde. *Principal Component Analysis*, Anal. Methods, 2014,6, 2812-2831.
- 10-MOREIRA, Alessandro César de Oliveira. **Desenvolvimento de métodos para o controle de qualidade do Óleo de *Copaifera* spp. através de espectroscopia NIR, CG-EM e quimiometria**. 2018. 193 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de Brasília, 2018.
- 11-dos Santos et al., *Clerodane diterpenes from leaves of casearia sylvestris* SWARTZ, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Química Nova Vol. 30, No 5, 2007

- 12-Paul M., Chemotaxonomic Investigations on Resins of the Frankincense Species *Boswellia papyrifera*, *Boswellia serrata* and *Boswellia sacra*, respectively, *Boswellia carterii* - A Qualitative and Quantitative Approach by Chromatographic and Spectroscopic Methodology, Saarland University, Saarbrücken, Saarland, Germany, 2012.
- 13-Stefan Safer, Serhat S. Cicek, Valerio Pieri, Stefan Schwaiger, Peter Schneider, Volker Wissemann, Hermann Stuppner, *Metabolic fingerprinting of Leontopodium species (Asteraceae) by means of ¹H NMR and HPLC–ESI-MS*, *Phytochemistry*, Volume 72, Issues 11–12, 2011, Pages 1379-1389.

ANEXOS

Anexo I

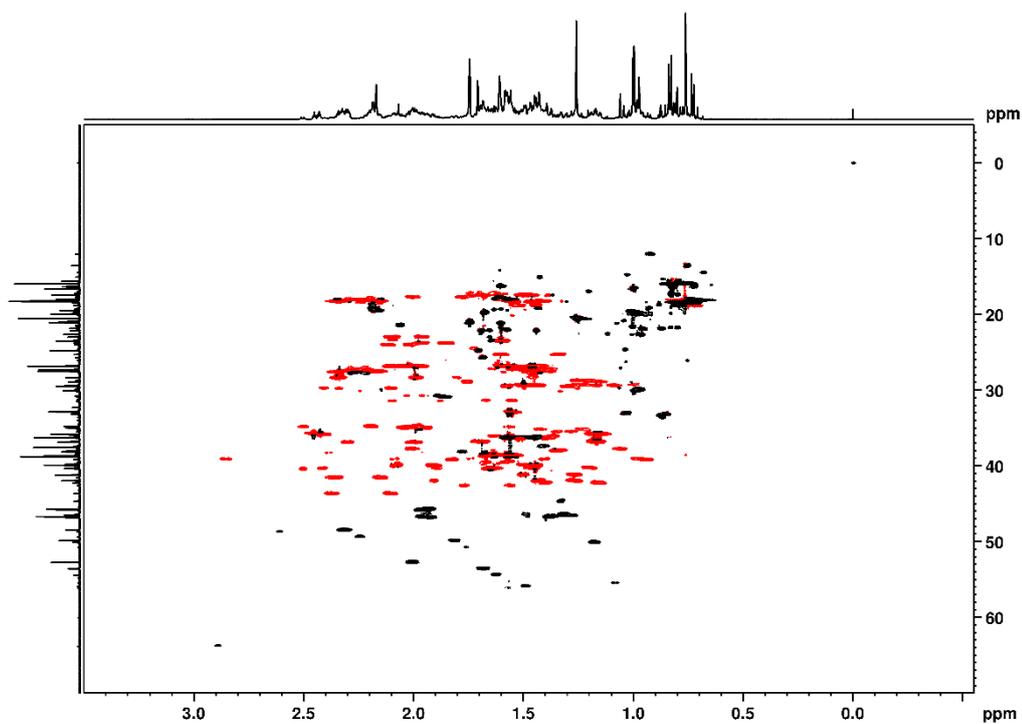


Figura 1. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC da amostra de óleo de copaíba OCP-18. Em preto sinais positivos e vermelho sinais negativos.

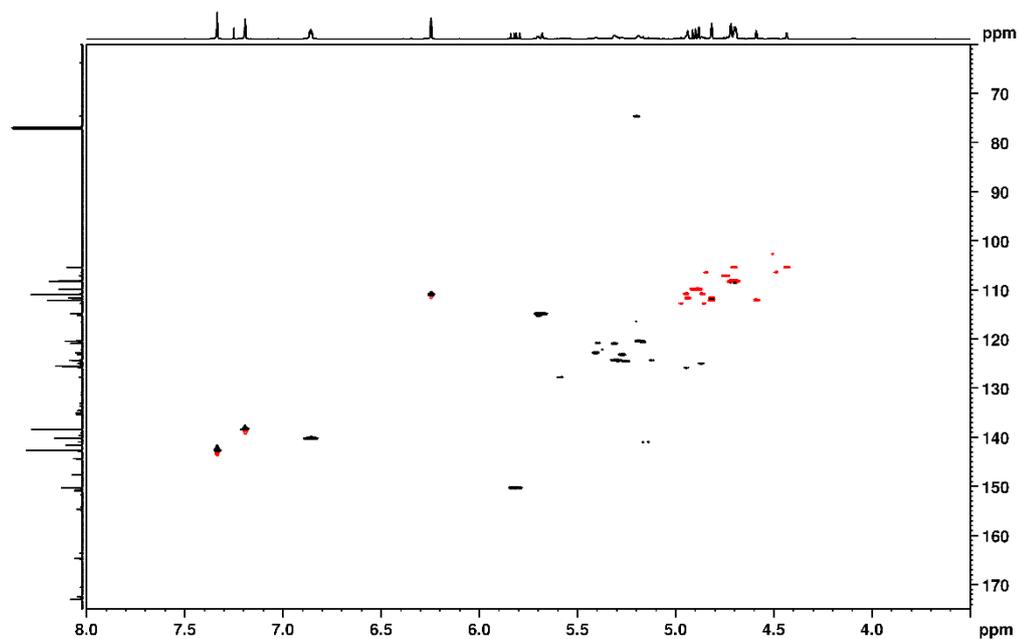


Figura 2. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC da amostra de óleo de copaíba OCP-18. Em preto sinais positivos e vermelho sinais negativos.

