

CRISTIANE ISAAC CERCEAU

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS EM ÓLEOS
ESSENCIAIS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C412d
2018 Cerceau, Cristiane Isaac, 1981-
Desenvolvimento e validação de métodos para
quantificação de constituintes majoritários em óleos essenciais
por ressonância magnética nuclear / Cristiane Isaac Cerceau. –
Viçosa, MG, 2018.
xxi, 256f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Luiz Claudio de Almeida Barbosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.124-134.

1. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio. 2. COSY,
Pineno. 3. Bisabolol. 4. Citronela. 5. Óleos essenciais.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.
Programa de Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

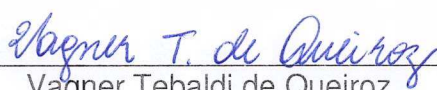
CDD 22 ed. 547.71

CRISTIANE ISAAG CERCEAU


**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS EM ÓLEOS
ESSENCIAIS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

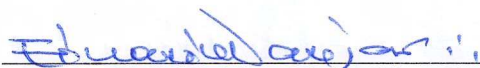
APROVADA: 08 de janeiro de 2018.



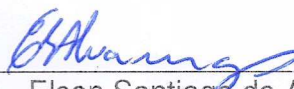
Wagner Tebaldi de Queiroz



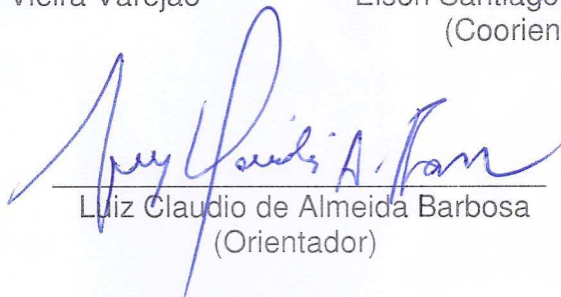
Vanderlúcia Fonseca de Paula



Eduardo Vinicius Vieira Varejão



Elson Santiago de Alvarenga
(Coorientador)



Luiz Claudio de Almeida Barbosa
(Orientador)

*Aos meus pais, Salim e Márcia, e irmãos,
Marcelo e Eduardo pelo carinho e
incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado, fortalecendo-me, iluminando-me e por colocar pessoas boas em minha vida, permitindo esta conquista.

Aos meus queridos pais, por tudo que fizeram em minha vida, pelo amor sem limites e por sempre acreditarem nos meus sonhos.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Química e ao Laboratório de Síntese de Agroquímicos (LASA), pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao meu orientador, professor Luiz Claudio de Almeida Barbosa, por ter confiado no meu trabalho, pela eficiente orientação, empenho, dedicação e amizade.

Ao professor Elson Santiago de Alvarenga, pelo apoio, empenho, sugestões e amizade.

A todos os professores do LASA, pela dedicação e esforço constante para que os alunos tivessem condições de desenvolver seus projetos de pesquisa com eficiência. Em especial ao professor Eduardo Varejão sempre disponível para tirar dúvidas e aos professores Demuner e Célia, pelo incentivo e amizade.

Agradeço também aos professores Sérgio Fernandes e Jorge Colodette pela permissão do uso dos equipamentos, ao professor Ricardo da UFMG pelas análises de rotação óptica e ao professor José Ivo pelas análises estatísticas.

Aos amigos do LASA pelas ricas trocas de experiências, pela convivência agradável e amizade. Em especial, Gabriela, Milena, Jaíne, Bruna, Ueveton, Fernanda, Dayane, Dayana, Liss, Alex, Eva, Montanari, Juliana, Simone, Thaís, Carmindo, Cecília, Kariny, Ana Cristina, Magally, Paula e Junio.

Agradecimento especial às amigas Priscyla, que me recebeu como uma irmã na cidade de Viçosa, tornando os meus dias mais agradáveis, Natália Liberto, Jodieh, Gabriela e Suelen pela amizade, apoio e incentivo na realização deste trabalho.

Agradeço às bancas de qualificação e de defesa pelas sugestões que muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

A todos os técnicos do Departamento de Química, especialmente a José Luiz pela amizade e pelas intermináveis análises cromatográficas; Onesina, pelos conselhos, cordialidade e empréstimo dos materiais; Wagner, Ricardo Natalino e Aline, sempre prestativos.

Agradeço aos funcionários das secretarias de graduação (Irani, Shirley, Lucas e Luciano) e de pós-graduação (Gabriel e Hamy) pela cordialidade e excelência.

Agradeço também às empresas Citróleo, Atlântica Óleos Essenciais e Destilaria Bauru pelo fornecimento das amostras de óleos essenciais.

Enfim, agradeço a todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT	xx
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	3
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
1.1. Ressonância Magnética Nuclear quantitativa (RMNq).....	3
1.2. Princípios da Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa (RMNq).....	4
1.3. Fatores que influenciam na sobreposição / separação de sinais.....	23
1.4. Métodos utilizados para quantificação por RMN	29
1.5. Técnicas de RMNq 2D	32
1.6. Validação de métodos analíticos	33
1.7. Vantagens e desvantagens da RMNq de ¹ H na análise de óleos essenciais.....	36
CAPÍTULO 2	38
OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO EMPREGANDO RMN DE ¹ H PARA QUANTIFICAÇÃO DE α -PINENO EM ÓLEOS ESSENCIAIS	38
RESUMO.....	38
2.1. Introdução	39
2.2. Experimental	42
2.2.1. Materiais e reagentes	42
2.2.2. Método de RMN.....	43
<i>Soluções</i>	43

<i>Instrumentação</i>	43
<i>Condições experimentais</i>	44
<i>Validação do método de RMN de ¹H</i>	44
<i>Quantificação de α-pineno em óleo essencial usando RMN de ¹H</i>	48
2.2.3. Métodos cromatográficos.....	48
<i>Soluções</i>	48
<i>Instrumentação</i>	49
<i>Condições experimentais</i>	49
<i>Quantificação dos óleos essenciais usando CG-DIC</i>	50
2.3. Comparação entre os métodos de quantificação.....	51
2.4. Resultados e discussão.....	51
2.5. Conclusão.....	63
CAPÍTULO 3.....	64
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE RMN DE ¹ H PARA ANÁLISES DE α -BISABOLOL EM ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Eremanthus erythropappus</i>	64
RESUMO.....	64
3.1. Introdução.....	65
3.2. Experimental.....	68
3.2.1. Materiais e reagentes.....	68
3.2.2. Método de RMN.....	68
<i>Soluções</i>	68
<i>Instrumentação</i>	69
<i>Condições experimentais</i>	69
<i>Validação do método de RMN de ¹H</i>	71
<i>Quantificação de α-bisabolol em óleos essenciais usando RMN 1D e 2D</i>	75
3.2.3. Métodos utilizando cromatografia gasosa.....	76

<i>Soluções</i>	76
<i>Instrumentação</i>	76
<i>Condições experimentais</i>	77
<i>Quantificação de α-bisabolol em óleo essencial usando CG-DIC</i>	77
3.3. Comparação entre os métodos de quantificação.....	79
3.4. Resultados e discussão	79
3.4.1. Desenvolvimento e validação do método de RMN de ^1H	79
3.4.2. Quantificação de α -bisabolol em óleos essenciais de candeia	83
3.5. Determinação dos interferentes do método de RMN de $^1\text{H} - \delta = 5,13$	89
3.6. Conclusão	90
CAPÍTULO 4	92
UM MÉTODO DE RMN DE ^1H QUANTITATIVO PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE CITRONELAL, DE CITRONELOL E DE GERANIOL EM ÓLEOS ESSENCIAIS COMERCIAIS DE <i>Cymbopogon ssp.</i>	92
RESUMO.....	92
4.1. Introdução	93
4.2. Experimental	96
4.2.1. Materiais e reagentes	96
4.2.2. Determinação da densidade relativa, do índice de refração e da rotação óptica dos óleos essenciais	97
4.2.3. Método de RMN de ^1H	98
<i>Soluções</i>	98
<i>Instrumentação</i>	99
<i>Condições experimentais</i>	99
<i>Validação do método de RMN de ^1H</i>	100
<i>Quantificação de citronelal, de citronelol e de geraniol em óleos essenciais comerciais de citronela usando RMN de ^1H</i>	104
4.2.4. Métodos cromatográficos.....	105

<i>Soluções</i>	105
<i>Instrumentação</i>	105
<i>Cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM)</i>	105
<i>Condições experimentais</i>	105
<i>Quantificação de citronelal, de citronelol e de geraniol em óleo essencial usando CG-DIC</i>	106
4.3. Comparação entre os métodos de quantificação.....	107
4.4. Resultados e discussão.....	108
4.4.1. Desenvolvimento e validação do método de RMN de ¹ H.....	109
4.4.2. Quantificação de citronelal, de citronelol e de geraniol em óleos essenciais comerciais de citronela.....	114
4.5. Conclusão.....	124
Referências.....	124
DADOS SUPLEMENTARES 1 (S1).....	135
DADOS SUPLEMENTARES 2 (S2).....	188
DADOS SUPLEMENTARES 3 (S3).....	213

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Deslocamentos químicos (ppm) de hidrogênios da norfloxacin (2% em massa) adquiridos em DMSO-d ₆ e em soluções aquosas ácidas e básicas (300 MHz).....	27
Tabela 2.1. Equação e coeficiente de correlação obtidos da curva de linearidade para cada sinal obtido no espectro de RMN de ¹ H do α-pineno (98%) em CDCl ₃	56
Tabela 3.1. Percentagem de α-bisabolol determinada pelos espectrômetros Varian Mercury 300 MHz e Bruker 400 MHz.....	82
Tabela 4.1. Parâmetros utilizados para determinar a rotação óptica dos óleos essenciais comerciais de citronela.....	98

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Espectro de RMN de ^1H da mistura de (A) ácido γ -aminobutírico e (B) ácido butírico mostrando valores relativos de integrais de ressonância intramolecular (Bharti e Roy, 2012 adaptada). 5
- Figura 1.2.** Diagrama de contorno rápido-HSQC quantitativo de lignina em DMSO- d_6 obtido utilizando um espectrômetro de RMN de 600 MHz equipado com criosonda (Sette *et al.*, 2013). 5
- Figura 1.3.** Espectro de RMN de ^1H da alanina (Ala) em D_2O utilizando um espectrômetro de RMN de 400 MHz (50mg/750 μL , 128 transientes) (Holzgrabe, 2010). 6
- Figura 1.4.** Esquema de sequência de pulso de RMN de ^1H utilizando GARP para eliminar os sinais satélites de ^{13}C de um espectro de RMN de ^1H (Leal, 2013). 6
- Figura 1.5.** Sequência de pulso para aquisição de RMN de ^1H 7
- Figura 1.6.** Calibração da largura do pulso. A intensidade dos sinais varia conforme a curva. Os sinais esperados para os diferentes ângulos são indicados pelas linhas tracejadas (Keeler, 2002). 8
- Figura 1.7.** Corte de espectro de RMN de ^1H mostrando um sinal no qual o Aq utilizado foi suficiente para aquisição do FID (A) e um sinal no qual ocorre o truncamento do FID (B) (University of Ottawa NMR Facility Blog). 9
- Figura 1.8.** a) Sequência de pulso para aquisição de RMN de ^1H quantitativo; b) Sequência inversão-recuperação para determinação dos valores do tempo de relaxação longitudinal dos spins (T_1) (Keeler, 2002 adaptada). 10
- Figura 1.9.** Processo de inversão-recuperação. a) Efeito do pulso de radiofrequência de 180° sobre a magnetização; b) Relaxação longitudinal durante o tempo τ , c) Efeito do pulso de radiofrequência de 90° sobre a magnetização, após o tempo τ 11
- Figura 1.10.** Experimento de inversão-recuperação usado para medir valores de T_1 para hidrogênios da alanina em D_2O (RMN de ^1H de 400 MHz; $T_R = 75$ s) (Holzgrabe, 2010). 12
- Figura 1.11.** Efeitos do preenchimento com zero no aprimoramento de estrutura fina e na definição da forma da linha espectral (Claridge, 2009). 14

Figura 1.12. Processamento de um FID truncado. a) FID truncado não tratado; b) O FID truncado em (a) que foi estendido por preenchimento com zero produzindo ondulações no espectro, c) predição linear do FID em (b) (University of ottawa NMR Facility Blog).	15
Figura 1.13. Melhoria da resolução do pico em um experimento de correlação heteronuclear 2D carbono-hidrogênio através da predição linear (PL). Os mesmos dados brutos foram usados em cada espectro, com a dimensão F1 (carbono) processada com: a) nenhuma extensão de dados, b) um preenchimento com zero e c) PL no lugar do preenchimento com zeros (Claridge, 2009).	15
Figura 1.14. Funções de janela comumente usadas para modificar o FID adquirido para aumentar a sensibilidade e/ou a resolução espectral (l_b = parâmetro de ampliação da linha; g_b = parâmetro de ampliação gaussiano, ou seja, a fração do tempo de aquisição quando a função tem seu valor máximo). ..	16
Figura 1.15. Multiplicação exponencial do FID usada para reduzir o ruído no espectro. a) FID cru e espectro após a transformada de Fourier. b) Resultados após o processamento exponencial com $l_b = 1$ Hz (Claridge, 2009).	17
Figura 1.16. Ilustração das formas de linha Lorentziana e Gaussiana (Keeler, 2002).	18
Figura 1.17. Função Lorentz-Gaussian usada para melhorar a resolução espectral. a) FID e espectro após transformada de Fourier e resultados após o uso da função Lorentz-Gaussian com (b) $l_b = -1$ Hz, $g_b = 0,2$ e (c) $l_b = -3$ Hz e $g_b = 0,2$	18
Figura 1.18. Fatores que causam erros de fase de zero (a) e de primeira ordem (b) em espectros de RMN (Claridge, 2009).	20
Figura 1.19. Erros de fase de zero e de primeira ordem em espectros de RMN de ^1H . (a) Espectro corretamente em fase, (b) espectro na presença de erros de fase independentes da frequência (ordem zero) e (c) espectro na presença de erros de fase dependentes da frequência (primeira ordem).	21
Figura 1.20. Expansão do espectro de RMN de ^1H 300 MHz do óleo essencial de <i>Siparuna guianenses</i> mostrando a separação do sinal (B) do α -bisabolol dos sinais de outros terpenos (A) quando o solvente CDCl_3 foi substituído por C_6D_6 .	24

Figura 1.21. Espectro de RMN de ^1H 300 MHz de heparina não fracionada em D_2O a 80°C (espectro em vermelho) e à temperatura de 25°C (espectro em azul) (Holzgrabe, 2010 adaptada).	25
Figura 1.22. Espectros parciais de RMN de ^1H mostrando os sinais dos hidrogênios aromáticos da ciprofloxacina em diferentes concentrações ($2,6 \times 10^{-3}$ M; 109×10^{-3} M e 259×10^{-3} M) (Michaleas e Antoniadou-Vyza, 2006).	26
Figura 1.23. Estrutura da norfloxacina.	27
Figura 1.24. Estruturas de ressonância da norfloxacina em meio básico.	28
Figura 1. 25. Esquema de haste de inserção co-axial usada para quantificação de analitos em misturas utilizando a técnica de RMN com padronização externa (Bharti e Roy, 2012).	32
Figura 2.1. Estrutura química de alguns terpenos presentes em óleos essenciais e isômeros do dipropilenoglicol.	41
Figura 2.2. Cromatograma do óleo essencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> (ET): 1: α -pineno (11,40%); 2: β -pineno (20,41%); 3: α -felandreno (4,30%); 4: <i>p</i> -cimeno (14,76%); 5: 1,8-cineol (17,34%); 6: γ -terpineno (4,88%); 7: terpinen-4-ol (1,53%); 8: α -terpineol (2,19%); 9: α -gurjuneno (1,61%); 10: β -gurjuneno (1,33%); 11: aromadendreno (4,13%); 12: <i>allo</i> -aromadendreno (1,77%); 13: viridifloreno (0,95%); 14: espatulenol (1,16%); 15: globulol (2,32%) e 16: α -felandreno (1,41%).	52
Figura 2.3. Cromatograma do óleo essencial comercial obtido da terebintina (SOC): 1: α -pineno (93,59%); 2: canfeno (1,58%); 3: β -pineno (3,33%); 4: β -felandreno (0,67%).	52
Figura 2.4. Espectro de RMN de ^1H do α -pineno 98% (300 MHz, em CDCl_3).	53
Figura 2.5. Espectro de RMN de ^1H de α -pineno (19,67 mg) (300 MHz, em CDCl_3) contendo o padrão interno OMCTS (0,71 mg) usado para determinação da linearidade do método de RMN de ^1H desenvolvido. À área do sinal correspondente ao OMCTS (em azul) foi atribuído o valor de 1000. A área dos demais sinais foi intergrada em relação à do OMCTS.	55
Figura 2.6. Curvas de linearidade da quantidade de α -pineno observada vs. quantidade de α -pineno esperada para cada sinal obtido no espectro de RMN de ^1H do α -pineno.	55

Figura 2.7. Conteúdo (%) de α -pineno em amostras de óleo essencial de <i>E. saligna</i> (ES), híbrido <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> (U x G), <i>E. tereticornis</i> (ET), <i>E. phoenicea</i> (EPE), <i>E. punctata</i> (EPN), <i>C. torelliana</i> (CTL), <i>C. maculata</i> (CMC), derivado de terebintina (SOC) e pimenta rosa (<i>Schinus terebinthifolius</i>) (PR) determinado pelos métodos de cromatografia gasosa-padronização externa (CG-PE), padronização interna (CG-PI), normalização de áreas (CG-N) e RMN de ^1H . O símbolo \pm contido em cada barra representa o desvio padrão.	60
Figura 2.8. Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) representativos de amostras de óleo essencial de <i>E. saligna</i> (ES), híbrido <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> (U x G), <i>E. tereticornis</i> (ET), <i>E. phoenicea</i> (EPE), <i>E. punctata</i> (EPN), <i>C. torelliana</i> (CTL), <i>C. maculata</i> (CMC), pimenta rosa (<i>Schinus terebinthifolius</i>) (PR) e derivados de terebintina (SOC).	62
Figura 3.1. Estrutura dos compostos condotubulosina A e B, risperidona, 9-hidroxisperidona, β -ciclodextrina e dos terpenos α -bisabolol, ascaridol e isoascaridol.	66
Figura 3.2. Espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol puro (300 MHz, em CDCl_3). .	80
Figura 3.3. Curvas de linearidade da quantidade medida vs. quantidade esperada de α -bisabolol para os sinais em 1,10; 5,13, e 5,36 ppm obtidos do espectro de RMN de ^1H α -bisabolol.	81
Figura 3.4. Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) representativos das amostras de óleo essencial de <i>E. erythropappus</i> (E1, E3, E4, E7 e E10). Os números embaixo de cada sinal são os valores das integrais e foram usados para quantificar α -bisabolol em cada uma das amostras.	84
Figura 3.5. Cromatograma do óleo essencial de <i>Eremanthus erythropappus</i> (E6): 1: <i>Z</i> - α -bisaboleno (2,63%); 2: <i>E</i> - α -bisaboleno (2,50%); 3: óxido de α -bisabolol B (2,68%); 4: não identificado (1,78%); 5: α -bisabolol (79,23%).	85
Figura 3.6. Cromatograma do óleo essencial de <i>Eremanthus erythropappus</i> (E11): 1: óxido de α -bisabolol B (1,82%); 2: não identificado (0,80%); 3: α -bisabolol (97,38%).	85
Figura 3.7. Conteúdo (%) de α -bisabolol para os óleos essenciais medidos por RMN de ^1H usando o sinal $\delta = 5,13$; COSY e cromatografia gasosa usando normalização (CG-N). Além das técnicas citadas, as amostras E10 e E11 também foram analisadas por cromatografia gasosa utilizando padronização externa (CG-	

PE) e interna (CG-PI). O símbolo \pm contido em cada barra representa o desvio padrão.....	86
Figura 3.8. Mapa de contorno do COSY (300 MHz, em CDCl ₃) representativo das amostras de óleo essencial de <i>E. erythropappus</i> sem e com ocorrência de sobreposição de sinais, respectivamente, E1 e E9. A região de interesse foi ampliada. A mancha C corresponde à correlação entre o H5 do α -bisabolol (5,13 ppm) e o hidrogênio (2,69 ppm) de um outro composto do óleo essencial.....	87
Figura 3.9. Deslocamentos químicos dos constituintes dos óleos essenciais de candeia com conteúdo acima de 0,90% (0-5,5 ppm, com cortes).	89
Figura 4.1. Estrutura química dos principais monoterpenos presentes no óleo de citronela.....	94
Figura 4.2. Terpenos quantificados em óleos essenciais usando RMN de ¹ H.....	95
Figura 4.3. Estrutura química dos compostos formados na decomposição dos constituintes majoritários do óleo essencial de citronela (citronelal, citronelol e geraniol) relatados na literatura.....	96
Figura 4.4. Espectro de RMN de ¹ H da mistura de citronelal, de citronelol e de geraniol, contendo o padrão interno octametilciclotetrasiloxano (OMCTS) (300 MHz, em CDCl ₃).....	110
Figura 4.5. Espectro de RMN de ¹ H da mistura de citronelal, de citronelol e de geraniol (19,71; 21,80 e 21,61 mg, respectivamente) (300 MHz, em CDCl ₃) contendo o padrão interno OMCTS (1,36 mg) usado para determinação da linearidade do método de RMN de ¹ H desenvolvido. À área do sinal correspondente ao OMCTS (em azul) é atribuído o valor de 1000. A área dos demais sinais é integrada em relação à do OMCTS.	111
Figura 4.6. Curvas de linearidade da quantidade observada vs. quantidade esperada de citronelal (■), de citronelol (●) e de geraniol (▲ e ▼) obtidas do espectro de RMN de ¹ H da mistura dos três componentes.....	112
Figura 4.7. Cromatograma do óleo essencial comercial de <i>Cymbopogon nardus</i> (C2): 1: limoneno (3,88%); 2: citronelal (34,20%); 3: citronelol (21,92%); 4: geraniol (16,26%); 5: acetato de citronelol (4,12%); 6: acetato de geraniol (2,72%); 7: β -elemeno (1,56 (1,56%); 8: γ -muuroleno (2,53%); 9: δ -cadineno (2,56%); 10: elemol (1,49%).	115

Figura 4.8. Cromatograma do óleo essencial comercial de *Cymbopogon winterianus* (C8): **1:** limoneno (2,24%); **2:** citronelal (23,74%); **3:** citronelol (11,78%); **4:** neral (5,58%); **5:** geraniol (34,38%); **6:** geranial (7,79%); **7:** acetato de citronelil (1,84%); **8:** acetato de geranil (3,87%); **9:** *E*-cariofileno (2,57%)..... 115

Figura 4.9. Espectros representativos de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) das amostras de óleos essenciais comerciais de *C. nardus* (C1, C2, C4, C5, C6 e C7) e de *C. winterianus* (C3 e C8). Os números abaixo de cada sinal são valores de integrais e foram utilizados para quantificar citronelal ($\delta = 9,75$), citronelol ($\delta = 3,61-3,74$) e geraniol ($\delta = 5,36-5,42$ e $\delta = 4,13$), em cada óleo essencial..... 117

Figura 4.11. Conteúdo (%) de citronelol nos óleos essenciais de *C. nardus* (C1, C2, C4, C5, C6 e C7) e de *C. winterianus* (C3 e C8) medidos pelos métodos de cromatografia gasosa usando padronização interna (CG-PI), normalização de áreas (CG-N) e RMN de ^1H . O símbolo \pm contido em cada barra representa o desvio padrão..... 120

Figura 4.12. Conteúdo (%) de geraniol nos óleos essenciais de *C. nardus* (C1, C2, C4, C5, C6 e C7) e de *C. winterianus* (C3 e C8) medidos pelos métodos de cromatografia gasosa usando padronização interna (CG-PI), normalização de áreas (CG-N) e RMN de ^1H usando os sinais em $\delta = 5,36-5,42$ e $\delta = 4,13$. O símbolo \pm contido em cada barra representa o desvio padrão..... 120

Figura 4.13. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H dos constituintes dos óleos essenciais de citronela com conteúdo acima de 1,00% (3,5-10,0 ppm). 121

LISTA DE ABREVIATURAS

Ala	Alanina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Aq	Tempo de aquisição
CG	Cromatografia gasosa
CG-DIC	Cromatografia gasosa-decator por ionização em chamas
CG-EM	Cromatografia gasosa-espectrometria de massas
CG-N	Cromatografia gasosa-normalização de áreas
CG-PE	Cromatografia gasosa-padronização externa
CG-PI	Cromatografia gasosa-padronização interna
COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
CV	Coeficiente de correlação
D1	Tempo de atraso
dB	Decibéis
DIL	Decaimento de indução livre
DOSY	<i>Diffusion-Ordered Spectroscopy</i>
DOQ-CGCRE	Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos
DPG	Dipropilenoglicol
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
ECA	Eletroforese capilar por afinidade
FID	<i>Free induction decay</i>
GARP	<i>Globally optimized Alternating-Phase Rectangular Pulses</i>
gb	Parâmetro de ampliação Gaussiano
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
lb	Parâmetro de ampliação da linha espectral
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m/m	massa/massa
m/v	massa/volume
MHz	Megahertz
nt	Número de transientes
RE	Resolução

R&R	Repetitividade e reprodutibilidade
OMCTS	Octametilciclotetrasiloxano
ppm	Partes por milhão
pw	Largura do pulso
Q-HSQC	<i>Quantitative Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMNq	Ressonância magnética nuclear quantitativa
s	Segundo
S/R	Sinal/ruído
SW	Largura espectral
T_1	Tempo de relaxação longitudinal
tpwr	Potência de atenuação
T_R	Tempo de repetição
vs	Versus
δ	Deslocamento químico
μ s	Microsegundos
%D	Diferença em percentagem

RESUMO

CERCEAU, Cristiane Isaac, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2018. **Desenvolvimento e validação de métodos para quantificação de constituintes majoritários em óleos essenciais por ressonância magnética nuclear.** Orientador: Luiz Claudio de Almeida Barbosa. Coorientadores: Elson Santiago de Alvarenga e Antônio Jacinto Demuner.

A cromatografia gasosa, com detector de massas (CG-EM) e de ionização de chamas (CG-DIC), é a técnica mais utilizada para identificação e quantificação dos constituintes de óleos essenciais. Apesar de ser extremamente sensível, a análise por CG é bastante demorada. Neste trabalho, métodos rápidos e eficientes usando RMN de ^1H foram desenvolvidos e validados para determinação de α -bisabolol em óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* (candeia); de α -pineno em óleos essenciais de *Eucalyptus*, *Corymbia*, *Schinus terebinthifolius* (pimenta rosa) e em derivados de terebintina (um líquido obtido por destilação de resina de coníferas). Também foi feita determinação simultânea de citronelal, de citronelol e de geraniol em óleos essenciais comerciais de *Cymbopogon nardus* e de *Cymbopogon winterianus* (citronela) usando RMN de ^1H . Os resultados obtidos usando os métodos de RMN foram comparados aos obtidos pelo método cromatográfico usando normalização de áreas (CG-N), padronização interna (CG-PI) e padronização externa (CG-PE). Todos os parâmetros avaliados (seletividade, linearidade, exatidão/precisão, repetibilidade, robustez, estabilidade do analito e do padrão interno em solução) mostraram resultados satisfatórios de acordo com as resoluções normativas vigentes (ANVISA - RE 899 e ABNT - NBR 14029) para todos os métodos desenvolvidos. Embora RMN de ^1H seja uma técnica menos sensível que CG, os métodos de RMN de ^1H desenvolvidos atendem com sucesso à quantificação de constituintes majoritários em óleos essenciais. Análise de variância (ANOVA) e testes de Tukey com 95% de confiança mostraram que não houve diferença significativa entre os valores encontrados pelo método de RMN de ^1H em relação aos métodos cromatográficos CG-N, CG-PI e CG-PE para determinação de α -pineno nos óleos avaliados. Entretanto, o método de RMN de ^1H desenvolvido para quantificação de α -bisabolol em óleo essencial de candeia é adequado para 73% dos óleos avaliados. Os outros 27% dos óleos de *E. erythropappus* tem maior número de

constituintes e o teor de α -bisabolol foi superestimado devido à sobreposição do sinal usado para quantificação deste terpeno com sinais dos compostos *ar*-curcumeno e β -bisaboleno, no espectro de RMN de ^1H desses óleos. Essa limitação foi contornada pelo emprego da técnica de RMN de ^1H bidimensional denominada COSY. Essa técnica, além de ser rápida (16 min), apresentou desvio padrão inferior a 0,3%. Para determinação de citronelal, citronelol e geraniol nos óleos essenciais comerciais de citronela, a similaridade entre os métodos CG-N, CG-PI e RMN de ^1H também foi comprovada por análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey com 95% de confiança. Entretanto, as pequenas diferenças encontradas nos teores de citronelal (amostra C2) e de geraniol (amostras C3 e C6) usando o método de CG-N quando comparadas aos resultados obtidos pelos métodos de RMN de ^1H e de CG-PI, confirmaram a dependência do método de CG-N com a definição de parâmetros para integração que incluem ou excluem picos no cromatograma, influenciando no teor dos analitos.

ABSTRACT

CERCEAU, Cristiane Isaac, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2018. **Development and validation of methods for quantification of major constituents in essential oils by nuclear magnetic resonance.** Adviser: Luiz Claudio de Almeida Barbosa. Co-Advisers: Elson Santiago de Alvarenga and Antônio Jacinto Demuner.

Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and with flame ionization detection (CG-FID) is the most used technique for identification and quantification of constituents of essential oil, respectively. Although highly sensitive, GC analysis is time consuming. In this work, fast and efficient methods using ^1H NMR were developed and validated for determination of α -bisabolol in essential oils of *Eremanthus erythropappus* (candeia); α -pinene in essential oils of *Eucalyptus*, *Corymbia*, *Schinus terebinthifolius* (pink pepper), and turpentine derivatives (a liquid obtained by distillation of resin from conifers). Simultaneous determination of citronellal, citronellol, and geraniol in commercial essential oils of *Cymbopogon nardus* and *Cymbopogon winterianus* (citronella) using ^1H NMR was also performed. The results obtained using the NMR methods were compared to those obtained by the chromatographic method using area normalization (GC-N), internal standardization (GC-IS) and external standardization (GC-ES). All parameters evaluated (selectivity, linearity, accuracy/precision, repeatability, robustness, analyte stability, and internal standard in solution) showed satisfactory in accordance with the current normative resolutions (ANVISA - RE 899 e ABNT - NBR 14029) for all methods developed. Although ^1H NMR is a less sensitive technique than GC, the developed ^1H NMR methods can be successfully used the quantification of major constituents in essential oils. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's tests with 95% confidence showed that there was no significant difference between the values found by the method of ^1H NMR in relation to the chromatographic methods GC-N, GC-IS and GC-ES for determination of α -pinene in the evaluated oils. However, the ^1H NMR method developed for quantification of α -bisabolol in essential oils of candeia is suitable for 73% of the evaluated samples. The remaining 27% of the *E. erythropappus* oils have a greater number of constituents and the β -bisabolol content was overestimated due to the overlap

of the signal used for quantification of this terpene with signals of the *α*-curcumene and β -bisabolene compounds in the ^1H NMR spectrum of these oils. This limitation was circumvented by the use of the two dimensional ^1H NMR contour map COSY. This technique in addition to being fast (16 min), showed a standard deviation of less than 0.3%. For quantification of citronellal, citronellol and geraniol in commercial citronella essential oils, the similarities between the GC-N, GC-IS and ^1H NMR methods were also confirmed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test with 95% reliable. However, the small differences found in citronellal (sample C2) and geraniol (samples C3 and C6) levels using the GC-N method when compared to the results obtained by ^1H -NMR and CG-IS methods, confirmed the dependence of the method of CG-N with the definition of parameters for integration that include or exclude peaks in the chromatogram, influencing the analytes content.

INTRODUÇÃO GERAL

Óleos essenciais são misturas de substâncias odoríferas e voláteis provenientes do metabolismo secundário de plantas, constituídas principalmente por hidrocarbonetos, como monoterpenos e sesquiterpenos, fenilpropanóides (Bizzo *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2016) e por compostos oxigenados, tais como ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis, dentre outras substâncias de baixa massa molecular (Souza *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais possuem grande aplicação na perfumaria, cosméticos, alimentos e medicamentos. São empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias e em composições farmacêuticas, sendo comercializados tanto na sua forma bruta quanto na beneficiada (Craveiro e Queiroz, 1993; Silva-Santos *et al.*, 2006; Bizzo *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2010), fornecendo substâncias puras como α -pineno e α -bisabolol, citronelal, citronelol e geraniol, estudadas neste trabalho.

O α -pineno é um componente típico dos óleos e resinas de eucaliptos e pinheiros que apresenta diversas atividades biológicas tais como, bactericida, fungicida, inseticida, pesticida, anticancerígena, antioxidante, imunestimulante e anti-inflamatória (Mercier *et al.*, 2009).

O α -bisabolol, encontrado principalmente na madeira da candeia (*Eremanthus erythropappus*), tem grande importância na indústria farmacêutica e cosmética, apresentando ação anti-inflamatória (Vila *et al.*, 2010), anticancerígena (Kamatou e Viljoen, 2010), bactericida; antimicótica; cicatrizante e antisséptica (Andrade, 2009).

Os compostos citronelal, citronelol e geraniol são isolados do óleo essencial das espécies *Cymbopogon nardus* e *Cymbopogon winterianus* e utilizados em fragrâncias e em cosméticos (Silva-Santos *et al.*, 2006). Além disso, citronelol tem atividade acaricida e antimicrobiana e geraniol é usado em produtos de limpeza doméstica (Chen e Viljoen, 2010).

O Brasil é responsável por 8% da produção mundial de óleo essencial e as exigências de exportação para garantir a qualidade desses óleos são cada vez maiores (Lubbe e Verporte, 2011). Além disso, o preço dos óleos essenciais varia

conforme o teor de seus constituintes majoritários, o que justifica a necessidade do controle da composição e autenticidade dos óleos essenciais comerciais.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e com detecção por ionização em chamas (CG-DIC) é a técnica mais utilizada para identificação e quantificação dos constituintes de óleos essenciais, respectivamente. Embora CG seja extremamente sensível, é muito demorada e, em algumas análises, é necessário seleção de colunas (AbouZid, 2016; Cerceau *et al.*, 2016b).

Desta forma, o desenvolvimento de métodos rápidos e eficientes que possam ser utilizados no controle de qualidade de óleos essenciais é fundamental.

Este trabalho foi dividido em quatro capítulos. No primeiro capítulo foram apresentados fundamentos teóricos de Ressonância Magnética Nuclear quantitativa (RMNq) e de validação de métodos analíticos. Nos demais capítulos, (2, 3 e 4) foram desenvolvidos e validados métodos para quantificação de constituintes majoritários de óleos essenciais por RMN de ^1H . Sendo no capítulo 2 para quantificar α -pineno em óleo essencial de *Eucalyptus*, *Corymbia*, *Schinus terebinthifolius* (pimenta rosa) e terebintina, no capítulo 3 α -bisabolol em óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* e no capítulo 4 para determinação simultânea de citronelal, de citronelol e de geraniol em óleo essencial de citronela comercial.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1. Ressonância Magnética Nuclear quantitativa (RMNq)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é rotineiramente utilizada para caracterização e elucidação de estruturas de novos compostos sintéticos e de produtos naturais (Holzgrabe, 2010). Há alguns anos, essa técnica vem sendo usada como ferramenta quantitativa e os primeiros relatos da utilização de RMN para quantificação datam de 1963, quando Jungnickel e Forbes determinaram a razão entre átomos de hidrogênios intramoleculares em 26 substâncias orgânicas. Neste mesmo ano, Hollins quantificou aspirina, fenacetina e cafeína em uma mistura de analgésicos comerciais utilizando RMN de ^1H (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012). Entre 1965 e 1990 Turczan e colaboradores também utilizaram esta mesma técnica para determinar a pureza e o teor de diferentes princípios ativos em medicamentos (Bharti e Roy, 2012). Em 1980 um método para quantificação da gentamicina usando RMN de ^1H foi descrito na Farmacopeia Alemã (Holzgrabe, 2010).

Hoje em dia, a ressonância magnética nuclear quantitativa (RMNq) de ^1H é uma técnica aplicada para quantificação e controle de qualidade em diversas áreas como vacinas, peptídeos (Holzgrabe, 2010), gasolina (Meusinger, 2010) fluidos corporais (facilitando o diagnóstico de doenças e o controle de tratamento da toxicodependência), monitoramento de processos de reação em fluxo, determinação da relação entre diastereoisômeros (Holzgrabe, 2010) e, principalmente, na caracterização de produtos naturais (Cerceanu *et al.*, 2016a; Cerceanu *et al.*, 2016b), medicamentos, metabólitos (Bussy *et al.*, 2016) alimentos (Berregi *et al.*, 2007; Bizzo e Hovell, 2009; Campo *et al.*, 2010; Ohtsuki *et al.*, 2015) e bebidas (Rodrigues *et al.*, 2010).

Além do núcleo de ^1H , outros núcleos têm sido utilizados para quantificação por RMN em diferentes matrizes. Os mais comuns são ^{15}N usado na determinação de matéria orgânica em solos e na quantificação de proteínas; ^{31}P para determinação de fosfolipídios, fósforo inorgânico e compostos orgânicos fosforados, tais como inseticidas; ^{19}F utilizado para quantificação de

medicamentos e produtos químicos agrícolas e ^{13}C usado para controle de qualidade de medicamentos, produtos naturais e alimentos (Parikh e Gadape, 2011; Bharti e Roy, 2012).

1.2. Princípios da Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa (RMNq)

A RMNq é fundamentada pela Equação 1.1, na qual a intensidade de um sinal I em um espectro de RMN é diretamente proporcional ao número de núcleos N que absorvem energia na radiofrequência referente a este sinal, desde que a constante do espectrômetro (K_s) tenha o mesmo valor ao longo de todo espectro. Assim, a quantificação pode ser realizada simplesmente por medição da área sob um sinal representado pela integral (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012).

$$I = K_s \times N$$

Equação 1.1

Entretanto, para que essa equação seja utilizada de forma a se obter uma quantificação eficiente, os seguintes pré-requisitos são necessários:

1.2.1. Não sobreposição do sinal do composto de interesse: pelo menos um sinal do analito de interesse deve estar separado dos demais sinais dos constituintes da mistura no espectro de RMN (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012).