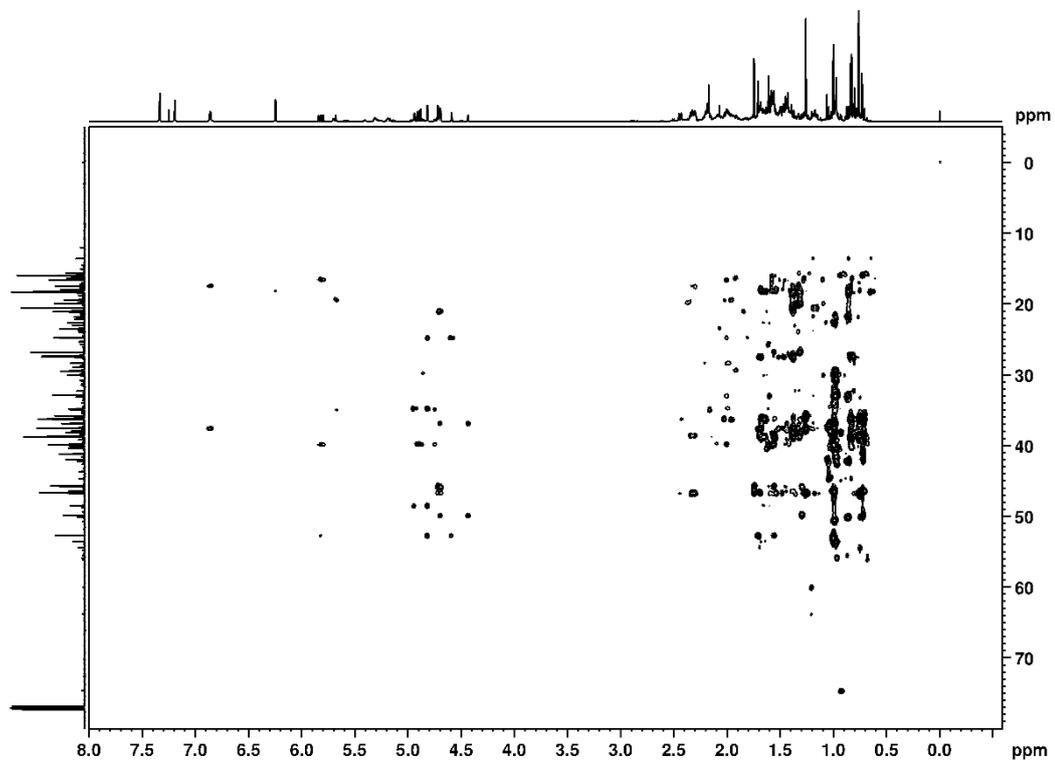


Figura 3. Espectro ¹H-¹³C HMBC da amostra de óleo de copaíba OCP-18.

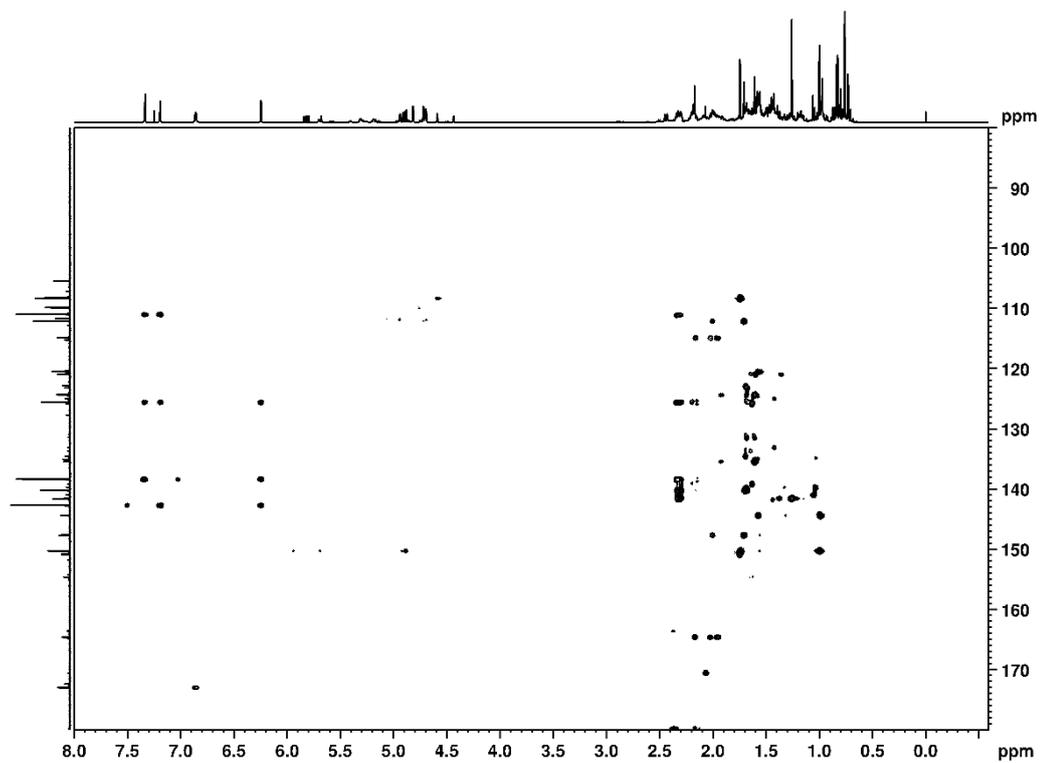


Figura 4. Espectro ¹H-¹³C HMBC da amostra de óleo de copaíba OCP-18.