A avaliação da sobreposição de sinais em um espectro de RMN de ^1H de uma mistura é realizada pela razão entre átomos de hidrogênio intramoleculares, determinada pela integral da área dos sinais (Figura 1.1). No caso de misturas complexas, quando o RMN de ^1H não é suficiente para avaliar a sobreposição de sinais, técnicas de RMN em duas dimensões como COSY (Homonuclear COrrrelation SpectroscopY) (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012) e HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) (Sette *et al.*, 2013) podem ser utilizadas (Figura 1.2).

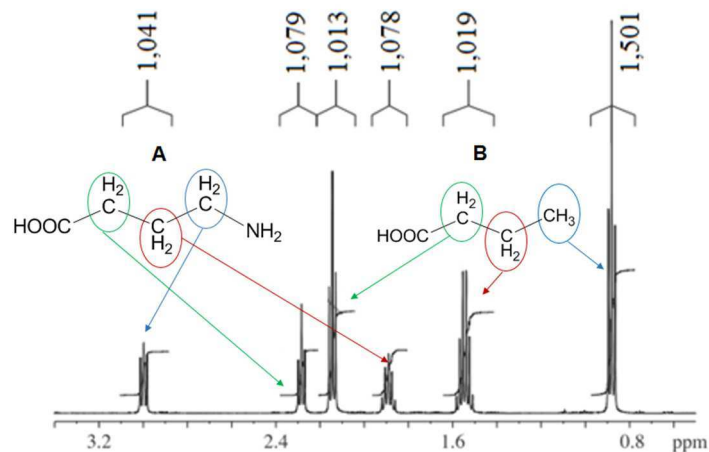


Figura 1.1. Espectro de RMN de ^1H da mistura de (A) ácido γ -aminobutírico e (B) ácido butírico mostrando valores relativos de integrais de ressonância intramolecular (Bharti e Roy, 2012 adaptada).

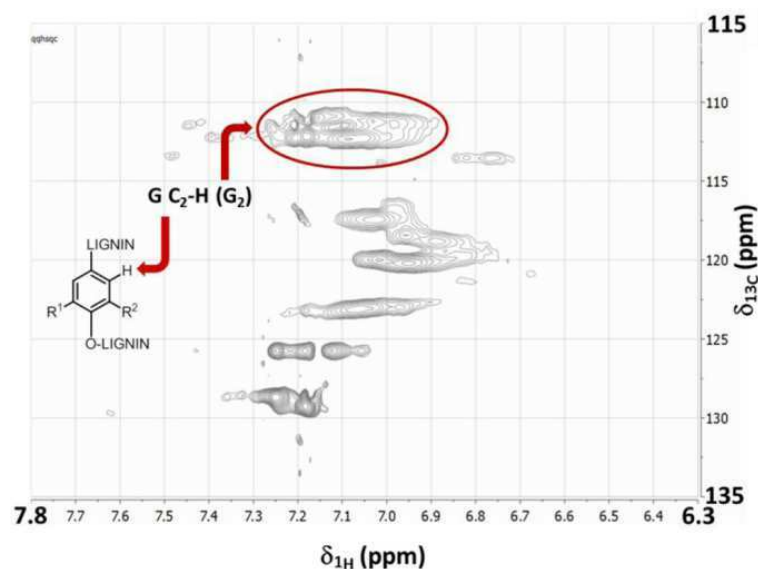


Figura 1.2. Diagrama de contorno rápido-HSQC quantitativo de lignina em DMSO- d_6 obtido utilizando um espectrômetro de RMN de 600 MHz equipado com criosonda (Sette *et al.*, 2013).

1.2.2. Ausência de bandas satélites: bandas satélites de ^{13}C (Figura 1.3) e de ^{29}Si podem interferir no sinal de interesse do analito, alterando a área a ser integrada e, conseqüentemente, influenciando na exatidão/precisão dos resultados obtidos. Dessa forma, para fins de quantificação, a área das bandas satélites deve ser subtraída da área do sinal do composto a ser quantificado ou um experimento utilizando desacoplamento heteronuclear como o *Globally*

Optimized Alternating-Phase Rectangular Pulses (GARP) deve ser realizado (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012).

Em um espectro de RMN de ^1H adquirido usando GARP (Figura 1.4), o desacoplamento dos sinais de ^{13}C ocorre por irradiação no centro de frequência de carbono durante o tempo de aquisição (Aq) do decaimento livre de indução (FID). Esse procedimento permite a obtenção de um espectro de RMN de ^1H sem sinais dos satélites de ^{13}C (Leal, 2013).

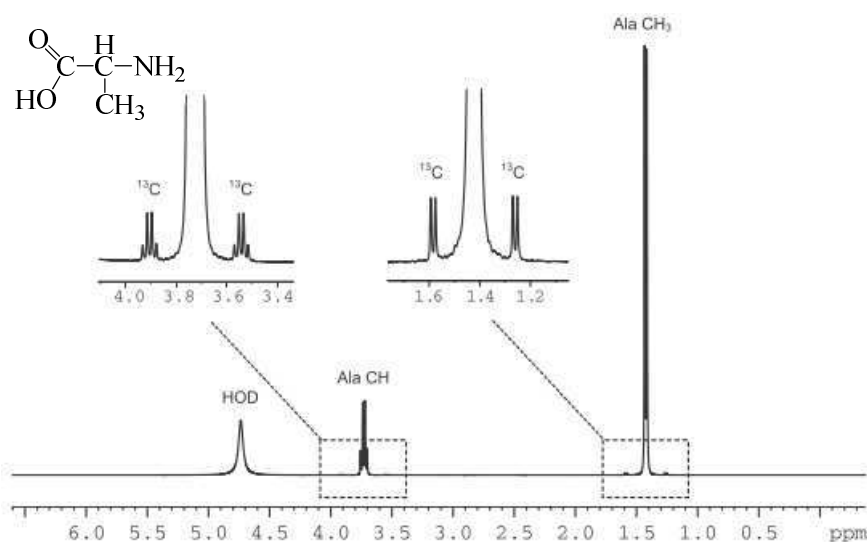


Figura 1.3. Espectro de RMN de ^1H da alanina (Ala) em D_2O utilizando um espectrômetro de RMN de 400 MHz (50mg/750 μL , 128 transientes) (Holzgrabe, 2010).

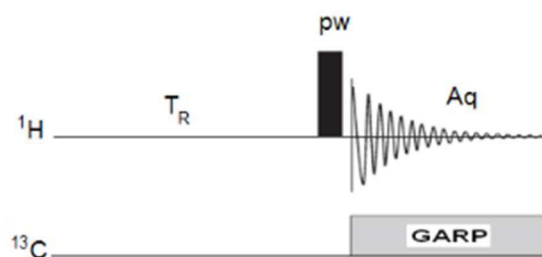
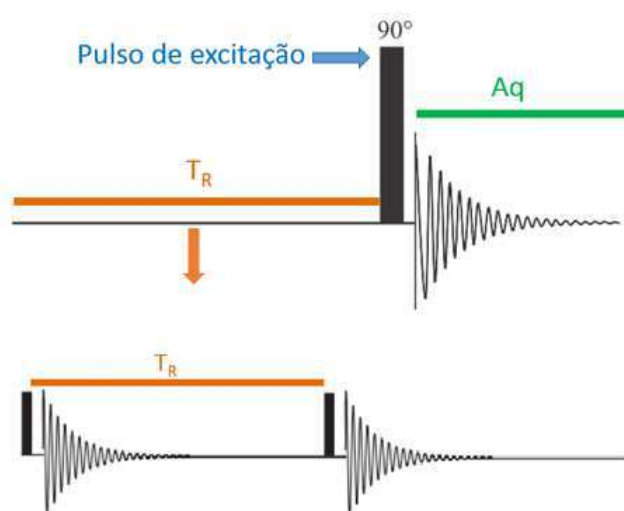


Figura 1.4. Esquema de sequência de pulso de RMN de ^1H utilizando GARP para eliminar os sinais satélites de ^{13}C de um espectro de RMN de ^1H (Leal, 2013).

1.2.3. Aquisição de espectros sem rotação da amostra: a rotação da amostra pode gerar bandas laterais, que são sinais indesejados que também podem interferir na área dos sinais usados para quantificação, resultando em

quantificações errôneas (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012; Joseph e Szabo, 2013).

1.2.4. Constante do espectrômetro (K_s): o valor da constante do espectrômetro deve ser o mesmo para todos os sinais no espectro de RMN. Entretanto, para que isso aconteça, alguns parâmetros de aquisição como pulso de excitação, tempo de aquisição (Aq), tempo de relaxação longitudinal (T_1) e tempo de repetição (T_R) devem ser otimizados (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012). Tais parâmetros estão exemplificados em uma sequência de pulsos para aquisição de hidrogênio (Figura 1.5).



Fonte: Próprio autor

Figura 1.5. Sequência de pulso para aquisição de RMN de 1H .

- *Pulso de excitação (pw):* é utilizado para excitar simultaneamente todos os núcleos magnéticos da mistura de constituintes a serem quantificados. Este pulso de excitação deve ser uniforme ao longo do espectro para garantir que não haja interferência das bandas de excitação lateral nas extremidades da janela espectral. Para isso, são necessários pulsos calibrados e curtos, normalmente 10 μs no caso dos espectros de RMN de 1H (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012; Joseph e Szabo, 2013).

Para que a calibração seja alcançada, uma sequência de experimentos é registrada com um pulso de excitação aumentado progressivamente. Um pulso de

90° desloca a magnetização resultante (M^0) para o eixo positivo de y (+y), onde o sinal máximo é obtido. Em contraste, um pulso de 180° coloca o vetor de magnetização inteiro no eixo negativo de z (-z) e então resulta em ausência de sinal. Um pulso de 270° resulta em um sinal máximo negativo pois coloca M^0 em -y, e de 360° retorna a magnetização para a posição inicial ao longo de +z resultando em ausência de sinal mais uma vez. Usualmente, a calibração é feita com valores de pulsos em torno de $4 \times 10 \mu\text{s}$. Quando um determinado pulso resulta em ausência de sinal, esse valor é dividido por 4 para dar o pulso calibrado. A variação na intensidade dos sinais obtidos durante o ciclo de calibração é ilustrada na Figura 1.6 (Keeler, 2002; Claridge, 2009).

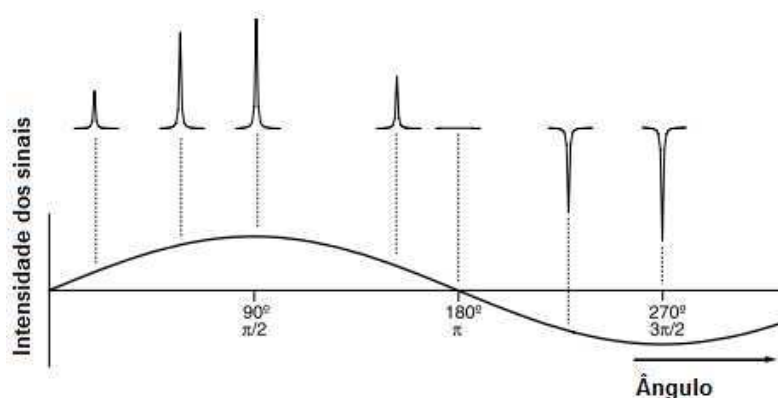


Figura 1.6. Calibração da largura do pulso. A intensidade dos sinais varia conforme a curva. Os sinais esperados para os diferentes ângulos são indicados pelas linhas tracejadas (Keeler, 2002).

Para fins de quantificação podem ser utilizados pulsos de 90°, 45° e 30°, sendo que um ângulo de pulso de 90° permite uma maior intensidade de excitação dos spins.

- *Tempo de aquisição (Aq)*: trata-se do tempo que os spins excitados levam para perder a energia de excitação e retornar ao seu estado original de energia, após a interrupção do pulso de excitação. Cada núcleo magnético emite energia em uma frequência específica. Dessa forma, como existem diversos núcleos magnéticos na mistura a ser quantificada, diferentes radiações eletromagnéticas são emitidas simultaneamente, originando o decaimento de

indução livre (DIL), do inglês *FID*¹ (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012; Joseph e Szabo, 2013).

Para fins de quantificação, um tempo de aquisição suficiente deve ser usado para evitar a limitação do FID (truncamento), o que pode ocasionar o aparecimento de artefatos no espectro, distorção na linha de base e perda de resolução espectral, resultando em medições imprecisas de intensidades dos sinais (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012).

A Figura 1.7, mostra sinais de RMN de ¹H nos quais foram aplicados diferentes tempos de aquisição. O tempo de aquisição de 4 s (Figura 1.7 A) foi suficiente para aquisição do FID. Entretanto, um Aq de 1 s (Figura 1.7 B) foi insuficiente, levando ao truncamento do FID.

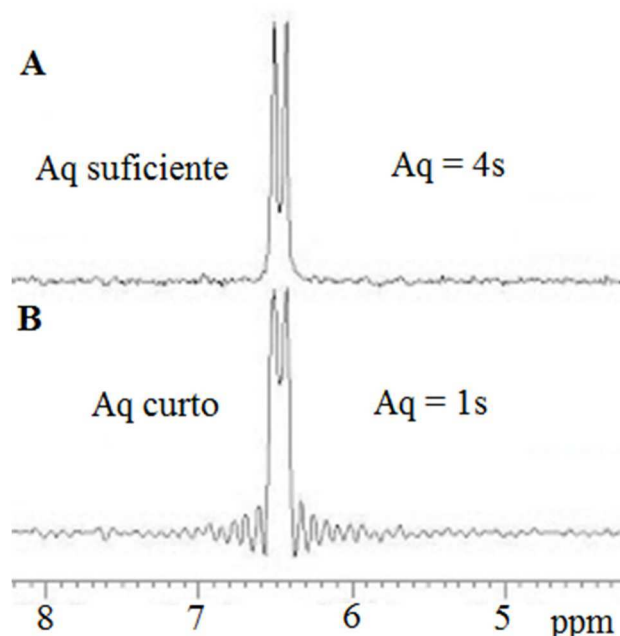


Figura 1.7. Corte de espectro de RMN de ¹H mostrando um sinal no qual o Aq utilizado foi suficiente para aquisição do FID (A) e um sinal no qual ocorre o truncamento do FID (B) (University of Ottawa NMR Facility Blog).

- *Tempo de repetição (T_R):* é o tempo total gasto para adquirir um espectro utilizando uma única varredura. Em outras palavras, T_R corresponde ao intervalo entre dois pulsos de excitação consecutivos (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012; Joseph e Szabo, 2013).

¹ Do inglês Free Induction decay

O tempo de repetição depende do maior tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios presentes em uma amostra, incluindo os hidrogênios do padrão interno. Dessa forma, na aquisição de espectros de RMN de ^1H quantitativos, um tempo de repetição de cinco vezes o valor do maior tempo de relaxação longitudinal ($T_R = 5 \times T_1$) deve ser utilizado, de forma a garantir que 99,3% da magnetização em equilíbrio seja medida, obtendo-se resultados mais exatos e precisos (Maltz e Jancke, 2005; Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012).

A sequência de pulsos de inversão-recuperação (Figura 1.8-b) é a mais utilizada para determinação dos valores de T_1 . Em resumo, um sistema de spin no equilíbrio térmico é perturbado e, em seguida, sua recuperação em função do tempo é observada.

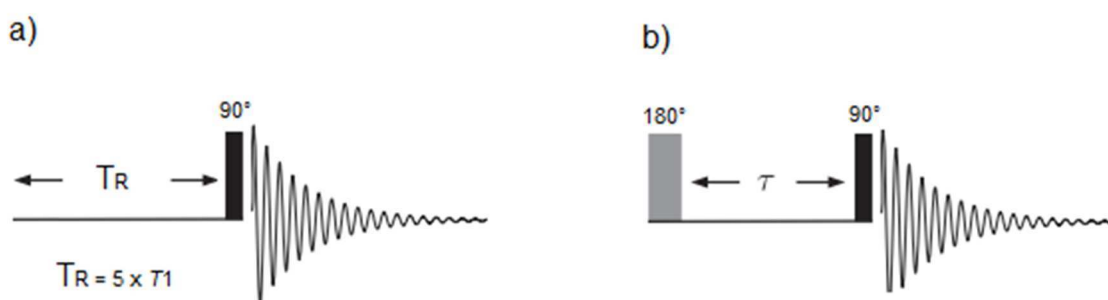
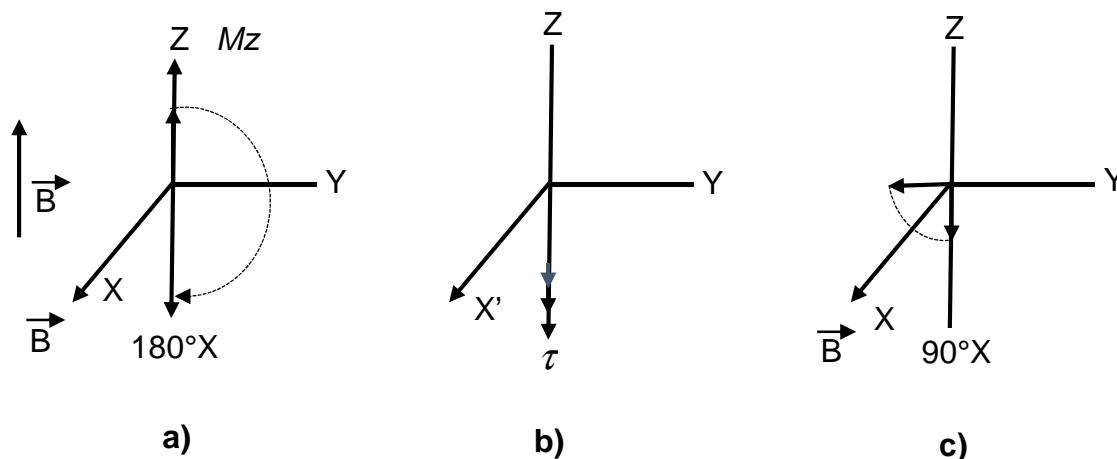


Figura 1.8. a) Sequência de pulso para aquisição de RMN de ^1H quantitativo; b) Sequência inversão-recuperação para determinação dos valores do tempo de relaxação longitudinal dos spins (T_1) (Keeler, 2002 adaptada).

Um pulso de 180° desloca a magnetização do eixo $+z$ para para o eixo $-z$. A seguir, a relaxação longitudinal começa a ocorrer e a magnetização do eixo $-z$ diminui gradativamente, passando pelo plano $x-y$ e, ocasionalmente, retornando ao eixo $+z$ a uma taxa dependente de T_1 . Posteriormente a um período τ , após o pulso de 180° , um pulso de 90° é aplicado e a magnetização retorna ao plano $x-y$, no qual a intensidade do sinal é monitorada (Figura 1.9) (Keeler 2002; Claridge, 2009).



Fonte: Próprio autor

Figura 1.9. Processo de inversão-recuperação. a) Efeito do pulso de radiofrequência de 180° sobre a magnetização; b) Relaxação longitudinal durante o tempo τ ; c) Efeito do pulso de radiofrequência de 90° sobre a magnetização, após o tempo τ .

Um espectro invertido, ou seja, com intensidade máxima no eixo -y é obtido quando um τ de zero for utilizado. Entretanto, um sinal de intensidade máxima é obtido no eixo +z, quando o valor de τ , entre os dois pulsos, for superior ao tempo de relaxamento completo.

O relaxamento dos spins é monitorado pela repetição do experimento aumentando progressivamente os valores de τ (Figura 1.9). A intensidade da magnetização detectada, M_t , é determinada pela Equação 1.2:

$$M_t = M_0 (1 - 2e^{-\tau/T_1}) \quad \text{Equação 1.2}$$

Onde M_0 corresponde à magnetização de equilíbrio.

A Figura 1.10 ilustra um experimento de inversão-recuperação para determinar o tempo de relaxação longitudinal dos hidrogênios da alanina em D₂O. Diferentes valores de tempo de relaxação longitudinal foram observados para cada tipo de hidrogênio magneticamente diferente da alanina (T_1 próximo a 5,2 s e a 2,2 s, respectivamente para os hidrogênios do CH e do CH₃).

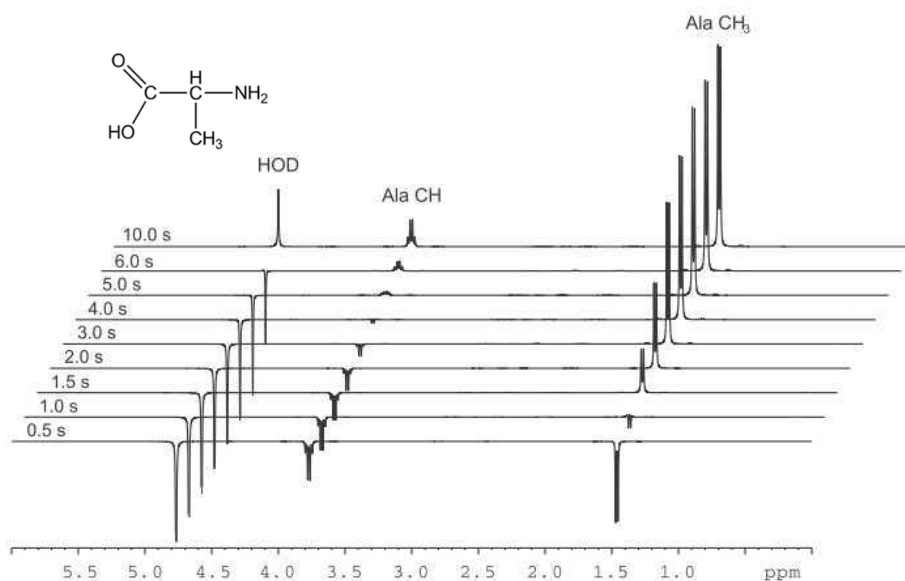


Figura 1.10. Experimento de inversão-recuperação usado para medir valores de T_1 para hidrogênios da alanina em D_2O (RMN de 1H de 400 MHz; $T_R = 75$ s) (Holzgrabe, 2010).

1.2.5. Razão sinal ruído (S/R): a precisão da integração dos sinais depende sensivelmente da razão sinal ruído (S/R), influenciando na exatidão/precisão das medidas obtidas por RMNq. Assim, para obtenção de uma elevada precisão (incerteza inferior a 1%), a relação S/R deve ser superior a 250:1; 300:1 e 600:1 para núcleos de 1H , ^{19}F e ^{31}P , respectivamente (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012).

Sinais eletrônicos aleatórios, perceptíveis no espectro pela presença de flutuações da linha-base dos sinais dos compostos analisados, dão origem ao ruído. Como o ruído é aleatório, o uso de um maior número de repetições para aquisição dos espectros aumenta a intensidade dos sinais, enquanto o ruído permanece constante. Assim, quanto maior o número de transientes utilizado na aquisição dos espectros, maior será a razão S/R. No entanto, essa razão S/R aumenta com a raiz quadrada do número de varreduras, conforme Equação 1.3, a seguir.

$$(S/R) = f \sqrt{n}$$

Equação 1.3

Dessa forma, a aquisição de espectros usando um número de transientes de 64 em vez de 16, resulta na obtenção de sinais com razão S/R duas vezes maior. Entretanto, ao aumentar o número de transientes de 64 para 128, um aumento de 1,41 na razão S/R é observado (Bharti e Roy, 2012).

1.2.6. Parâmetros de processamento e integração dos sinais: a exatidão/precisão da integração da área de um sinal e, conseqüentemente, da quantificação dos analitos de interesse, depende da escolha de parâmetros apropriados para o processamento do espectro de RMN (Holzgrabe *et al.*, 2005).

1.2.6.1. Preenchimento com zero vs. predição linear

O preenchimento com zero aumenta a resolução digital do espectro através da interpolação de pontos de dados que são adicionados no domínio da frequência (Figura 1.11). É utilizado quando se pretende melhorar a definição das formas dos sinais em um espectro de RMN, embora o FID adquirido tenha decaído a zero (Claridge, 2009).

Nesses casos em que o FID decaiu a zero, o aumento do tempo de aquisição resultaria em um aumento do ruído no espectro. Isso porque, apesar da resposta de RMN decair ao longo do FID, o ruído permanece constante e iria dominar a cauda. Dessa forma, o preenchimento com zeros seria uma boa alternativa para melhorar a definição das linhas de ressonâncias, permitindo a observação de estruturas finas de multipletos e/ou a medição precisa das intensidades dos sinais utilizados para quantificação (RMNq) (Claridge, 2009).

Nos casos em que o FID adquirido não decaiu a zero, o conjunto de dados é dito truncado (Figura 1.12-a). A utilização do preenchimento com zeros em FIDs truncados resultaria em distorções simétricas nas bases dos sinais (Figura 1.12-b). Para solucionar este problema poderiam ser utilizadas tanto as funções de janela (item 1.2.6.2) como o método de predição linear (PL) (Claridge, 2009).

O método de predição linear (PL) é utilizado para retificar dados corrompidos ou distorcidos e para ampliar FIDs truncados. No PL, ao invés de adicionar zeros, os valores dos pontos de dados são estimados, usando informações dos pontos anteriores, estendendo o FID por meio de uma combinação linear de dados (Figura 1.12-c). Dessa forma, na predição linear os

dados obtidos são mais próximos dos verdadeiros que no preenchimento com zeros. Além disso, PL melhora a resolução, evita a necessidade de utilização de funções de apodização e atenua os erros de truncamento (Claridge, 2009).

O método de predição linear é mais utilizado em FIDs truncados em experimento em 2D ou em 3D, uma vez que é necessário um ruído elevado no FID para que os dados sejam previstos de forma precisa. Além disso, a quantidade de pontos utilizados para a predição linear tem que ser muito maior que a quantidade de linhas que compõem o FID (Claridge, 2009).

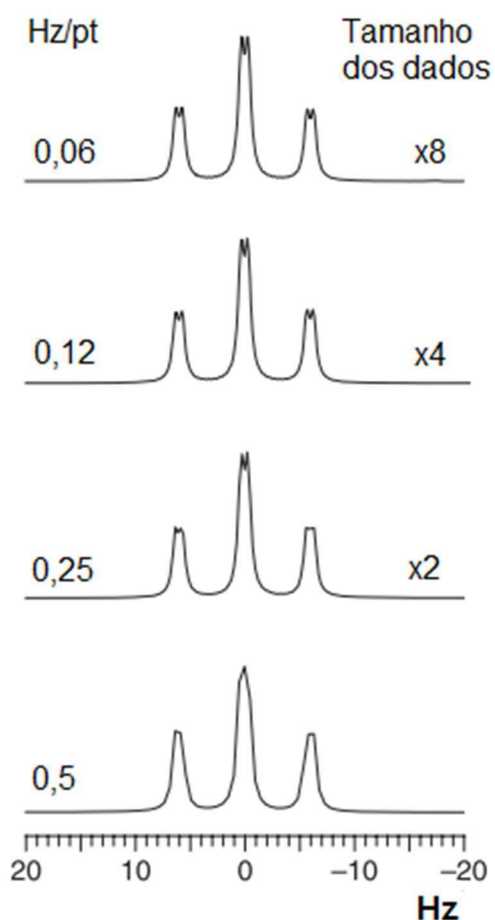


Figura 1.11. Efeitos do preenchimento com zero no aprimoramento de estrutura fina e na definição da forma da linha espectral (Claridge, 2009).

Na Figura 1.13 é possível observar a melhora da resolução dos picos em um experimento de correlação heteronuclear 2D submetido ao procedimento de predição linear.

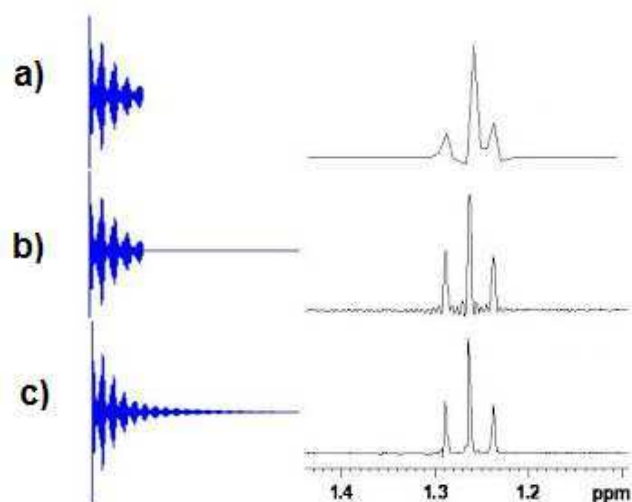


Figura 1.12. Processamento de um FID truncado. a) FID truncado não tratado; b) O FID truncado em (a) que foi estendido por preenchimento com zero produzindo ondulações no espectro, c) predição linear do FID em (b) (University of Ottawa NMR Facility Blog).

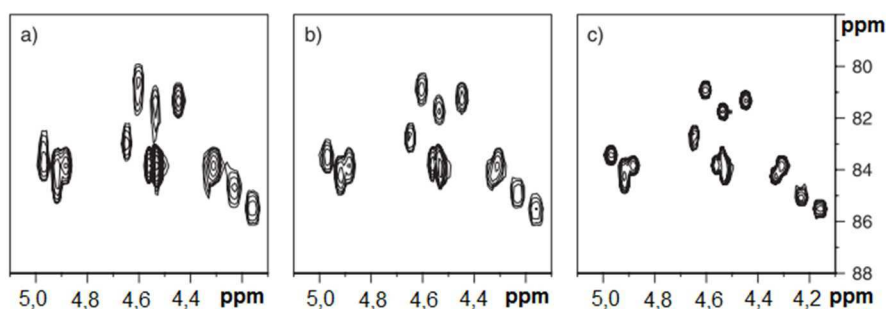


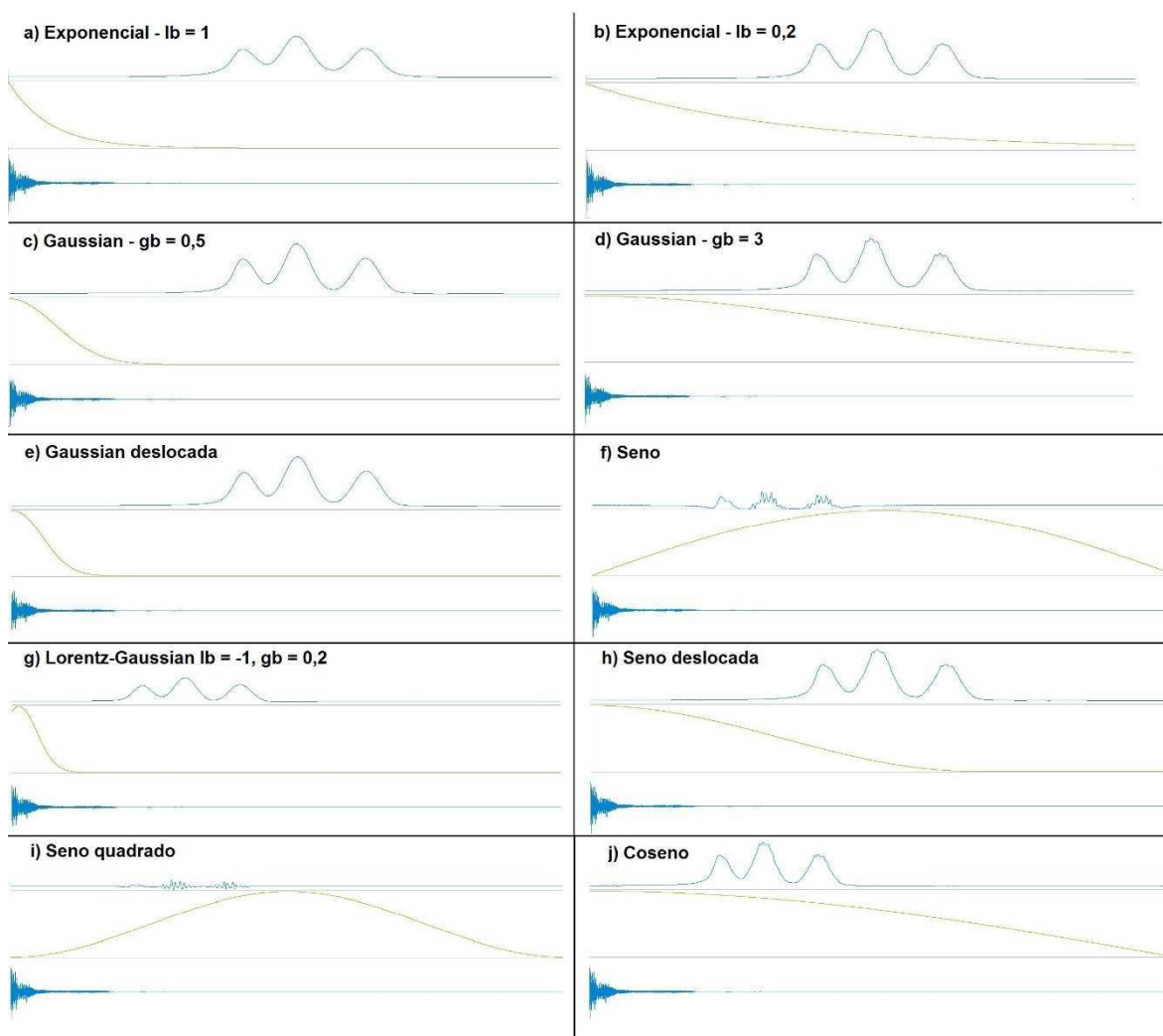
Figura 1.13. Melhoria da resolução do pico em um experimento de correlação heteronuclear 2D carbono-hidrogênio através da predição linear (PL). Os mesmos dados brutos foram usados em cada espectro, com a dimensão F1 (carbono) processada com: a) nenhuma extensão de dados, b) um preenchimento com zero e c) PL no lugar do preenchimento com zeros (Claridge, 2009).

1.2.6.2. Funções de janela

As funções de janela (Figura 1.14), também chamadas de funções de apodização, são empregadas na manipulação de dados de RMN, antes destes dados serem submetidos à Transformada de Fourier, para melhorar a sensibilidade (razão sinal-ruído) ou a resolução espectral (Bharti e Roy, 2012).

A observação de sinais acima do ruído espectral é proporcionada pela melhora da sensibilidade, enquanto um aprimoramento na resolução permite a visualização das estruturas finas escondidas.

Como a intensidade do sinal de RMN diminui ao longo do tempo de aquisição, enquanto o ruído permanece constante, o nível relativo do ruído é maior na cauda do FID. Dessa forma, uma diminuição do ruído é alcançada aplicando uma função de janela que reduz a cauda do FID, aumentando a sensibilidade (razão sinal-ruído). Uma melhora na resolução espectral pode ser alcançada aplicando uma função que aumente o meio e o fim do FID, retardando o decaimento do sinal e, conseqüentemente, reduzindo a ressonância (Claridge, 2009).



Fonte: Próprio autor

Figura 1.14. Funções de janela comumente usadas para modificar o FID adquirido para aumentar a sensibilidade e/ou a resolução espectral (lb = parâmetro de ampliação da linha; gb^2 = parâmetro de ampliação gaussiano, ou seja, a fração do tempo de aquisição quando a função tem seu valor máximo).

² Do inglês Gaussian broadening

- *Sensibilidade do espectro x ampliação de linha (lb)*

A multiplicação exponencial é a principal função utilizada para melhorar a sensibilidade em um espectro em 1D (Figuras 1.14-a e 1.14-b) (Claridge, 2009; Bharti e Roy, 2012), sendo também utilizada no tratamento dos dados em FIDs truncados (Figura 1.12-c) (Claridge, 2009).

A multiplicação exponencial proporciona o aumento da sensibilidade e a diminuição da resolução espectral, simultaneamente, provocando um alargamento dos sinais de RMN (Figura 1.15). Isso dificulta a integração de sinais próximos, prejudicando a quantificação (Claridge, 2009, Holgrave, 2010). Se o decaimento do sinal for muito rápido, ocorrerá diminuição da razão sinal-ruído, uma vez que o alargamento excessivo das linhas causa uma redução na altura dos sinais. Assim, em RMN de ^1H , lb deve ser igual a resolução digital do espectro, para melhorar a sensibilidade utilizando um aumento mínimo de lb (Claridge, 2009). Em RMN em 1D, a faixa ideal de lb varia entre 0,3 e 1,0 Hz e deve ser otimizada (Bharti e Roy, 2012).

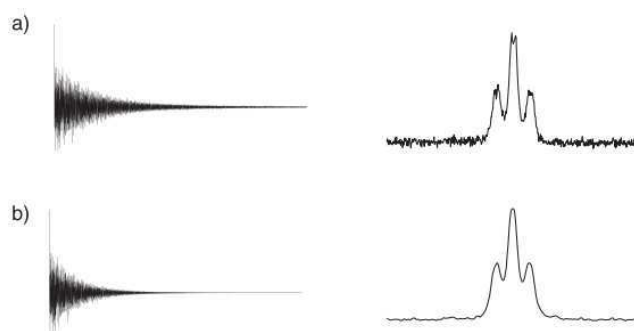


Figura 1.15. Multiplicação exponencial do FID usada para reduzir o ruído no espectro. a) FID cru e espectro após a transformada de Fourier. b) Resultados após o processamento exponencial com $lb = 1$ Hz (Claridge, 2009).

- *Aumento da resolução*

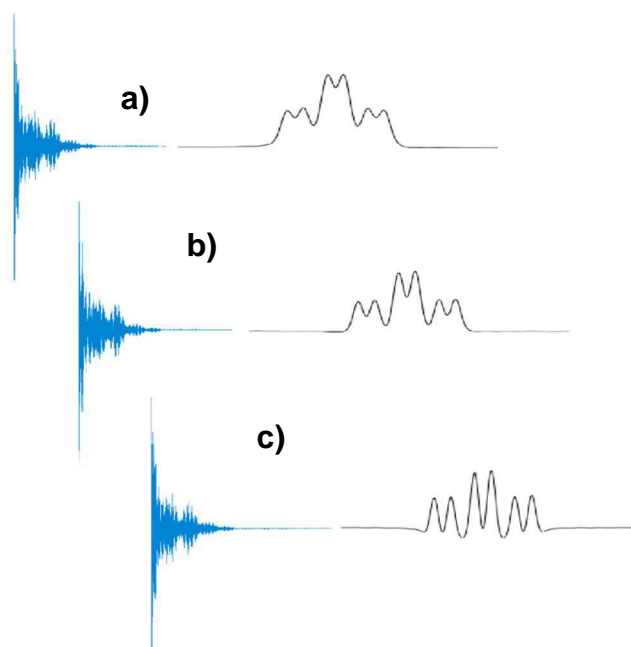
A função Lorentz-Gaussian (Figura 1.14g) é a mais utilizada para melhorar a resolução espectral. Também conhecida como multiplicação duplo-exponencial, essa função evita o decaimento rápido do FID, forçando-o a zero. Como a forma da linha espectral passa de Lorentziana a Gaussiana (Figura 1.16), a função Lorentz-Gaussian possibilita a obtenção de sinais mais separados, uma vez que a linha espectral torna-se mais estreita, principalmente próximo à base dos sinais (Keeler, 2002; Claridge, 2009).