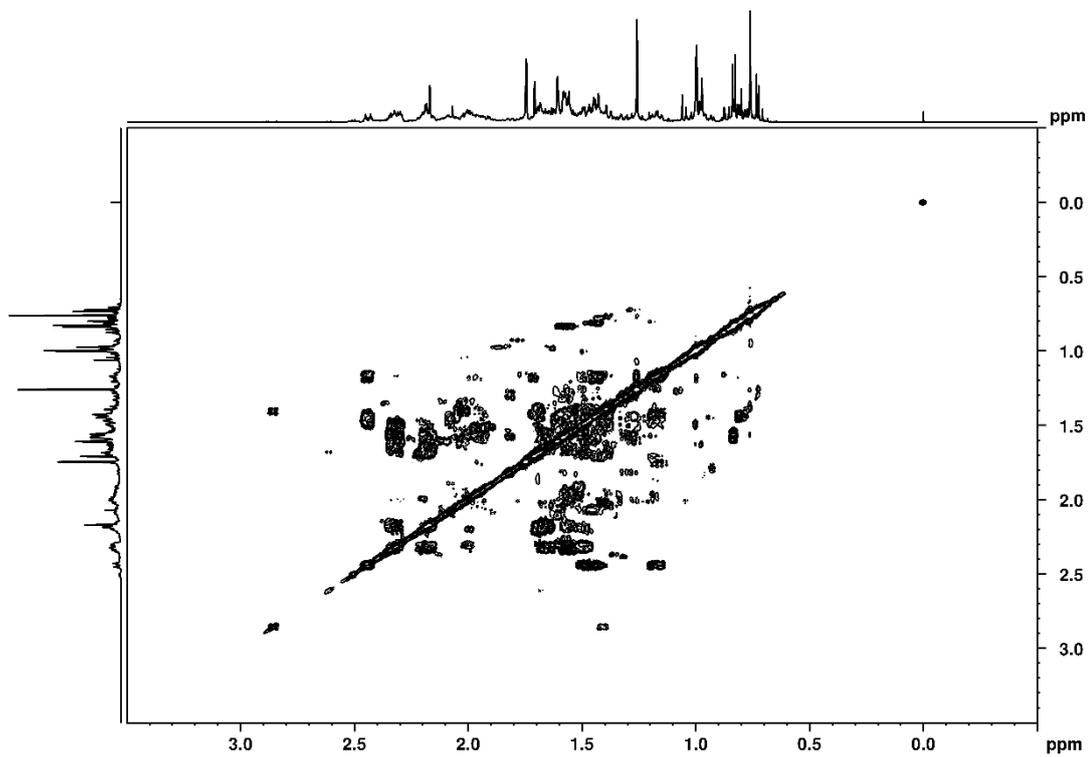


Figura 5. Espectro ^1H - ^1H COSY da amostra de óleo de copaíba OCP-18.

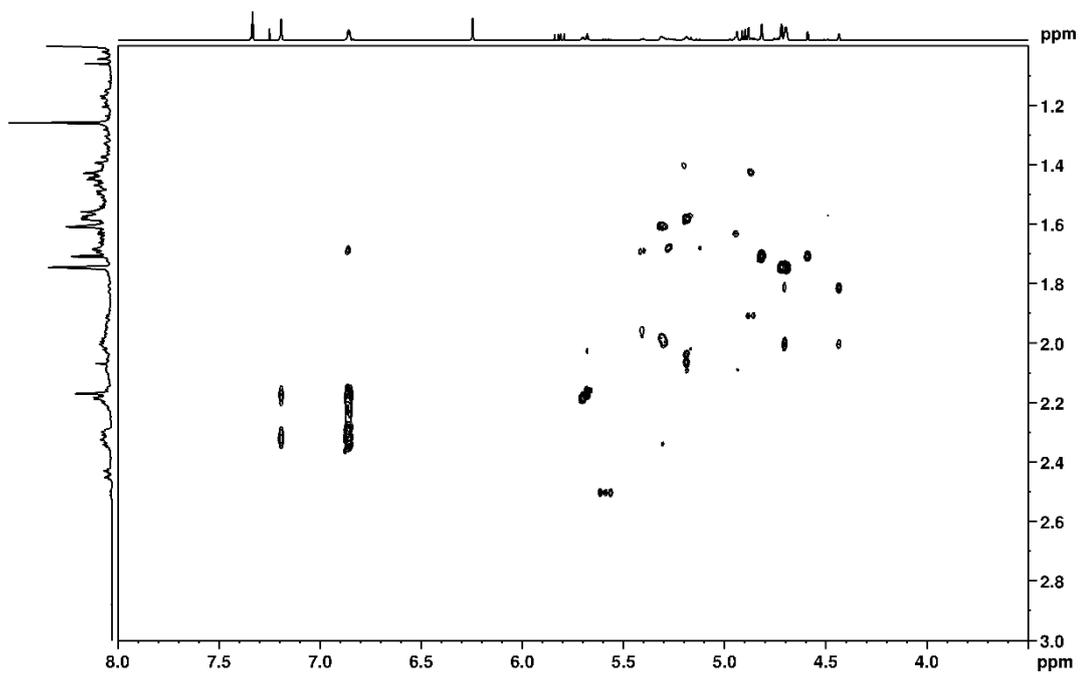


Figura 6. Espectro ^1H - ^1H COSY da amostra de óleo de copaíba OCP-18.

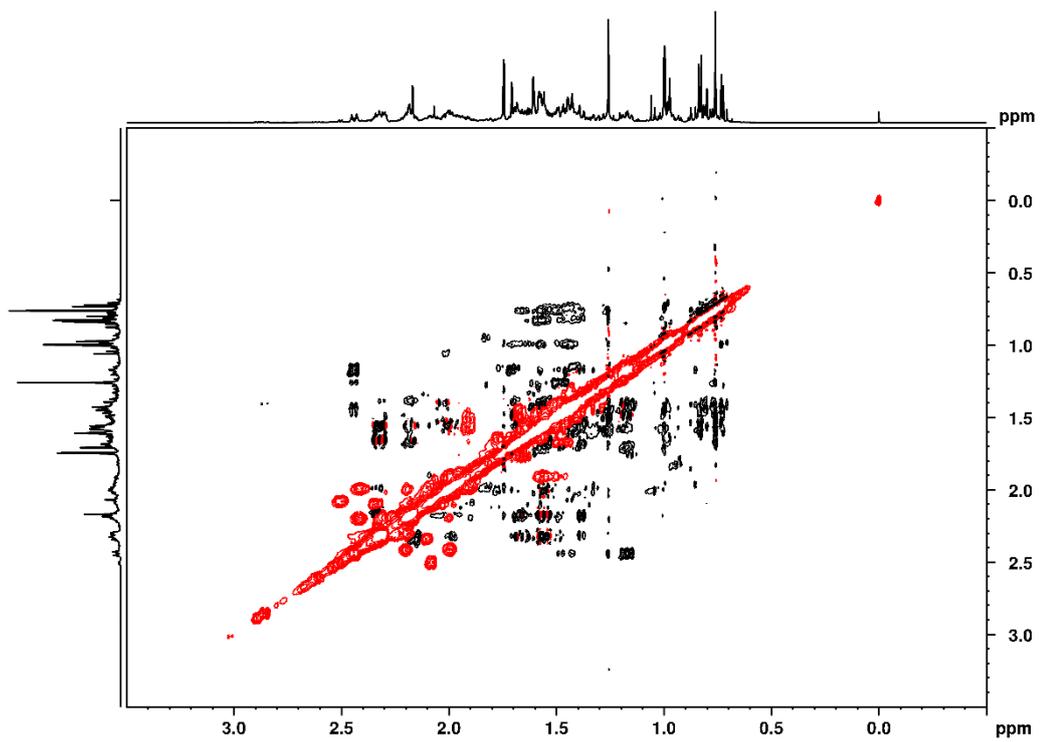


Figura 7. Espectro ^1H - ^1H NOESY da amostra de óleo de copaíba OCP-18.

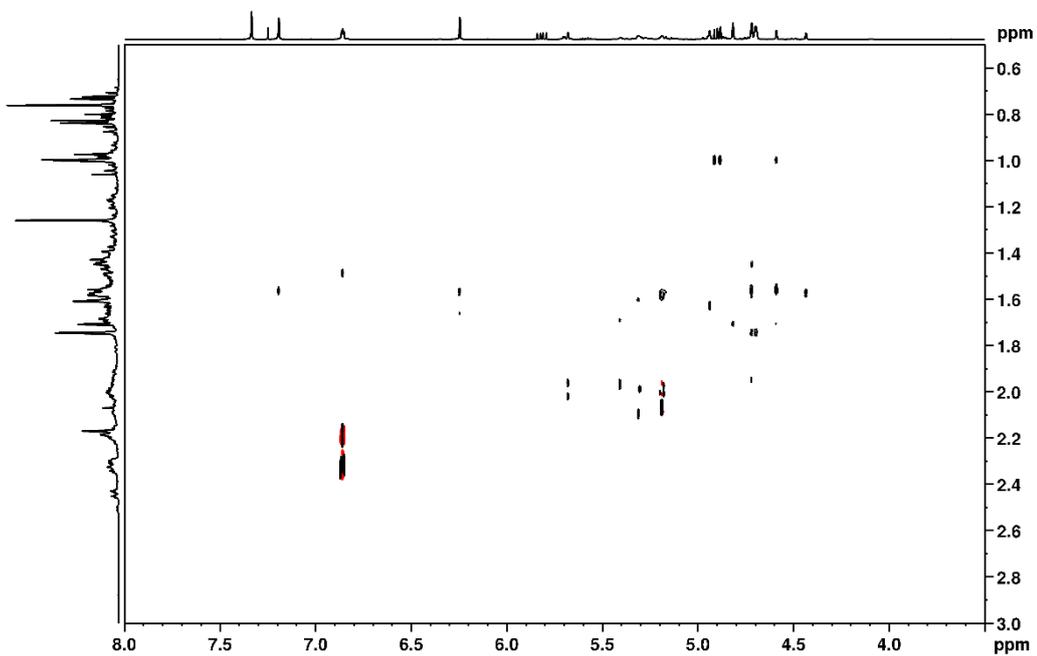


Figura 8. Espectro ^1H - ^1H NOESY da amostra de óleo de copaíba OCP-18.

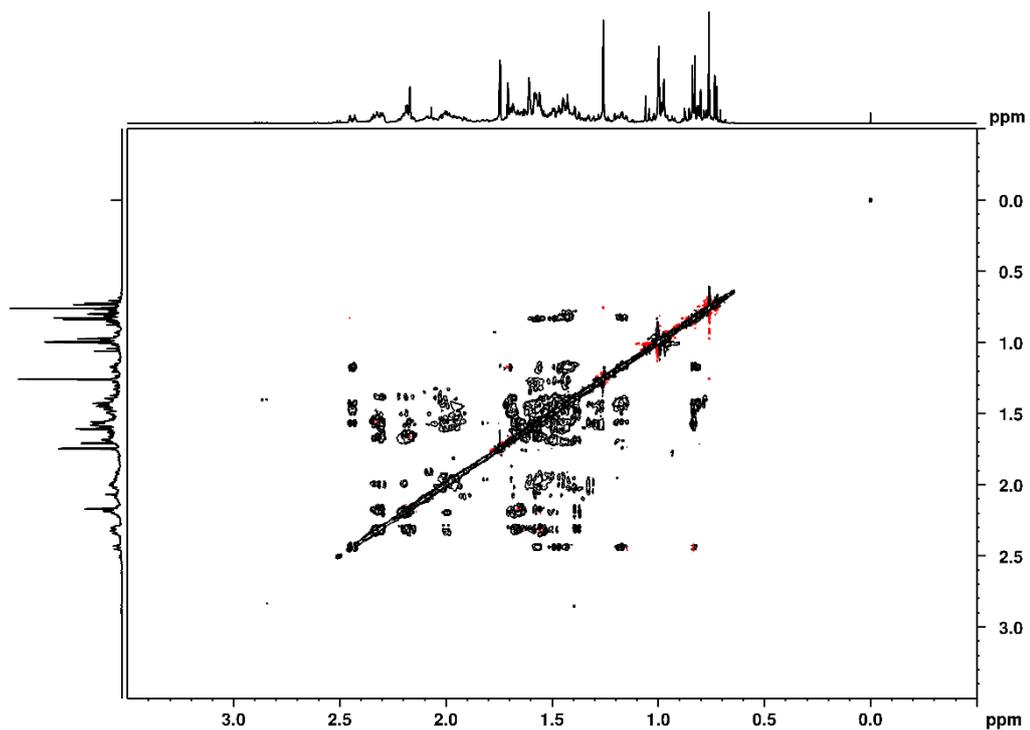


Figura 9. Espectro ^1H - ^1H TOCSY da amostra de óleo de copaíba OCP-18.

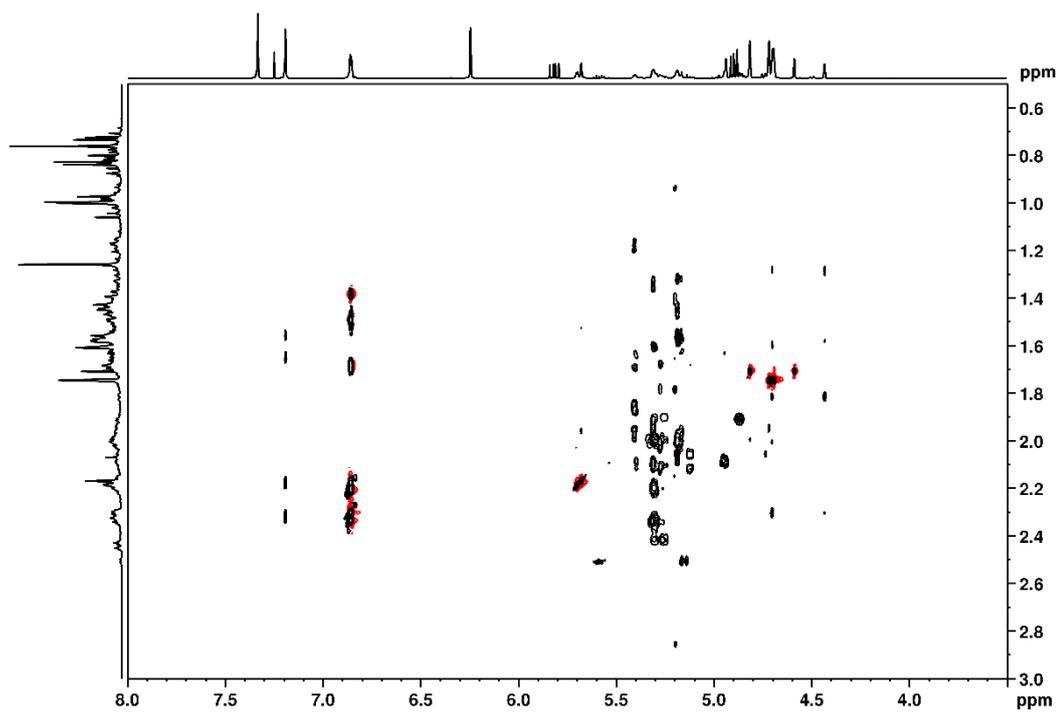


Figura 10. Espectro ^1H - ^1H TOCSY da amostra de óleo de copaíba OCP-18.