Figura 1.16. Ilustração das formas de linha Lorentziana e Gaussiana (Keeler, 2002).

Na função Lorentz-Gaussian, é possível definir o ponto durante o tempo de aquisição em que a função atinge seu valor máximo (g_b), permitindo uma compensação da diminuição da resolução espectral decorrente do alargamento de linha (l_b). Valores ideais de l_b e de g_b são definidos por tentativa e erro (Claridge, 2009).

Como observado na Figura 1.17, valores negativos de l_b irão proporcionar linhas espectrais mais finas e o posicionamento adequado de g_b reforça esse efeito. Em contrapartida, podem ocorrer distorções da linha de base e diminuição da sensibilidade dos sinais (Claridge, 2009).



Fonte: Próprio autor

Figura 1.17. Função Lorentz-Gaussian usada para melhorar a resolução espectral. a) FID e espectro após transformada de Fourier e resultados após o uso da função Lorentz-Gaussian com (b) $l_b = -1$ Hz, $g_b = 0,2$ e (c) $l_b = -3$ Hz e $g_b = 0,2$.

Diversas funções de janela semelhantes à de Lorentz-Gaussian, foram desenvolvidas para melhorar a resolução sem reduzir a sensibilidade espectral. Dentre elas, a função seno (Figura 1.14-f) é a mais utilizada para processamento de dados em 2D, eliminando efeitos de truncamento do FID. Normalmente, a função seno gera distorções nas formas e diminui a sensibilidade dos sinais em espectros em 1D. Entretanto, esse problema pode ser contornado pelo uso da função seno deslocada (Figura 1.14-h). Assim como na função seno, a seno quadrado (Figura 1.14-i) também é usada no processamento de dados em 2D, mas possui a cauda mais suave nas bordas (Claridge, 2009).

1.2.6.3. Correções de fase e de linha de base

As correções de fase, além de melhorar a forma das linhas espectrais, aumentam a intensidade dos sinais. Podem ser realizadas manual ou automaticamente, embora já tenha sido comprovado que as correções de fase manuais são mais eficientes, apesar de depender da experiência do operador. Já as correções de linha de base são sempre realizadas automaticamente (Holzgrabe *et al.*, 2010).

Os erros de fase em um espectro de RMN surgem após a transformada de Fourier. Existem dois tipos de erros de fase, o de ordem zero e o de primeira ordem.

Os erros de fase de ordem zero ocorrem quando a fase de referência dos sinais de RMN detectados (fase inicial dos vetores de magnetização) é diferente da fase de referência do receptor (Figura 1.18-a). Este erro independe das frequências de ressonância e todas os sinais no espectro são afetados na mesma proporção (Claridge, 2009).

Os erros de fase de primeira ordem ocorrem devido à limitações práticas do espectrômetro e são dependentes da frequência. Após a amostra ser submetida a um pulso de radiofrequência, o espectrômetro leva um tempo para se recuperar do efeito do pulso antes do FID ser coletado (atraso de pré-aquisição - DE). No DE, cada vetor de magnetização evolui de acordo com o seu deslocamento químico, de modo que, no ponto de digitalização, eles não têm mais a mesma fase. Em função desse defasamento, quando a coleta de dados começa, vetores com frequências diferentes desenvolveram uma certa diferença

de fase, que varia em todo o espectro (Figura 1.18-b). Os erros de fase de zero e de primeira ordem são ilustrados nos espectros de RMN de ^1H da Figura 1.19.

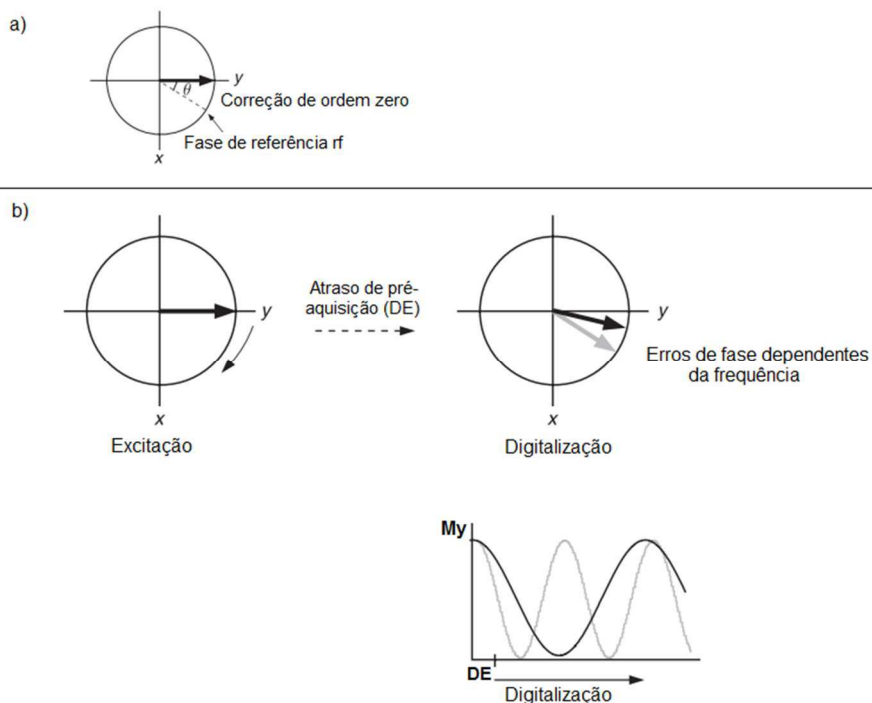
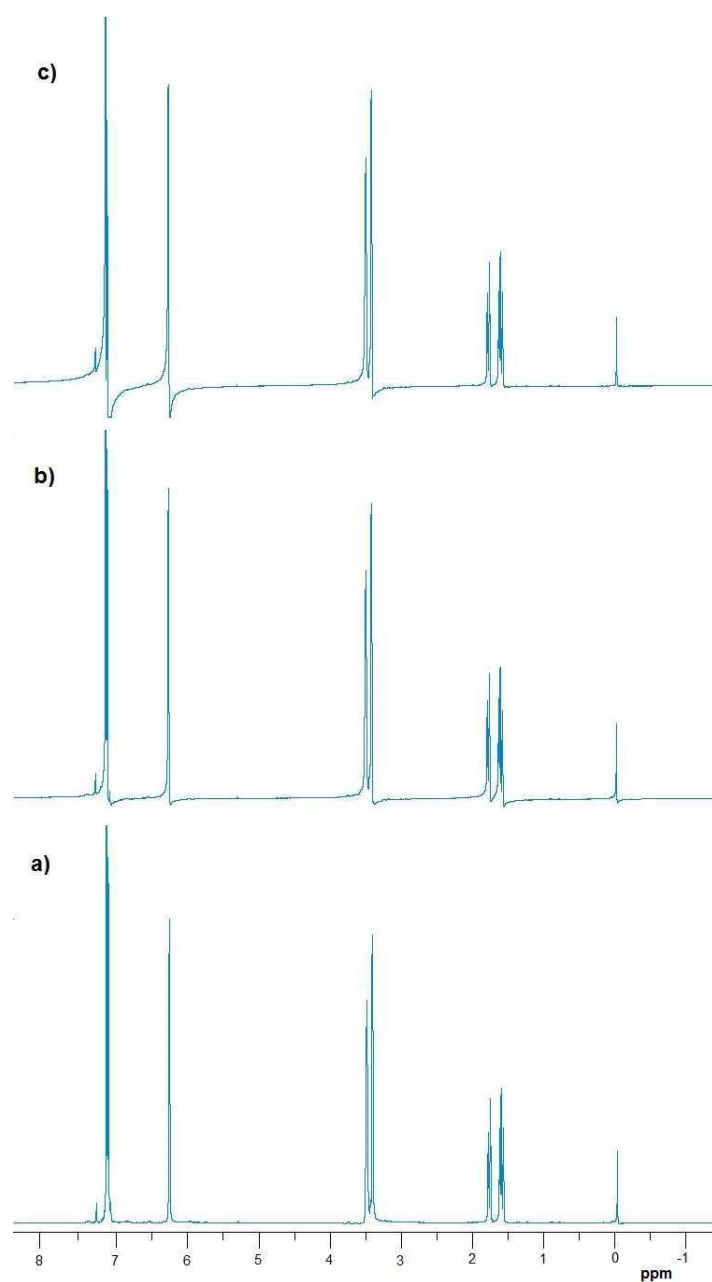


Figura 1.18. Fatores que causam erros de fase de zero (a) e de primeira ordem (b) em espectros de RMN (Claridge, 2009).



Fonte: Próprio autor

Figura 1.19. Erros de fase de zero e de primeira ordem em espectros de RMN de ^1H . (a) Espectro corretamente em fase, (b) espectro na presença de erros de fase independentes da frequência (ordem zero) e (c) espectro na presença de erros de fase dependentes da frequência (primeira ordem).

1.2.6.4. Integração

A integração da área dos sinais é um dos pontos mais importantes na quantificação por RMN, podendo influenciar de forma significativa nos resultados obtidos.

Assim como na correção de fase, a integração também pode ser realizada de forma manual ou automática, sendo que a forma manual fornece resultados mais exatos e precisos que a automática (Holzgrabe, *et al.*, 2010).

1.2.6.5. *Shimming*

Trata-se de um ajuste fino do campo magnético, realizado com o objetivo de se obter um campo magnético demasiadamente homogêneo em torno da amostra. Isso porque um campo magnético não homogêneo causa distorção do sinal, diminuindo a sensibilidade (razão sinal-ruído) e a resolução espectral. A melhora na homogeneidade do campo magnético pode ser evidenciada pelo aumento da altura do sinal de bloqueio (*lock*), pela forma do FID, bem como pela forma e largura da linha de um sinal no espectro de RMN da amostra (Bhart e Roy, 2012).

1.2.6.6. *Sintonização e correspondência*

A sintonização³, como o próprio nome indica, sintoniza a bobina na frequência do núcleo de interesse. Uma sintonização inadequada pode ser evidenciada pelo surgimento de ruídos nos espectros (Claridge, 2009).

A correspondência⁴ é realizada para que o máximo possível de energia de radiofrequência seja transferida do transmissor para a amostra e da amostra para o receptor. Uma sintonização e correspondência ideais variam conforme a amostra a ser analisada, uma vez que as propriedades elétricas são características de cada amostra (Claridge, 2009).

A sintonia e a correspondência inadequadas da frequência do espectrômetro influenciam na eficácia do pulso, resultando em variações na intensidade dos sinais. Dessa forma, para que os resultados obtidos tenham reprodutibilidade, todas as amostras devem ser submetidas a procedimentos de sintonização e correspondência adequados antes da realização dos experimentos (Bharti e Roy, 2012).

³ Do inglês tuning

⁴ Do inglês matching

1.2.6.7. Temperatura

A temperatura afeta a reprodutibilidade dos resultados quantitativos, uma vez que influencia nas propriedades de relaxamento das moléculas. Dessa forma, a temperatura deve ser constante tanto na aquisição dos espectros das amostras como na calibração da referência externa utilizada para quantificação (Bharti e Roy, 2012).

1.3. Fatores que influenciam na sobreposição / separação de sinais

Conforme mencionado, a não sobreposição de pelo menos um sinal do analito de interesse com sinais de outros constituintes da amostra, no espectro de RMN, é um dos principais requisitos para utilização de RMNq. Entretanto, quando todos os sinais do analito de interesse estão sobrepostos a outros sinais, algumas estratégias, discutidas a seguir, podem ser adotadas para promover a separação entre eles.

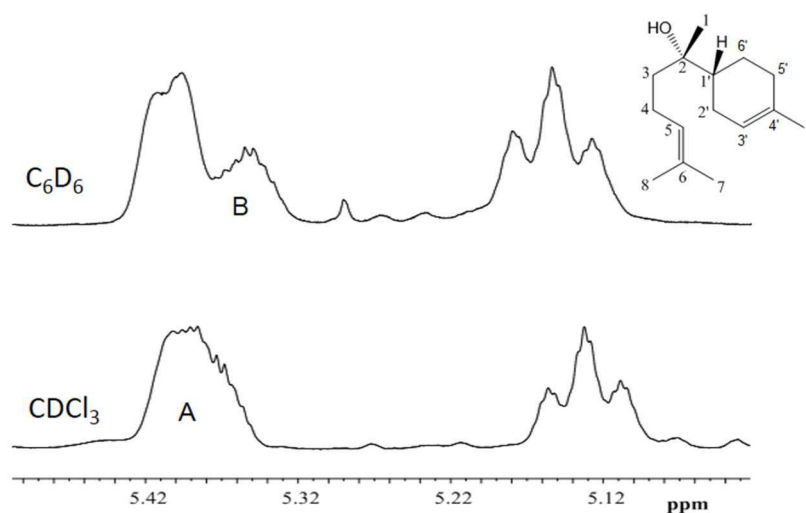
- Efeitos do solvente

Os solventes deuterados utilizados na espectroscopia de RMN podem ser classificados como não-polares aromáticos (benzeno-d₆, tolueno-d₈ e piridina-d₅) e não aromáticos (clorofórmio-d e diclorometano-d₂), além de polares próticos (D₂O e metanol-d₄) e apróticos (DMSO-d₆ e acetonitrila-d₃). A escolha do solvente adequado deve ser feita de acordo com a solubilidade da amostra e com as características espectrais obtidas quando da utilização de determinado solvente (Holzgrabe, 2010).

A obtenção de espectros de RMN de um composto em diferentes solventes pode mudar o deslocamento químico de um sinal, além de alterar a forma da linha e a complexidade do espectro de RMN de ¹H, promovendo a separação de ressonâncias sobrepostas (Holzgrabe, 2010).

A separação de sinais sobrepostos em RMN de ¹H de óleo essencial de *Siparuna guianenses* foi realizada pela substituição de CDCl₃ por C₆D₆, conforme Figura 1.20. O sinal A, no espectro adquirido em CDCl₃ corresponde à sobreposição do sinal H-5' do constituinte majoritário α -bisabolol com sinais de outros terpenos presentes no óleo. Ao substituir o CDCl₃ por C₆D₆, é possível

observar uma separação parcial do sinal H-5' do α -bisabolol (sinal representado por B) em relação aos demais sinais.



Fonte: Próprio autor

Figura 1.20. Expansão do espectro de RMN de ^1H 300 MHz do óleo essencial de *Siparuna guianenses* mostrando a separação do sinal (B) do α -bisabolol dos sinais de outros terpenos (A) quando o solvente CDCl₃ foi substituído por C₆D₆.

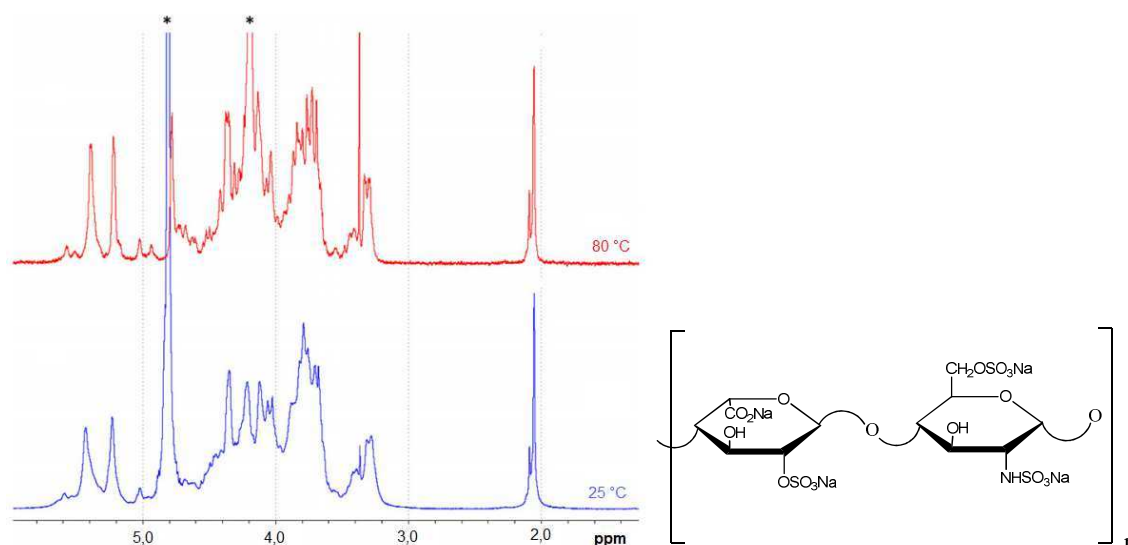
Apesar de a separação de sinais sobrepostos ser influenciada pelo tipo de solvente, nem sempre essa separação é alcançada usando apenas um solvente, sendo necessário a utilização de uma mistura de solventes diferentes.

- Efeitos da temperatura

O aumento da temperatura pode ser usado para promover o deslocamento de sinais de OH de álcoois, de NH de aminas e de amidas e de HOD de solventes, quando estes encontram-se sobrepostos a um sinal que será utilizado para quantificação de determinado composto, em um espectro de RMN de ^1H . Zheng e Price (2010), mostraram que é possível obter um deslocamento do sinal de HOD de aproximadamente 5 Hz/K, usando um espectrômetro de RMN de 500 MHz. Além disso, o aumento da temperatura altera as formas e largura das linhas espectrais, melhorando a resolução (Joseph e Szabo, 2013).

Uma aplicação prática da influência da temperatura no deslocamento de sinais pode ser observada nos espectros de RMN de ^1H 300 MHz da heparina não fracionada em D₂O (Figura 1.21). Quando o espectro foi adquirido a 25 °C, o

sinal HOD apareceu em aproximadamente 4,8 ppm. Ao aumentar a temperatura para 80 °C, esse sinal foi deslocado para 4,2 ppm (Holzgrabe, 2010).



* Sinal do HOD

Figura 1.21. Espectro de RMN de ^1H 300 MHz de heparina não fracionada em D_2O a 80°C (espectro em vermelho) e à temperatura de 25 °C (espectro em azul) (Holzgrabe, 2010 adaptada).

- Efeitos da concentração

A aquisição de espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de um determinado composto, em diferentes concentrações, pode causar variações nos deslocamentos químicos tanto de hidrogênios como de carbonos, devido ao fenômeno de agregação (Michaleas e Antoniadou-Vyza, 2006; Holzgrabe, 2010).

Esse fenômeno é observado na Figura 1.22, que mostra espectros parciais de RMN de ^1H de ciprofloxacina em diferentes concentrações. Em concentrações menos elevadas de ciprofloxacina ($2,6 \times 10^{-3} \text{ M}$), o hidrogênio aromático H-8 é mais desblindado que H-5. Entretanto, à medida que a concentração de ciprofloxacina aumenta ($259 \times 10^{-3} \text{ M}$), o sinal de H-5 torna-se mais desblindado que H-8 (Michaleas e Antoniadou-Vyza, 2006). Dessa forma, o fenômeno de agregação pode ser usado na separação de sinais sobrepostos para posterior quantificação (Holzgrabe, 2010).

Hidrogênios ligados a nitrogênio e a oxigênio, respectivamente em amidas e álcoois, têm deslocamento químico variável, dependente da concentração. Assim, quando esses sinais estão sobrepostos a outros sinais, a separação pode ser obtida pela aquisição de espectros de RMN em diferentes concentrações da amostra a ser analisada.