Anexo II

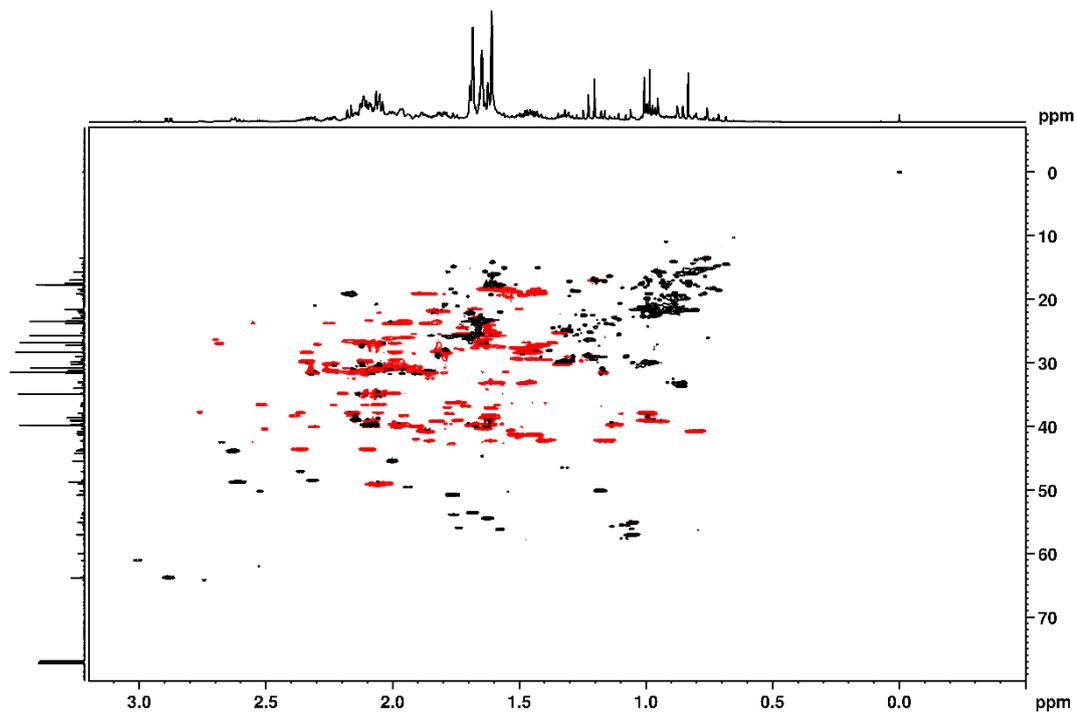


Figura 1. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC da amostra de óleo de copaíba OCP-02. Em preto sinais positivos e vermelho sinais negativos.

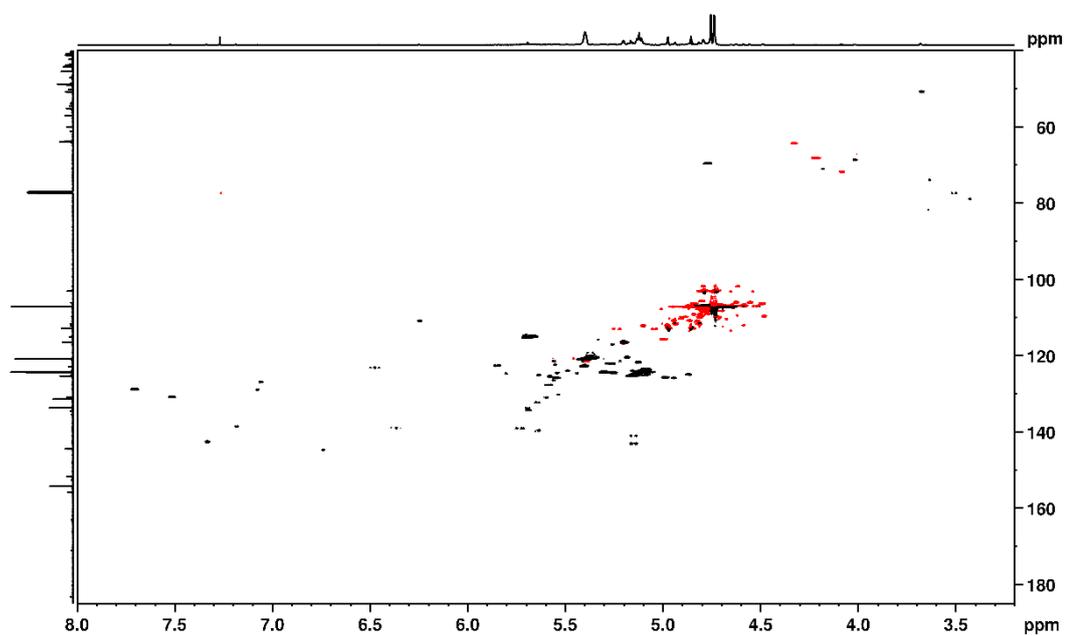


Figura 2. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC da amostra de óleo de copaíba OCP-02. Em preto sinais positivos e vermelho sinais negativos.