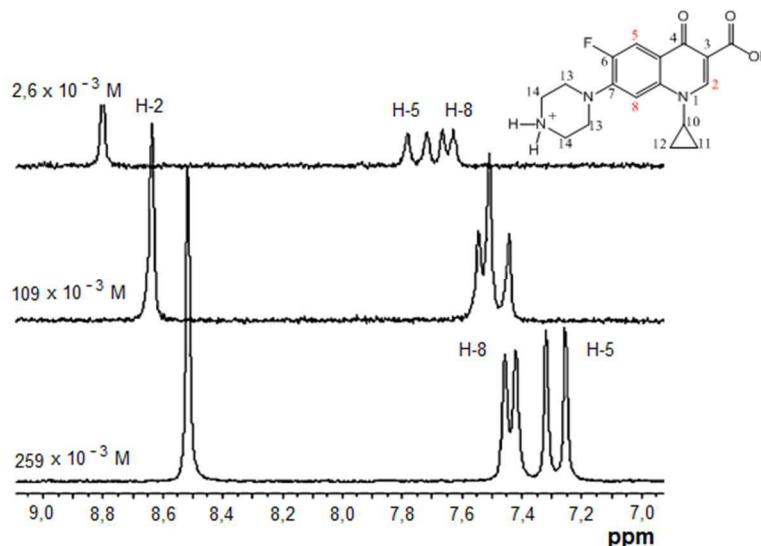


Figura 1.22. Espectros parciais de RMN de ^1H mostrando os sinais dos hidrogênios aromáticos da ciprofloxacina em diferentes concentrações ($2,6 \times 10^{-3}$ M; 109×10^{-3} M e 259×10^{-3} M) (Michaleas e Antoniadou-Vyza, 2006).

- Efeitos do pH

O pH pode ser usado para promover variação de deslocamentos químicos em sinais de compostos que contém grupos que podem ser protonados (aminas) e/ou desprotonados (ácidos), proporcionando a separação de sinais sobrepostos (Holzgrabe, 2010).

Esse efeito pode ser observado pela variação de deslocamento químico decorrente dos diferentes solventes utilizados para aquisição dos espectros de RMN de ^1H da norfloxacina (Figura 1.23) 2% em massa. Para isso, espectros de RMN de ^1H da norfloxacina, foram adquiridos usando os solventes DMSO- d_6 , DCI 0,01 e 5 M e NaOD 0,01 M. A consta na Tabela 1.1 (Holzgrabe, 2010).

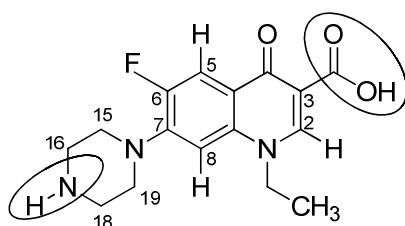


Figura 1.23. Estrutura da norfloxacin.

Tabela 1.1. Deslocamentos químicos (ppm) de hidrogênios da norfloxacin (2% em massa) adquiridos em DMSO-d₆ e em soluções aquosas ácidas e básicas (300 MHz).

Solvente	H-2	H-5	H-8	Piperazina
DMSO-	8,90	7,85	7,11	2,85-2,91
NaOD	8,37	7,78	6,92	3,19; 3,07
DCI 0,01	8,75	7,72	7,14	3,62; 3,52
DCI 5M	9,34	8,15	7,37	3,86; 3,58

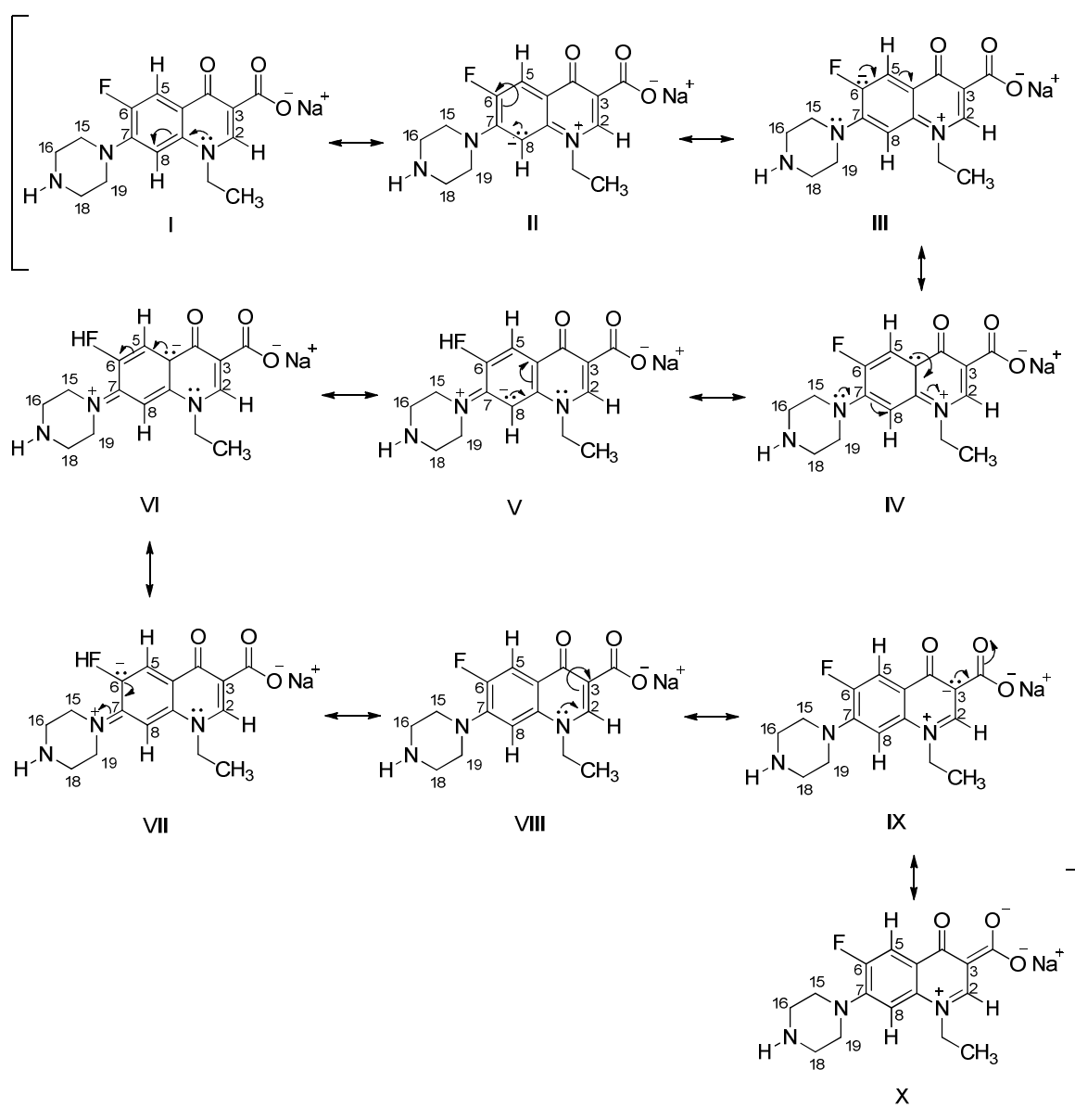
Comparando os deslocamentos químicos dos hidrogênios da norfloxacin obtidos em DMSO-d₆ com os obtidos em DCI 0,01 M (Tabela 1.1), observa-se uma maior variação nos valores de deslocamento químico referentes aos hidrogênios da piperazina. Isso se deve ao fato de que em solução DCI 0,01 M, o nitrogênio mais básico (17) está protonado, o que causa a desblindagem dos hidrogênios H-16, H-18, H-15 e H-19. Além disso, observa-se também que H-2 e H-5 foram levemente blindados e H-8, ligeiramente desblindado.

Fazendo uma comparação entre os espectros adquiridos em DCI 0,01 M e 5 M, foi observado que a diminuição do pH desblindou todos os hidrogênios avaliados. Entretanto, houve uma variação brusca nos deslocamentos de H-2, H-5 e dos hidrogênios da piperazina, que pode ser explicada pela protonação de todos os nitrogênios presentes na molécula que causa a desblindagem dos mesmos.

O emprego de solução de NaOD 0,01 M ocasionou a desprotonação do grupo carboxílico da norfloxacin, com isso na aquisição do espectro de RMN de ¹H verifica-se o efeito de blindagem em H-2, H-5 e H-8. Isso acontece porque em DMSO-d₆ ocorre formação de ligação de hidrogênio intramolecular entre o OH do ácido e a carbonila da cetona, desblindando H-2 e H-5. Em presença de NaOD,

não ocorre a ligação de hidrogênio intramolecular e, esses hidrogênios (H-2 e H-5) tornam-se menos desblindados (Holzgrabe, 2010).

O efeito de blindagem de H-8 empregando solução de NaOD 0,01 M ocorre devido à maior contribuição da estrutura de ressonância II, mostrada na Figura 1.24. Com a formação do íon carboxilato, ocorre uma menor contribuição da estrutura de ressonância X, referente à deslocalização da ligação π com a carbonila do carboxilato. O que ocasiona maior contribuição dos híbridos III e IV para a molécula de norfloxacina desprotonada.



Fonte: Próprio autor

Figura 1.24. Estruturas de ressonância da norfloxacina em meio básico.

Entretanto, além de proporcionar a variação de deslocamento químico, a mudança de pH altera o tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da amostra a ser analisada e isso deve ser levado em consideração para fins de quantificação (Bharti e Roy, 2012).

1.4. Métodos utilizados para quantificação por RMN

- Método relativo

Pelo método relativo é possível determinar a razão molar entre dois compostos x e y em uma mistura, usando a Equação 1.5 (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012; Joseph e Szabo, 2013).

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{I_x}{I_y} \cdot \frac{N_y}{N_x} \quad \text{Equação (1.5)}$$

Onde: n = quantidade de mol do composto;

I = valor da integral do sinal no espectro de RMN;

N = número de núcleos que contribuem para geração do sinal no espectro de RMN;

X e Y = compostos de interesse.

O método relativo permite também a determinação da fração molar de um composto x em uma mistura de m componentes (Equação 1.6), desde que a constante do espectrômetro (K_s) tenha o mesmo valor ao longo de todo o espectro de RMN, e portanto, possa ser cancelada como na Equação 1.5 (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012).

$$\frac{n_x}{\sum_{i=1}^m n_i} = \frac{I_x/N_x}{\sum_{i=1}^m I_i/N_i} \cdot 100\% \quad \text{Equação (1.6)}$$

Onde, $\sum_{i=1}^m n_i$ corresponde ao somatório da quantidade de mols de todos os compostos da mistura de m componentes e $\sum_{i=1}^m I_i/N_i$ se refere ao somatório da razão entre o valor da integral no espectro de RMN e o número de núcleos que correspondem a esses sinais de todos os m constituintes da mistura.

Para determinação da fração molar de um composto em uma mistura utilizando o método relativo, não é necessário conhecer a massa molecular dos constituintes da referida mistura. Entretanto, o sinal do solvente deuterado

utilizado tem que ser levado em consideração (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012).

O método relativo pode ser comparado ao procedimento de cromatografia líquida de alta eficiência que utiliza normalização de áreas, comumente citado em farmacopeias para determinação de misturas de medicamentos. Ele é ideal para determinar a proporção entre enantiômeros (após a adição de um reagente quiral) e entre diastereoisômeros (Holzgrabe, 2010).

- *Método absoluto*

Existem dois métodos absolutos que permitem a determinação do conteúdo ou da concentração de um analito utilizando a técnica de RMN. O método 100% e o método do componente principal.

O método 100% é aplicado quando todos os sinais de todos os componentes de uma mistura, inclusive das impurezas, podem ser atribuídos e determinados quantitativamente. O teor do analito de interesse é determinado pela diferença do valor de 100% (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012).

Esse método é bastante limitado, uma vez que a amostra pode conter impurezas que não possuam o núcleo observado no espectro de RMN utilizado para quantificação, como, por exemplo, NaCl e sílica gel no espectro de RMN de ^1H . Além disso, as impurezas presentes em níveis inferiores ao limite de detecção do espectrômetro de RMN também podem levar a resultados não satisfatórios (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012).

O método do componente principal é utilizado na maior parte das quantificações por RMN. Nele, a percentagem do analito de interesse é determinada, em uma mistura, em relação a um padrão (interno ou externo) de concentração e pureza conhecidas. A concentração do analito de interesse é obtida conforme Equação 1.7 (Holzgrabe, 2010; Parikh e Gadape, 2011; Bharti e Roy, 2012; Cerceau *et al.*, 2016a).

$$P_x = \frac{I_x}{I_P} \times \frac{N_P}{N_x} \times \frac{M_x}{M_P} \times \frac{m_P}{m} \times P_P \quad \text{Equação (1.7)}$$

Onde:

P_x = pureza do componente principal (analito de interesse);

P_P = pureza do padrão (fornecida pelo fabricante);
 I_x = Valor da integral do sinal do analito no espectro de RMN;
 I_p = Valor da integral do sinal do padrão no espectro de RMN;
 N_p = número de núcleos do padrão que geraram o sinal no espectro de RMN;
 N_x = número de núcleos do analito que geraram o sinal no espectro de RMN;
 M_x = massa molecular do analito;
 M_p = massa molecular do padrão;
 m_p = massa de padrão utilizada;
 m = massa do analito na amostra.

Por sua vez, é possível obter a massa do analito (m) na mistura a ser analisada utilizando-se a Equação 1.8, cujas variáveis já foram especificadas para a Equação 1.7 (Holzgrabe, 2010; Parikh e Gadape, 2011; Bharti e Roy, 2012; Cerceau *et al.*, 2016a).

$$m = \frac{I_x}{I_p} \times \frac{N_p}{N_x} \times \frac{M_x}{M_p} \times m_p \quad \text{Equação (1.8)}$$

Para que um composto seja utilizado como padrão interno, ele deve ser solúvel no solvente deuterado em questão e não deve haver interação química entre eles. Além disso, os sinais do padrão interno, no espectro de RMN, não podem se sobrepôr ao sinal do analito usado para quantificação (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012).

A quantificação utilizando padrão externo evita a contaminação da amostra e, geralmente, é realizada com auxílio de uma haste de inserção co-axial (Figura 1.25). Neste procedimento, a solução do padrão de referência é colocada na haste de inserção co-axial (A) que será imersa no tubo de RMN contendo a solução da amostra (B). O esquema montado pronto para análise é mostrado em (C) (Bharti e Roy, 2012).

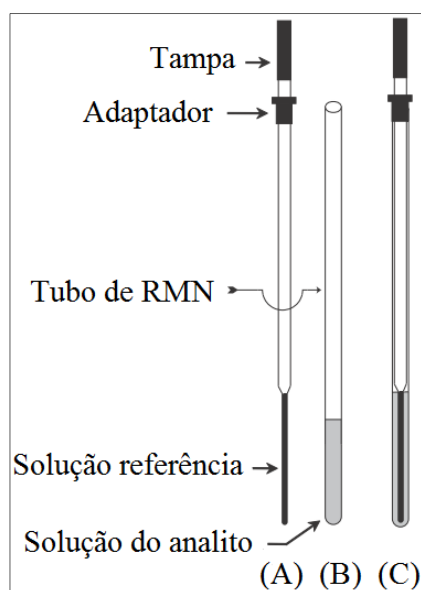


Figura 1. 25. Esquema de haste de inserção co-axial usada para quantificação de analitos em misturas utilizando a técnica de RMN com padronização externa (Bharti e Roy, 2012).

Na padronização externa, não é necessário que o padrão e a amostras sejam solúveis no mesmo solvente. Além disso, após ser lavado e seco, o tubo contendo a solução de referência pode ser imerso em outras amostras, facilitando a quantificação quando comparado ao uso do padrão interno. Entretanto, a concentração efetiva da solução do padrão externo tem que ser calculada antes de ser utilizada para quantificação do analito. Essa concentração efetiva pode ser determinada de acordo com a Equação 1.7 (Bharti e Roy, 2012).

1.5. Técnicas de RMNq 2D

A técnica de RMN de ^1H possibilita uma rápida e eficiente quantificação de analitos em diferentes tipos de misturas. Entretanto, no caso de misturas complexas como matrizes biológicas (Dufour *et al.*, 2015), óleos essenciais constituídos por um grande número de compostos (Cerceanu *et al.*, 2016a), dentre outras, a sobreposição de sinais pode ocorrer, resultando na obtenção de teores superestimados do analito.

Nesse contexto, técnicas de RMN 2D como HSQC ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Single Quantum Coherence), COSY ^1H - ^1H (homonuclear COrrrelation Spectroscopy), TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) e Homonuclear J -

resolvido vêm sendo utilizadas para quantificação de diversos analitos devido a capacidade que possuem de separar ressonâncias sobrepostas (Pauli *et al.*, 2012; Duforur *et al.* 2015).

Entretanto, a RMN 2D não possui as mesmas propriedades quantitativas que a RMN de ^1H . Além do longo tempo de experimento, o volume dos picos são influenciados por fatores como concentração do analito, excitação desigual, relaxamento não uniforme, transferências de magnetização irregulares, tempo de mistura, tempo de evolução e tempo de relaxação transversal (T_2). Além disso, acoplamentos entre hidrogênios ($J_{\text{H-H}}$) e entre hidrogênio e carbono ($J_{\text{C-H}}$) levam a ocorrência de distorção de fases. Para resolver essas limitações, novas sequências de pulsos vêm sendo desenvolvidas de forma a diminuir o tempo de experimento das técnicas de RMNq 2D. Além disso, a construção de curvas analíticas utilizando um padrão interno e o composto de interesse permite minimizar a influência dos parâmetros mencionados, obtendo-se excelentes resultados quantitativos em misturas complexas (Pauli *et al.*, 2012; Duforur *et al.* 2015).

1.6. Validação de métodos analíticos

A validação é uma forma de garantir por meio de critérios objetivos que o método utilizado forneça resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Assim, devem ser validados os métodos não normalizados (como RMNq); os desenvolvidos pelo próprio laboratório; os normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos; além das ampliações e modificações de métodos normalizados (INMETRO, 2011).

Os parâmetros de validação que serão apresentados a seguir constam na resolução RE nº 899 – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e na Orientação sobre validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-088), do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2011) (ANVISA, 2003; Maltz e Jancke, 2005; Santos e Conalço, 2010; INMETRO, 2011).

- Especificidade e seletividade: tanto a especificidade como a seletividade estão relacionadas à detecção. Um método é específico quando produz resposta para apenas um analito. O método seletivo é capaz de produzir respostas para

vários analitos, permitindo a distinção entre as resposta de cada um deles (ANVISA, 2003).

Na RMNq, a seletividade e a especificidade estão relacionadas com a pureza do sinal do analito utilizado para quantificação no espectro de RMN. Para verificar a especificidade e seletividade na RMNq, a não sobreposição do sinal do analito usado para quantificação deve ser avaliada em um espectro de RMN que contenha o solvente utilizado, o padrão interno, o analito de interesse e a amostra (Santos e Conalgo, 2010; Pauli *et al.*, 2012). Além disso, técnicas de RMN bidimensionais como o “homonuclear COrrrelation SpectroscopY” (COSY), “Diffusion-Ordered SpectroscopY” (DOSY) e “Heteronuclear Single Quantum Coherence” (HSQC) podem ser utilizadas para confirmar a presença/ausência da sobreposição de sinais uma vez que elas permitem a observação da correlação dos sinais de impurezas ocultos nos espectros unidimensionais (Bharti e Roy, 2012; Pauli *et al.*, 2012).

- Linearidade: é a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em uma amostra, em uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2011). Como a intensidade do sinal no espectro de RMN é diretamente proporcional ao número de núcleos que geram este sinal (com exceção de hidrogênios trocáveis), RMN é considerado um método linear (Santos e Conalgo, 2010).

- Faixa de trabalho: “corresponde a faixa de concentração/quantidade de analito na qual o método pode ser aplicado. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser utilizado e a concentração/quantidade mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro dentro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa de concentração/quantidade, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição” (INMETRO, 2011).

- Limite de detecção: corresponde ao menor valor de concentração/quantidade do analito que pode ser detectado pelo método. É de extrema importância quando o método é utilizado para quantificação de analitos em baixas concentrações ou a nível de traços (ANVISA, 2003).

- Limite de quantificação: trata-se da menor concentração/quantidade do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). Em RMN de ^1H o limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações/quantidades decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis e com uma razão sinal/ruído a partir de 150 em relação ao sinal de interesse no espectro de RMN de ^1H do analito (Malz e Jancke, 2005).

- Exatidão: corresponde à concordância entre os resultados determinados experimentalmente e o valor de referência aceito como verdadeiro (Ribani *et al.*, 2004; INMETRO, 2011). Em RMNq, a exatidão do método geralmente é calculada pela comparação entre o valor de pureza do analito determinada experimentalmente e a pureza fornecida pelo fabricante (Santos e Conalço, 2010; Parikh e Gadape, 2011; Pauli, 2012).

- Precisão: avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É comumente representada pela repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade, expressadas tanto na forma de desvio padrão como de coeficiente de variação, também chamado de desvio padrão relativo.

Para avaliação da repetitividade, são realizadas repetições em um curto intervalo de tempo utilizando o mesmo procedimento, analista, instrumento, condições e local de análise. A precisão intermediária permite verificar se existem variações de resultados fornecidos por um determinado método em um mesmo laboratório, devido a diferentes analistas, equipamentos, dias, ou pela combinação destes fatores. A reprodutibilidade avalia o grau de concordância entre os resultados obtidos na análise de uma mesma amostra, em diferentes laboratórios, seguindo um protocolo de procedimento analítico. Assim como na precisão intermediária, também há variação de equipamento, operador e dias (ANVISA, 2003).

- Robustez: mede a sensibilidade que um método apresenta face a pequenas variações. O método robusto é praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado (INMETRO, 2011). Na RMNq, a robustez pode ser avaliada tanto nos parâmetros de aquisição

como nos de processamento e na integração dos espectros (Santos e Conalço, 2010).

1.7. Vantagens e desvantagens da RMNq de ^1H na análise de óleos essenciais

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio apresenta inúmeras vantagens quando comparada às técnicas analíticas empregadas para análise de produtos naturais (Forshed *et al.*, 2005). Uma das características mais atrativas da RMNq de ^1H é o tempo de análise. A quantificação de constituintes de óleos essenciais por CG é muito demorada quando comparada à quantificação por RMN de ^1H (AbouZid, 2016). O principal requisito para que a RMNq de ^1H seja utilizada na determinação dos compostos de interesse é que a amostra seja solúvel em solvente deuterado adequado (Forshed *et al.*, 2005). O fato de ser uma técnica não destrutiva e de não ser necessário construção de curvas analíticas e do uso de padrões de elevada pureza e semelhantes ao analito, faz com que a RMN de ^1H seja mais vantajosa quando comparada à cromatografia e à outras técnicas espectroscópicas (Santos e Conalço, 2013; Huang *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Além disso, compostos instáveis à temperaturas elevadas que não podem ser determinados por CG são facilmente quantificados por RMN (Cavalli *et al.*, 2004; Pauli *et al.*, 2012). A RMN de ^1H permite análise qualitativa, quantitativa e possibilita a determinação simultânea de diferentes analitos, impurezas e solventes residuais em um mesmo espectro (Kosir e Kidric, 2001; Forshed *et al.*, 2005; Bekiroglu *et al.*, 2008; Pauli *et al.*, 2012; Santos e Conalço, 2013).

Entretanto, RMN de ^1H é uma técnica pouco sensível, o que pode ser contornado usando espectrômetros com maiores campos magnéticos e/ou equipados com criosonda (Holzgrabe, 2010). Além disso, a exatidão/precisão dos resultados obtidos por RMN de ^1H é influenciada pela homogeneidade do campo magnético, qualidade do shimming, fase, linha de base e integração (manual ou automática) dos espectros (Forshed *et al.*, 2005; Holzgrabe, 2010). Também, em misturas com muitos componentes pode ocorrer sobreposição do sinal usado para quantificar o analito de interesse com sinais de outros constituintes da amostra, levando a obtenção de resultados superestimados

(Forshed *et al.*, 2005; Dufour *et al.*, 2015). A separação de sinais sobrepostos poder ser obtida alterando a concentração (Michaleas e Antoniadou-Vyza, 2006; Holzgrabe, 2010) e o pH da amostra a ser analisada, além do solvente (Holzgrabe, 2010) e da temperatura (Holzgrabe, 2010, Zheng e Price, 2010) em que os espectros são adquiridos.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO EMPREGANDO RMN DE ¹H PARA QUANTIFICAÇÃO DE α -PINENO EM ÓLEOS ESSENCIAIS

RESUMO

Devido à importância dos óleos essenciais contendo α -pineno, um método rápido e eficiente para quantificação deste terpeno em óleos essenciais de eucalipto, de pimenta rosa e de terebintina usando RMN de ¹H foi desenvolvido e validado. Todos os parâmetros avaliados (seletividade, linearidade, exatidão/precisão, repetibilidade, robustez, estabilidade do analito e do padrão interno em solução) mostraram resultados satisfatórios conforme resoluções brasileiras vigentes (ANVISA - RE 899 e ABNT – NBR 14029). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos foram 0,1 e 2,5 mg, respectivamente. Além disso, os valores de desvios padrão encontrados no método de RMN de ¹H foram menores que 1% e inferiores aos obtidos pelas análises por cromatografia em fase gasosa. Análises de variância (ANOVA) e testes de Tukey e de Dunnett com 95% de confiança demonstraram que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelo método de RMN de ¹H e os obtidos pela técnica de CG-DIC usando padronização interna, externa e normalização. Valores de repetitividade e de reprodutibilidade (R&R) inferiores a 10% mostraram que todos os métodos (CG-N, CG-PI, CG-PE e RMN de ¹H) são apropriados e que o método de RMN de ¹H é o mais adequado para quantificação de α -pineno em amostras de óleos essenciais, uma vez que este método possui o menor valor de R&R (1,81).

2.1. Introdução

Óleos essenciais comerciais utilizados nas indústrias farmacêutica, de alimentos e de fragrâncias devem ser submetidos a um rigoroso controle de qualidade, uma vez que a sua composição química pode variar de acordo com a fonte, condições de armazenamento e adulteração (Bizzo *et al.*, 2009; Guerrini *et al.*, 2011). Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) tem sido uma técnica amplamente usada para controle de qualidade destes óleos essenciais. CG-EM permite a identificação dos constituintes de óleos essenciais que têm composições complexas. No entanto, as análises são demoradas e, normalmente, levam mais de uma hora (Bizzo *et al.*, 2009).

Ressonância magnética nuclear quantitativa (RMNq) vem sendo usada para controle de medicamentos (Salem e Mossa, 2012; Bussy *et al.*, 2013), alimentos (Berregi *et al.*, 2007; Bizzo *et al.*, 2009; Campo *et al.*, 2010; Ohtsuki *et al.* 2015), cerveja (Rodrigues *et al.*, 2010), azeite de oliva (Christophoridou e Dais, 2009) e gasolina (Meusinger, 1999), para quantificação de ácido micofenólico e citrinina produzidos por *Penicillium* sp (Valente *et al.*, 2014) e ácidos graxos de óleos comestíveis (Forshed *et al.*, 2005; Barison *et al.*, 2010). Além disso, RMN tem sido usado também para quantificar co-produtos de reações químicas e impurezas em diferentes tipos de amostras (Feula e Fossey, 2013; Huang *et al.*, 2014).

Entretanto, a quantificação de óleos essenciais, usando RMN, é pouco relatada na literatura. O uso de RMN de ^{13}C para quantificação de constituintes majoritários de óleos essenciais é significativamente mais comum que o uso de RMN de ^1H . Os únicos relatos encontrados na literatura sobre uso de RMN de ^1H para quantificar componentes majoritários de óleos essenciais foram das espécies *Brickellia weronicaefolia* (Rivero-Cruz *et al.*, 2006), *Inula racemosa* e *Saussurea lappa* (Choudhary *et al.*, 2016) e *Foeniculum vulgare* (AbouZid, 2016).

Ottavioli e colaboradores (2011) adicionaram dipropilenoglicol (DPG) a óleos essenciais para desenvolvimento e validação de um método usando a técnica de RMN de ^{13}C para subsequente determinação quantitativa de DPG em extratos de perfume. Além disso, RMN de ^{13}C foi associado a programas de computador para identificar e quantificar ácidos tipo eudesmano em óleo essencial de *Dittrichia viscosa* sp (Blanc *et al.*, 2005).

O conteúdo de ascaridol e de isoascaridol (Figura 2.1), constituintes de óleos essenciais comerciais de *Chenopodium ambrosioides* foram determinados por análise de RMN de ^{13}C . O uso desta técnica foi essencial já que o ascaridol se transforma em isoascaridol após isomerização térmica parcial e, portanto, a quantidade de ascaridol é subestimada por cromatografia gasosa (Cavalli *et al.*, 2004).

O sesquiterpeno furanodieno (Figura 2.1) e seus produtos de rearranjo foram quantificados usando RMN de ^{13}C primeiro em uma mistura artificial e, posteriormente, em óleo essencial de *Smyrniolum olusatrum* (Baldovini *et al.*, 2001). Por sua vez, a identificação e quantificação dos constituintes de uma mistura de limoneno, linalool e α -pineno (Figura 2.1) usando RMN de ^{13}C foram realizadas eficientemente (erros relativos inferiores a 5%) por Formacek e Kubeczka, 2002.

Cromatografia gasosa com detector por ionização em chamas (CG-DIC) e espectroscopia de RMN de ^{13}C foram usadas para desenvolver um protocolo para identificar e quantificar germacreno A, B, C (Figura 2.1) e seus elementos correspondentes em óleos essenciais de *Cleistopholis patens* (Ouattara *et al.*, 2013). De acordo com os resultados obtidos, foi provado que RMN de ^{13}C é mais eficiente para quantificar germacreno e outros subprodutos. Durante análises de CG-DIC e de CG-EM, os germacrenos A, B e C sofreram isomerização a β , γ e δ -elemeno, produzindo resultados não confiáveis.

Espectroscopia de RMN é uma técnica promissora para controle de qualidade de óleos essenciais já que os produtos comerciais são avaliados em grandes quantidades. Normalmente seus preços são associados às percentagens de um ou mais componentes majoritários sempre presentes em elevadas concentrações. Assim, mesmo a técnica de RMN sendo menos sensível do que GC-EM, isso não seria um problema. Por exemplo, os óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) para fins de fitoterapia devem conter, pelo menos, 60% de citral (Barbosa *et al.*, 2008). Já óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus*) para fins medicinais deve conter pelo menos 70% de cineol (Figura 2.1) (Bizzo *et al.*, 2009).

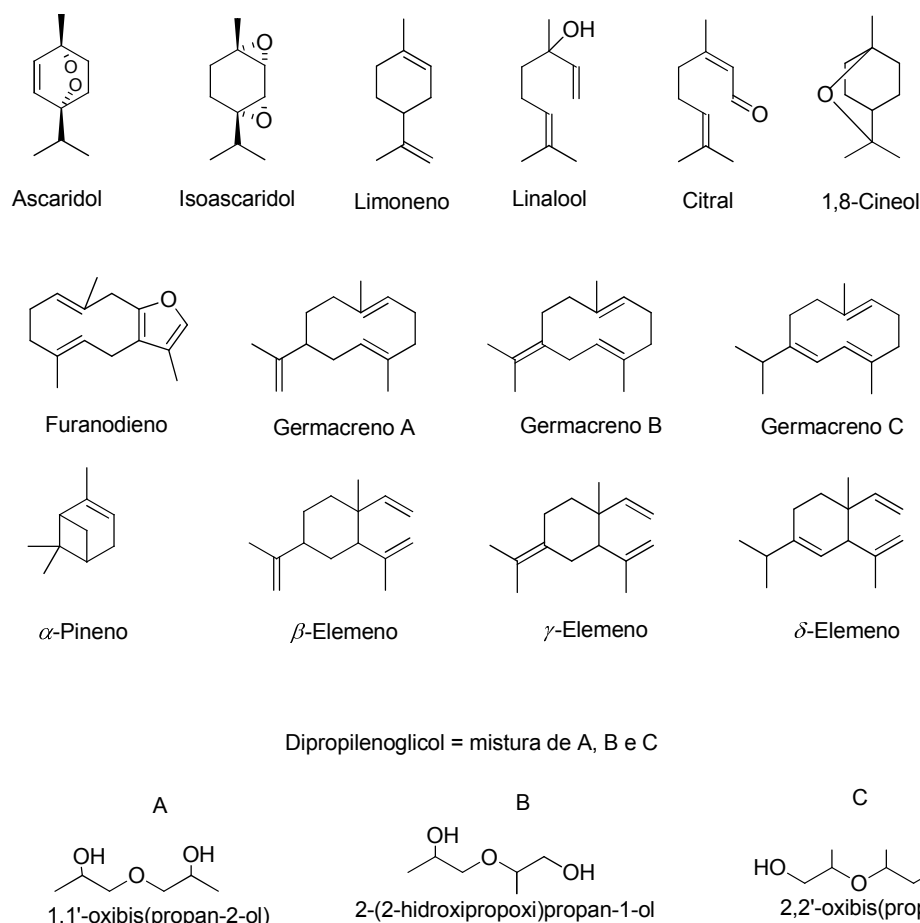


Figura 2.1. Estrutura química de alguns terpenos presentes em óleos essenciais e isômeros do dipropilenoglicol.

A principal vantagem da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para análise quantitativa (RMNq) quando comparada às demais técnicas analíticas é o fato de ela ser uma técnica simples e rápida. Além disso, para a maioria das aplicações, solubilidade em solvente deuterado é a única exigência para a amostra ser analisada (Forshed *et al.*, 2005). Além do mais, RMNq é um método que não necessita da construção de curvas analíticas e do uso de padrões internos idênticos aos analitos, tornando-a mais vantajosa quando comparada à cromatografia e a outras técnicas espectroscópicas (Santos e Colnago, 2013).

Alguns métodos de RMNq têm sido usados nos casos em que a cromatografia gasosa revelou ser ineficaz (Pauli *et al.*, 2012). Isso pode ocorrer quando o componente a ser quantificado é instável à temperaturas elevadas (Cavalli *et al.*, 2004). Além disso, RMNq é uma técnica não destrutiva, seletiva,

capaz de detectar simultaneamente diferentes componentes em uma mistura (desde que haja seletividade suficiente, ou seja, não ocorra sobreposição dos sinais de interesse com sinais de outros constituintes da amostra) e permite análises qualitativa e quantitativa simultâneas (Kosir e Kidric, 2001; Forshed *et al.*, 2005; Maltz e Jancke, 2005; Bekiroglu *et al.*, 2008; Pauli *et al.*, 2012; Santos e Colnago, 2013).

Entretanto, fatores tais como a qualidade do “*shimming*”, a uniformidade do campo magnético, correção de fase e integração manual das áreas obtidas no espectro influenciam a exatidão/precisão de RMNq (Forshed *et al.*, 2005).

α -Pineno (Figura 2.1) é um componente encontrado em vários óleos comerciais, sendo produzido por plantas de diferentes espécies em pequenas ou grandes quantidades (Silva *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010; Demuner *et al.*, 2011). Ele também é encontrado nas resinas de numerosas plantas, tais como bagas de zimbro (*Juniperus communis*) e eucaliptos (*Eucalyptus*), mas é predominante em pinheiros coníferos (*Pinus*) (Aydin *et al.*, 2013). Óleos essenciais contendo este componente possuem atividades bactericida, fungicida, inseticida, pesticida, anticarcinogênica, antioxidante, imunoestimulante, anti-inflamatória, anticonvulsiva, sedativa, antiestresse e hipoglicêmica (Mercier, 2009).

Apesar das várias propriedades medicinais relatadas do α -pineno, poucos métodos para quantificação deste composto têm sido desenvolvidos.

Uma vez que os preços dos óleos essenciais de eucalipto no mercado internacional variam de acordo com seu conteúdo de α -pineno e, outros importantes óleos essenciais também são ricos neste componente, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método rápido e eficiente para análise de rotina para um grande número de amostras de óleos essenciais ricos em α -pineno usando RMN de ^1H .

2.2. Experimental

2.2.1. Materiais e reagentes

Octametilciclotetrasiloxano (98%), α -pineno (98%) e octadecano padrão analítico (98,5%) foram comprados da Sigma Aldrich (Wisconsin, EUA). Clorofórmio deuterado foi adquirido da Tedia Brasil e diclorometano da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

Amostras de óleo essencial de *Eucalyptus* e *Corymbia* das espécies *E. saligna* (ES), híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* (U x G), *E. tereticornis* (ET), *E. phoenicea* (EPE), *E. punctata* (EPN), *C. torelliana* (CTL), *C. maculate* (CMC), estavam disponíveis no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. Amostra de derivado da terebintina (SOC) foi fornecida pela empresa Socer Brasil indústria e Comércio Ltda e óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*) (PR) foi fornecido pelo Departamento de Química e Física da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil.

Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica Shimadzu (capacidade de 82 / 220 g e precisão de 0,1 mg / 0,01 mg). As transferências de volume foram feitas usando seringas cromatográficas de 500 μ L e 5,00 mL. Frascos com tampas de 10,0 mL e tubos de RMN com diâmetro externo de 5 mm foram utilizados em todos os experimentos.

2.2.2. Método de RMN

Soluções

Soluções estoque de α -pineno (98,0 mg mL⁻¹) em CDCl₃ e de octametilciclotetrasiloxano (OMCTS) em CDCl₃ (2,2 mg mL⁻¹) foram preparadas para determinar linearidade, estabilidade e robustez do método de RMN de ¹H. Para estudo da repetibilidade (exatidão/precisão), foram preparadas soluções estoque de α -pineno em CDCl₃ (100,1 mg mL⁻¹) e de OMCTS em CDCl₃ (2,3 mg mL⁻¹). Soluções estoque de α -pineno em CDCl₃ (100,4 mg mL⁻¹) e de OMCTS em CDCl₃ (2,9 mg mL⁻¹) foram preparadas para determinar os limites de detecção e de quantificação. Para quantificação, foram preparadas soluções estoque do padrão interno OMCTS em CDCl₃ (concentrações variando de 2,1 a 2,3 mg mL⁻¹). Para preparar todas as soluções, os óleos e reagentes foram pesados diretamente nos frascos que foram tampados com um septo de teflon. Clorofórmio deuterado foi adicionado aos frascos usando seringa cromatográfica.