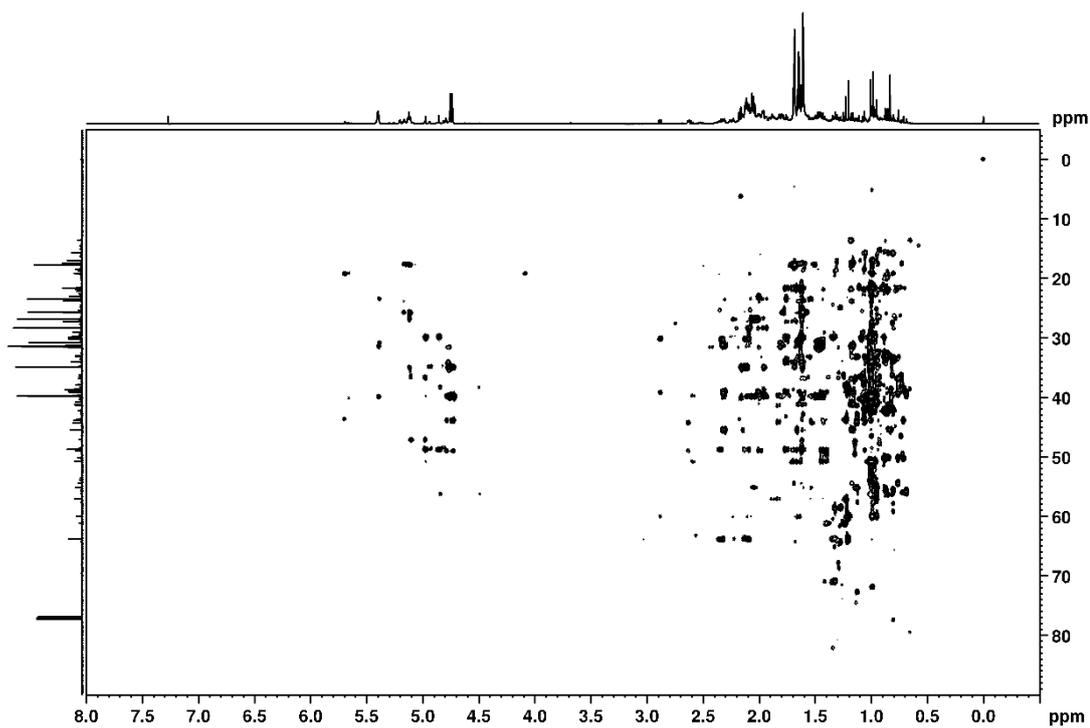


Figura 3. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC da amostra de óleo de copaíba OCP-02.

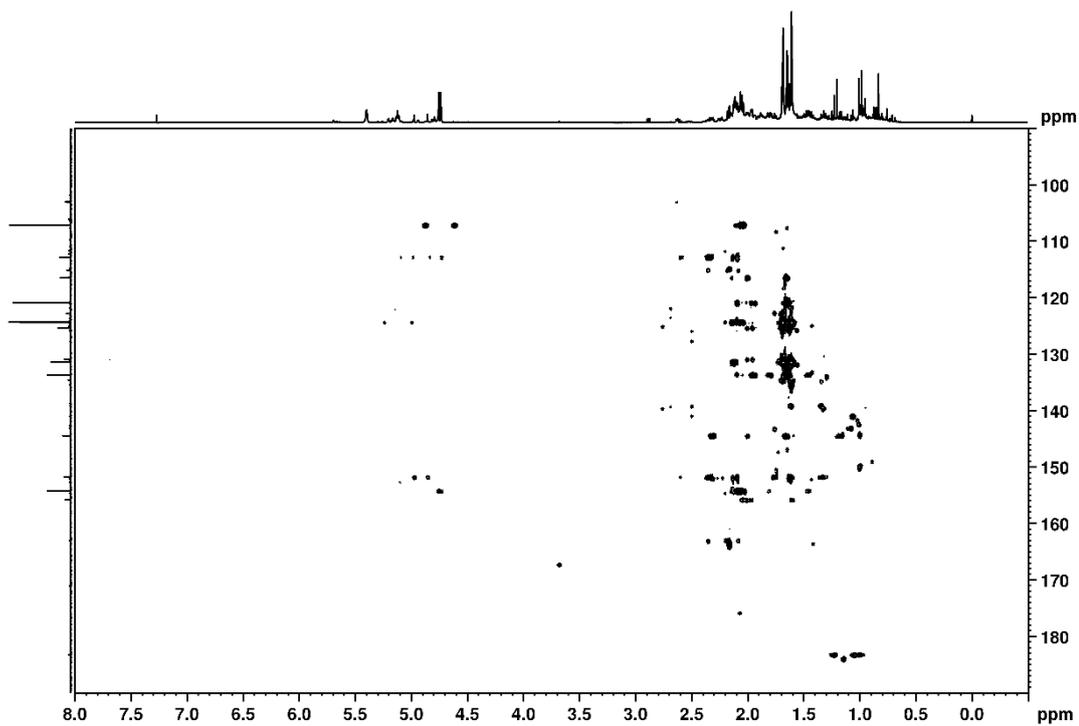


Figura 4. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC da amostra de óleo de copaíba OCP-02.

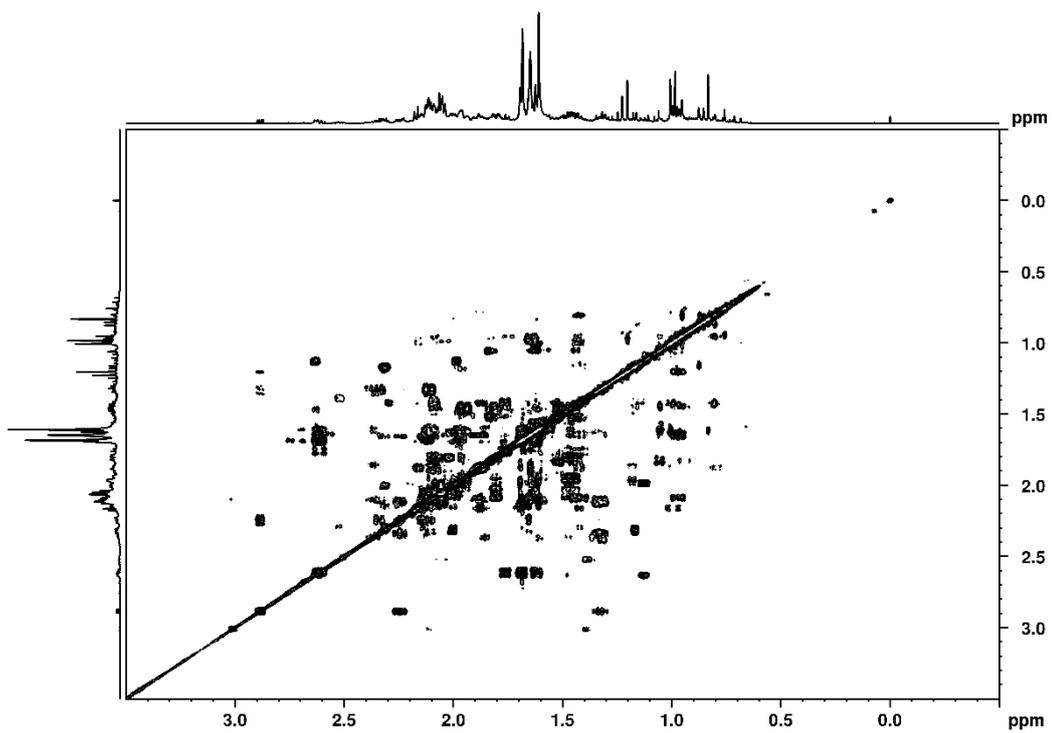


Figura 5. Espectro ^1H - ^1H COSY da amostra de óleo de copaíba OCP-02.

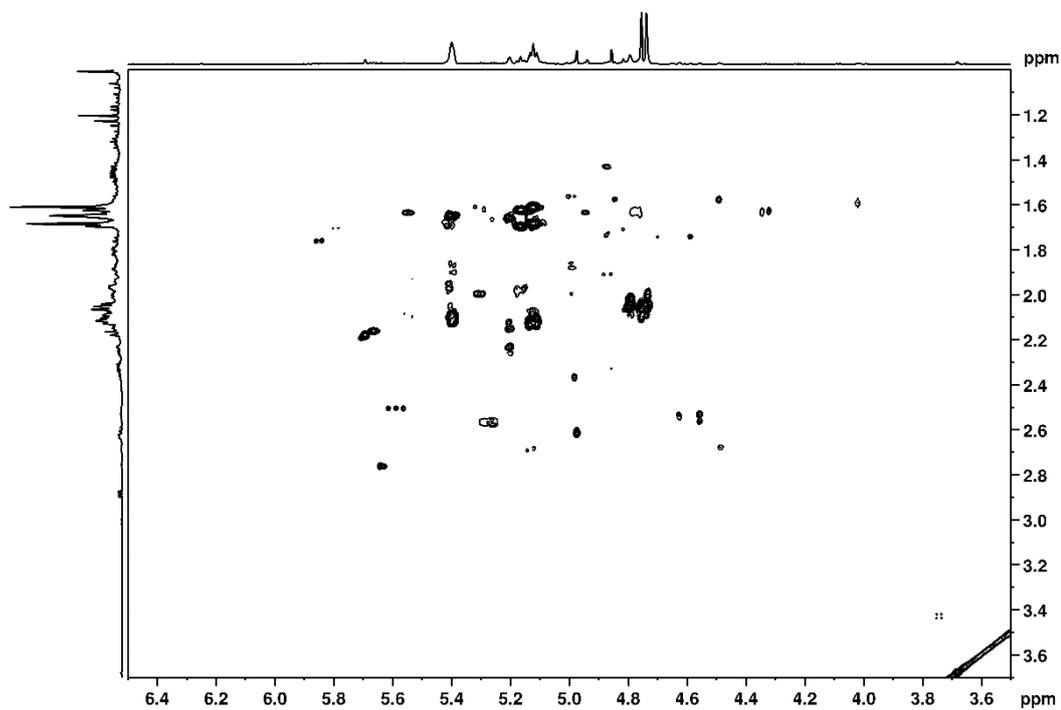


Figura 6. Espectro ^1H - ^1H COSY da amostra de óleo de copaíba OCP-02.

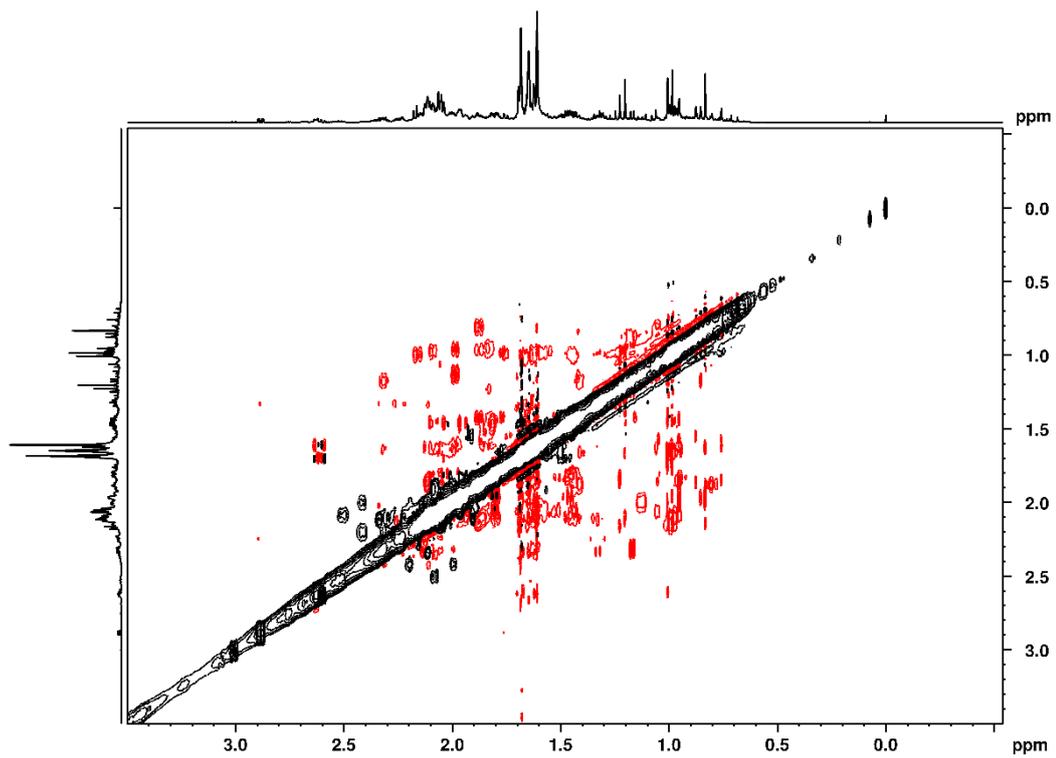


Figura 7. Espectro ^1H - ^1H NOESY da amostra de óleo de copaíba OCP-02.

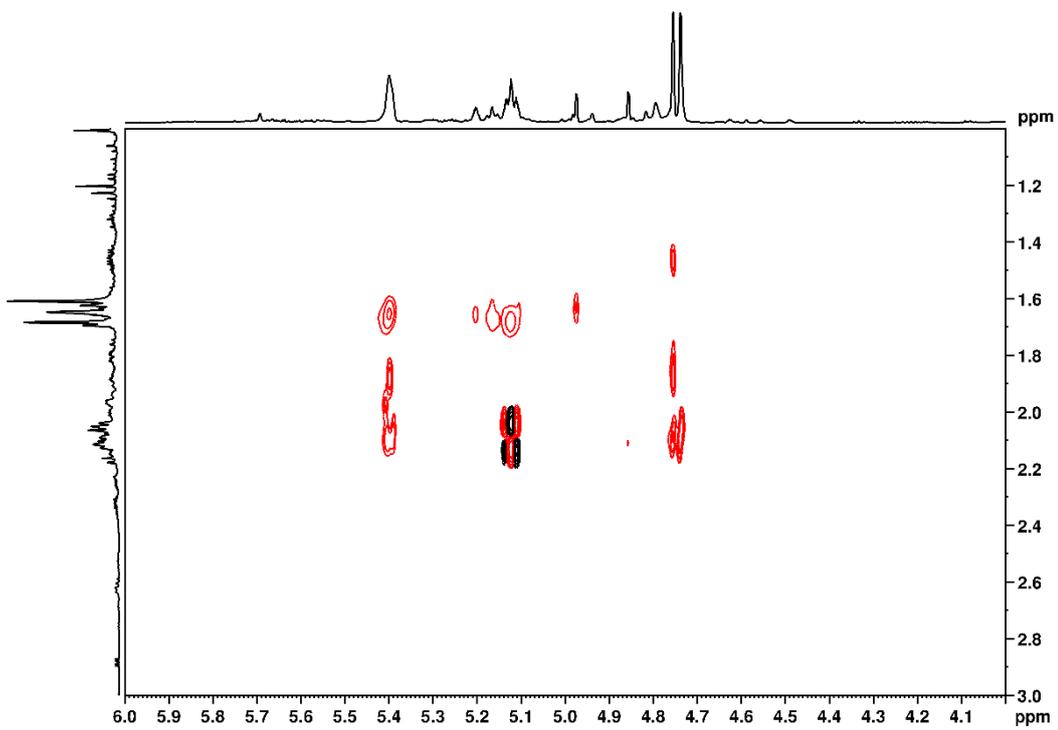


Figura 8. Espectro ^1H - ^1H NOESY da amostra de óleo de copaíba OCP-02.

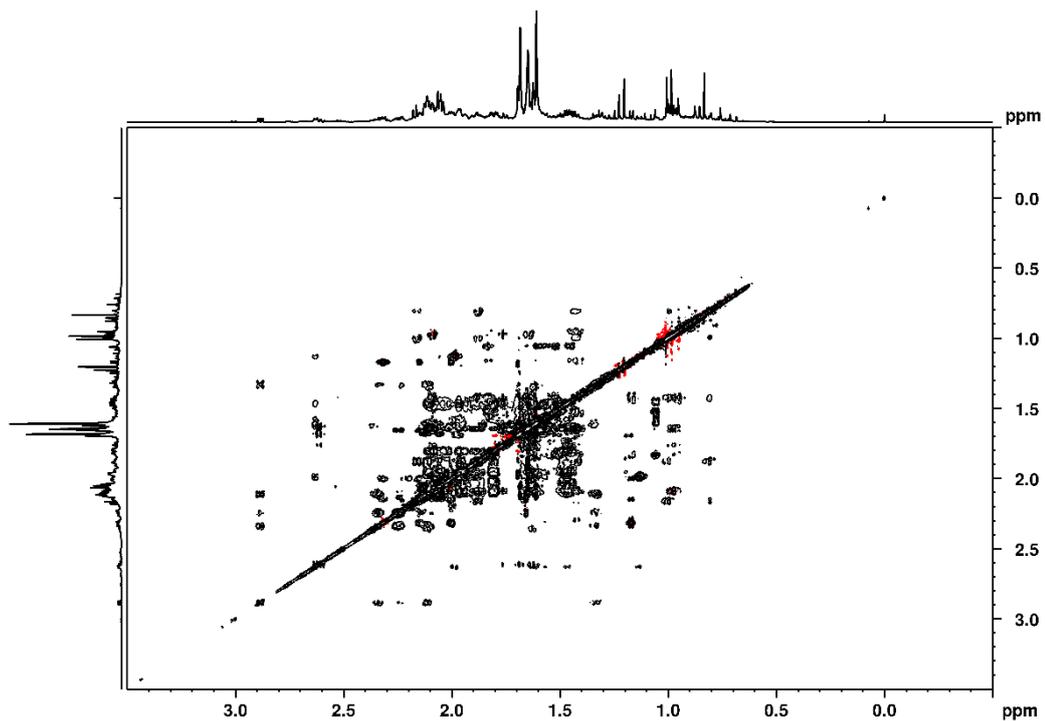


Figura 9. Espectro ¹H -¹H TOCSY da amostra de óleo de copaíba OCP-02.

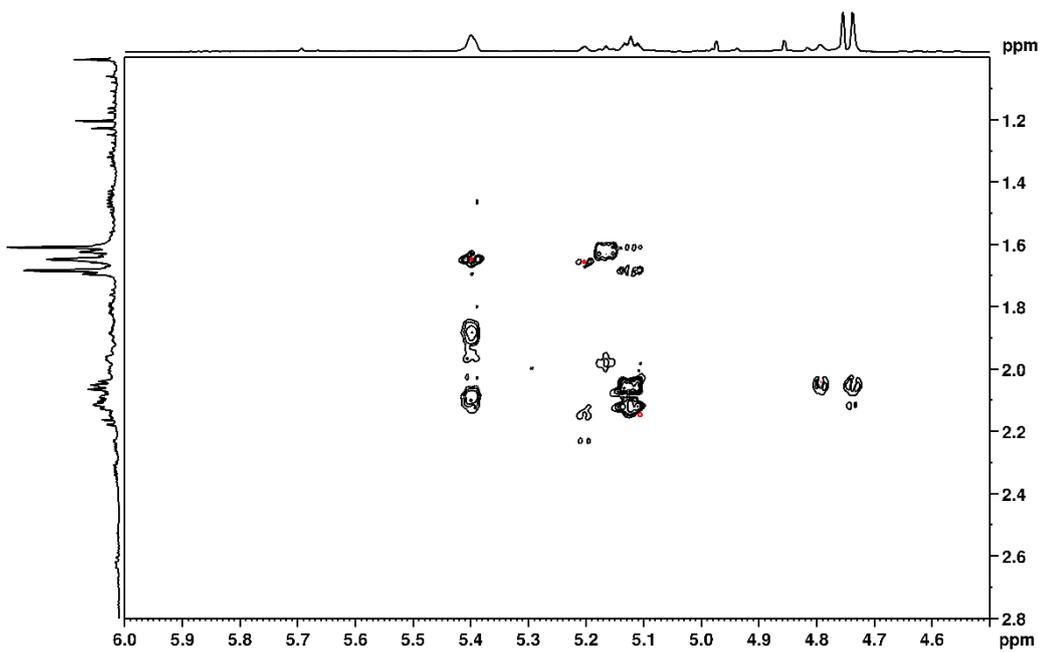


Figura 10. Espectro ¹H -¹H TOCSY da amostra de óleo de copaíba OCP-02.