Instrumentação

Todas as análises foram realizadas em um espectrômetro Varian Mercury 300 MHz, equipado com uma sonda de dois canais (¹H-¹³C) de banda larga de 5 mm e unidade de controle de temperatura.

Condições experimentais

Para determinação da largura do pulso de 45° (pw 45) e do tempo de relaxação longitudinal (T_1), a temperatura da amostra de 25 °C foi obtida 5 min após a inserção no espectrômetro. O *shimming* foi realizado no modo automático para todos os experimentos até que largura, à meia altura do pico do clorofórmio, fosse sempre inferior a 0,7 Hz. A largura do pulso de 45° (pw 45) foi determinada para todas as amostras variando pw de 10 a 38 μ s, com intervalo de 1 μ s a uma potência de atenuação (tpwr) de 57dB. O tempo de relaxação longitudinal (T_1) foi determinado pelo experimento de inversão-recuperação para todos os átomos de hidrogênio do α -pineno e do padrão OMCTS. O mais longo T_1 obtido para validação foi de 7 s e para medição dos óleos essenciais foi de 8 s. Os experimentos foram realizados utilizando a temperatura da sonda de 25 °C, número de transientes (nt) de 16, número de pontos no FID (np) de 32768, largura do pulso (pw) de 45°, sem rotação de amostra, largura espectral (sw) de 4800,8 Hz, tempo de aquisição (aq) de 4,555 s, tempo de atraso (D1) de 5 vezes T_1 entre os pulsos foi usado para garantir a relaxação completa dos átomos de hidrogênio (Caligiani *et al.*, 2007; Parikh e Gadape, 2011; Santos e Colnago, 2013), conforme estabelecido por Malz e Jancke $D1 \geq 7/3 \times T_1$ mais longo (Maltz e Jancke, 2005).

Para avaliar a robustez do método, espectros de RMN de ^1H foram adquiridos sem controle de temperatura usando nt de 16, e à temperatura de 25 °C usando nt de 8. Estes espectros foram processados usando o programa MestReNova 6.0.2 com correção automática de linha base empregando a função polinomial Bernstein e ampliação da linha (lb) de 0,3 Hz. As correções de fase e a integração dos espectros foram realizadas manualmente. O FID foi processado usando 64 K e preenchimento com zeros (Forshed *et al.*, 2005; Parikh e Gadape, 2011).

Validação do método de RMN de ^1H

Para validação do método os seguintes parâmetros foram avaliados: especificidade e seletividade; linearidade; robustez; repetibilidade; exatidão/precisão; estabilidade do analito e do padrão interno em solução; limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) (INMETRO, 2011; Parikh e Gadape, 2011; Bharti e Roy, 2012). A especificidade e a seletividade do método

proposto foram avaliadas pela ausência de sobreposição de pelo menos um sinal de α -pineno com sinais de outros constituintes dos óleos essenciais, do solvente CDCl_3 e do padrão interno OMCTS, no espectro de RMN de ^1H . A linearidade foi verificada pela adição a 7 tubos de RMN de quantidades de α -pineno na faixa de 5,0 a 35,0 mg. Os volumes da solução de α -pineno ($98,4 \text{ mg mL}^{-1}$) adicionados aos tubos foram de 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 μL os quais corresponderam às massas de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 mg de α -pineno, respectivamente. A cada um desses tubos foram adicionados 310 μL (0,71 mg) da solução estoque de OMCTS a uma concentração de $2,2 \text{ mg mL}^{-1}$ e clorofórmio deuterado a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ para completar o volume para 730 μL . Todas as transferências de volumes foram feitas usando seringas cromatográficas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Todos os sinais obtidos no espectro de RMN de ^1H do α -pineno foram usados para realizar análise de regressão linear no MS Excel 2013. Curvas de linearidade foram obtidas plotando a quantidade de α -pineno (mg) contida em cada tubo de RMN vs. a quantidade de α -pineno calculada, obtida pela Equação (2.1), (cujas áreas foram obtidas do espectro de RMN de ^1H) (Parikh e Gadape, 2011). Como α -pineno tem um total de nove sinais de hidrogênios distintos no espectro de RMN de ^1H , um total de nove curvas foram obtidas.

$$m_{\text{Pin}} = \frac{I_{\text{Pin}}}{I_{\text{OMCTS}}} \times \frac{N_{\text{OMCTS}}}{N_{\text{Pin}}} \times \frac{M_{\text{Pin}}}{M_{\text{OMCTS}}} \times m_{\text{OMCTS}} \quad \text{Equação (2.1)}$$

Onde, m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = massa molecular de α -pineno; M_{OMCTS} = massa molecular do octametilciclotetrasiloxano (OMCTS); m_{OMCTS} = massa de OMCTS; I_{Pin} = área da integral do sinal de α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; I_{OMCTS} = 1000; N_{OMCTS} = número de átomos de hidrogênio presentes no OMCTS; N_{Pin} = número de átomos de hidrogênio do sinal do α -pineno escolhido para quantificação.

A robustez do método foi avaliada pelos espectros de RMN de ^1H adquiridos usando número de transientes de 16 e de 8 e temperatura controlada a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e, número de transientes de 16 sem controle de temperatura (a temperatura variou de $19,1$ a $19,4 \text{ }^\circ\text{C}$). A determinação da robustez do método foi realizada usando os tubos de RMN contendo aproximadamente 5,0; 20 e 35 mg de α -

pineno preparados conforme descrito na determinação da linearidade. Todos os sinais obtidos no espectro de RMN de ^1H do α -pineno foram integrados e os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), obtidos pela Equação (2.2) (Parikh e Gadape, 2011).

$$DPR = CV = \frac{DP}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Equação (2.2)}$$

Onde, DPR = desvio padrão relativo entre as massas observadas nas triplicatas; DP = desvio padrão entre as massas observadas nas triplicatas; CV = coeficiente de variação, \bar{X} = média dos valores observados nas massas das triplicatas.

Os resultados obtidos nos espectros de RMN adquiridos com número de transientes (nt) de 16 e de 8 com controle de temperatura e com número de transientes de 16 sem controle de temperatura foram comparados e a diferença entre eles foi expressa em percentagem (%D) de acordo com a Equação (2.3) (Aydin *et al.*, 2013).

$$\%D = \frac{m_{xi} - m_{xt}}{m_{xi}} \times 100 \quad \text{Equação (2.3)}$$

Onde, %D = diferença em percentagem entre a massa determinada no espectro de RMN adquirido usando nt = 16 e a massa determinada no espectro adquirido usando nt = 8, ambos com temperatura controlada a 25 °C; m_{xi} = massa observada no espectro de RMN adquirido usando nt = 16 e temperatura de 25 °C; m_{xt} = massa observada no espectro de RMN adquirido usando nt = 8 e temperatura de 25 °C.

A repetibilidade do método foi checada 15 dias após a determinação da linearidade pela realização de um experimento similar, pelo mesmo analista, usando o mesmo laboratório e equipamento. Todos os sinais 5,17–5,23; 2,35; 2,21; 2,04–2,12; 1,94; 1,67; 1,28; 1,17; e 0,85 ppm observados no espectro de RMN de ^1H de α -pineno (Figura 2.4) foram integrados para avaliação da repetibilidade do método e os resultados expressos como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV).

A exatidão foi avaliada no mesmo experimento que a repetibilidade. O método analítico proposto para análise de um composto de pureza conhecida (α -

pineno) foi aplicado. A pureza observada experimentalmente (PO) e a exatidão foram calculadas usando as Equações (2.4) e (2.5), respectivamente (Maltz e Jancke, 2005; Parikh e Gadape, 2011; Santos e Colnago, 2013).

$$P_{Pin} = \frac{I_{Pin}}{I_{OMCTS}} \times \frac{N_{OMCTS}}{N_{Pin}} \times \frac{M_{Pin}}{M_{OMCTS}} \times \frac{m_{OMCTS}}{m} \times P_{OMCTS} \quad \text{Equação (2.4)}$$

Onde, M_{OMCTS} = massa molecular do octametilciclotetrasiloxano ($296,62 \text{ g mol}^{-1}$); m_{OMCTS} = massa de octametilciclotetrasiloxano (em g); I_{Pin} = Integral do sinal de interesse do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; I_{OMCTS} = 1000; N_{OMCTS} = 24 (número de átomos de hidrogênio presentes no octametilciclotetrasiloxano); N_{Pin} = número de átomos de hidrogênio do sinal de α -pineno; m = massa do α -pineno (em g); P_{OMCTS} = pureza do octametilciclotetrasiloxano (98%); P_{Pin} = pureza do α -pineno calculada (em %m/m).

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{PO}{PE} \times 100 \quad \text{Equação (2.5)}$$

Onde, PO = pureza observada; PE = pureza esperada (informada pelo fabricante).

A estabilidade do analito e do padrão interno em solução foi avaliada usando os tubos de RMN contendo 20 mg de α -pineno (conforme descrito na determinação da linearidade). As análises foram realizadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ com intervalos de tempo de 0 (inicial), 6, 12, 18 e 24 h. Todos os sinais observados no espectros de RMN de ^1H do α -pineno foram integrados para determinação da quantidade de α -pineno em cada intervalo de tempo avaliado, de acordo com a Equação (2.1) e os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV).

Para determinar os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), volumes apropriados de solução de α -pineno ($100,4 \text{ mg mL}^{-1}$) correspondendo a 0,10; 0,50; 1,00; 2,50 e 5,00 mg de α -pineno foram adicionados aos tubos de RMN. A cada um destes tubos foram adicionados $310 \text{ } \mu\text{L}$ ($0,71 \text{ mg}$) da solução estoque de OMCTS a uma concentração de $2,3 \text{ mg mL}^{-1}$ e clorofórmio deuterado a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ para completar o volume para $730 \text{ } \mu\text{L}$. Obtidos os espectros de RMN de

^1H dos compostos adicionados aos tubos de RMN, o sinal em 5,17-5,23 ppm do α -pineno foi integrado em relação ao sinal do padrão interno (0,10 ppm) e a quantidade de α -pineno contida em cada tubo foi determinada conforme Equação 2.1. Para determinação do LQ foi utilizada a razão sinal ruído ≥ 150 , de forma a garantir que os resultados sejam obtidos com uma incerteza de 1% (Malz e Jancke, 2005). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Quantificação de α -pineno em óleo essencial usando RMN de ^1H

Algumas amostras de óleos essenciais foram quantificadas em triplicata e outras em quadruplicata. Nas amostras quantificadas em quadruplicata, foram utilizadas soluções de OMCTS de diferentes concentrações em cada duplicata. Esse procedimento foi realizado de forma a garantir a exatidão da concentração da solução de OMCTS, já que qualquer variação na concentração desta levaria a quantificações errôneas. Nos dois casos, uma quantidade (22,0 a 46,0 mg) de óleo essencial foi pesada diretamente dentro dos tubos de RMN. A esses tubos foram adicionados 310 μL (0,65 a 0,72 mg) de solução estoque de OMCTS (concentrações variando de 2,1 a 2,3 mg mL^{-1}) e os volumes foram completados para 730 μL pela adição de CDCl_3 a 20 $^\circ\text{C}$. Espectros de RMN de ^1H foram obtidos e o sinal do OMCTS (0,10 ppm) foi integrado e arbitrariamente atribuído o valor de 1000 usando o programa MestReNova. O sinal em 5,17–5,23 ppm foi integrado nos espectros de todas as amostras e os valores das integrações foram usados para calcular a quantidade de α -pineno, conforme Equação (2.1).

2.2.3. Métodos cromatográficos

Soluções

Uma solução de α -pineno em diclorometano (aproximadamente 10,0 mg mL^{-1}) foi preparada para execução dos experimentos de cromatografia gasosa utilizando padronização externa (CG-PE) e interna (CG-PI). Uma solução de octadecano (20,1 mg mL^{-1}) foi preparada para realização dos experimentos de cromatografia gasosa usando padronização interna.

Instrumentação

CG-EM

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás (Shimadzu, modelo 17A) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (RTX-5MS-Restek; 30 m x 0,25 mm d.i; espessura do filme de 0,25 μm) conectado a um detector por espectrometria de massas (Shimadzu, modelo QP5050A).

CG-DIC

A quantificação das amostras usando CG-PE, CG-PI e normalização foi realizada por cromatografia gasosa utilizando o cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo 17A, conectado ao detector por ionização em chamas (CG-DIC) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (SBP5-Supelco, 30 m x 0,25 mm d.i, espessura do filme de 0,25 μm).

Condições experimentais

CG-EM

A temperatura do forno foi programada para variar de 40 °C (2 min) a 200 °C a uma taxa de 3 °C min^{-1} . O injetor e o detector foram mantidos a 200 e 240 °C, respectivamente. O gás de arraste foi o nitrogênio a uma taxa de fluxo de 1,8 mL min^{-1} . A quantidade de 1,0 μL (solução do óleo essencial 1% m/v em diclorometano) foi injetada na razão de *Split* de 1:5.

Compostos foram identificados pela comparação de seus espectros de massas com os espectros da base de dados do equipamento CG-EM (Willey 7 ed.; Nist 5 ed., Nist 8 ed. e Nist 11 ed.) e também comparando o índice aritmético calculado da injeção da mistura de alcanos lineares (C9 a C40) com os dados descritos na literatura (Martins *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2008; Adams, 2012).

CG-DIC

A temperatura da coluna foi programada para variar de 40 °C (4 min) a 200 °C a uma taxa de 3 °C min^{-1} . O injetor e o detector foram mantidos a 200 °C e 240 °C, respectivamente. O gás de arraste foi o nitrogênio a uma taxa de fluxo de 1,8

mL min⁻¹. A quantidade de 1,0 µL (solução do óleo essencial 1% m/v em diclorometano) foi injetada na razão de *split* de 1:10.

Quantificação dos óleos essenciais usando CG-DIC

A quantificação das amostras de óleo essencial usando cromatografia gasosa foi realizada utilizando os métodos de padronização interna (CG-PI), padronização externa (CG-PE) e normalização (CG-N) (Ribani *et al.*, 2004).

Normalização (CG-N)

Aproximadamente 10 mg de cada um dos nove óleos essenciais avaliados foram pesadas em vials aos quais foi adicionado 1,00 mL de diclorometano. As análises foram realizadas em triplicata sobre condições previamente descritas. O conteúdo de α -pineno nas amostras foi calculado pela percentagem da área do pico correspondente ao α -pineno em relação a área total dos picos do cromatograma.

Padronização interna (CG-PI)

Uma curva analítica foi construída com concentração de α -pineno variando de 0,050 a 1,20 mg mL⁻¹ (n = 8 pontos), preparadas a partir da solução estoque de α -pineno (10,2 mg mL⁻¹). A cada solução de α -pineno foram adicionados 500 µL da solução estoque de octadecano (20,3 mg mL⁻¹) e o volume completado para 10,0 mL com diclorometano. A equação da curva analítica ($y = 0,0013X + 0,00283$; $r = 0,9987$) foi obtida pela razão entre a área do pico correspondente ao analito pela área do pico referente ao padrão interno vs. concentração analito (em mg L⁻¹). Aos balões volumétricos de 10,0 mL, foram adicionadas massas de óleo essencial contendo α -pineno variando de 5 a 30 mg (considerando o meio da curva analítica), 500 µL da solução estoque de octadecano a 20,3 mg mL⁻¹ e o volume final foi completado para 10,0 mL usando o mesmo solvente. As amostras foram analisadas em triplicatas em condições previamente descritas.

Padronização externa (CG-PE)

Uma curva analítica foi construída utilizando concentrações de α -pineno variando de 0,050 a 1,20 mg mL⁻¹ (n = 8 pontos) preparadas a partir de uma

solução de 10,2 mg mL⁻¹ de α -pineno em diclorometano. A equação da curva analítica ($Y = 255,74 X + 33,222$; $r = 0,9988$) foi obtida da área vs. concentração do analito (em mg L⁻¹). As soluções foram preparadas conforme descrito para o procedimento de padronização interna, porém sem adição de octadecano. As amostras foram analisadas em triplicata de acordo com as condições previamente descritas.

2.3. Comparação entre os métodos de quantificação

A comparação entre os métodos foi realizada por análise de variância (ANOVA) e pelos testes de Tukey (compara as médias dos quatro métodos entre si) e de Dunnett (compara a média dos três métodos cromatográficos contra a média do método de RMN de ¹H), com 95% de confiança, usando o programa Minitab 16 (Oliveira, 2008).

2.4. Resultados e discussão

A quantificação de óleos essenciais pela técnica de CG-DIC empregando a normalização da área total de um cromatograma não é muito exata devido ao fato de que cada componente do óleo essencial tem um fator de resposta diferente no detector (Visentainer, 2012).

O método de RMN descrito neste trabalho foi comparado ao método de CG usando normalização de áreas. Apesar de sua limitação, o método de CG-N ainda é o mais usado rotineiramente para esse tipo de análises (Barbosa *et al.*, 2008).

Padronização interna e externa também foram empregadas no método de CG-DIC para comparação com os dados obtidos por RMN.

Para avaliar a eficiência do método foram selecionadas amostras de óleo essencial de diferentes complexidades e teores α -pineno. Assim, os óleos essenciais foram extraídos de *Eucalyptus* (híbrido *E. urophylla* x *E. grandis*; *E. tereticornis*; *E. saligna*; *E. punctata*; *E. phoenicea*), *Corymbia* (*C. torelliana*; *C. maculata*), pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*) e derivados da terebintina. CG-DIC usando normalização foi utilizado para uma análise preliminar destes óleos e os resultados destas análises indicaram que o conteúdo de α -pineno variou de 11 a 95% (Figuras 2.2 e 2.3). A composição química detalhada e as estruturas dos constituintes das amostras dos óleos essenciais são relatadas nas Tabelas S1.49-

S1.50 e na Figura S1.1, dos Dados Suplementares 1. Como pode ser observado a partir desses dados, estas amostras em geral têm uma grande quantidade de outros constituintes.

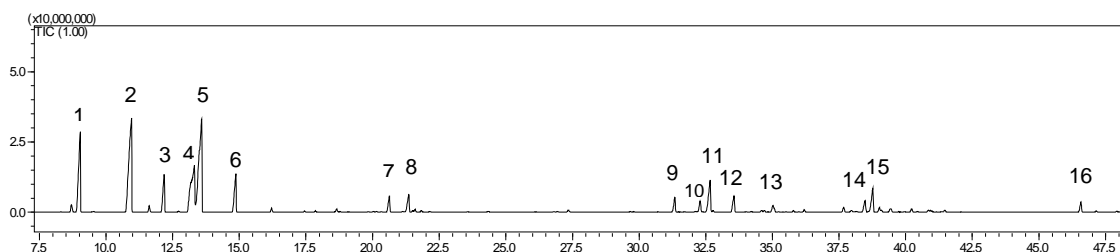


Figura 2.2. Cromatograma do óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* (ET): **1:** α -pineno (11,40%); **2:** β -pineno (20,41%); **3:** α -felandreno (4,30%); **4:** *p*-cimeno (14,76%); **5:** 1,8-cineol (17,34%); **6:** γ -terpineno (4,88%); **7:** terpinen-4-ol (1,53%); **8:** α -terpineol (2,19%); **9:** α -gurjuneno (1,61%); **10:** β -gurjuneno (1,33%); **11:** aromadendreno (4,13%); **12:** *allo*-aromadendreno (1,77%); **13:** viridifloreno (0,95%); **14:** espatulenol (1,16%); **15:** globulol (2,32%) e **16:** α -felandreno (1,41%).

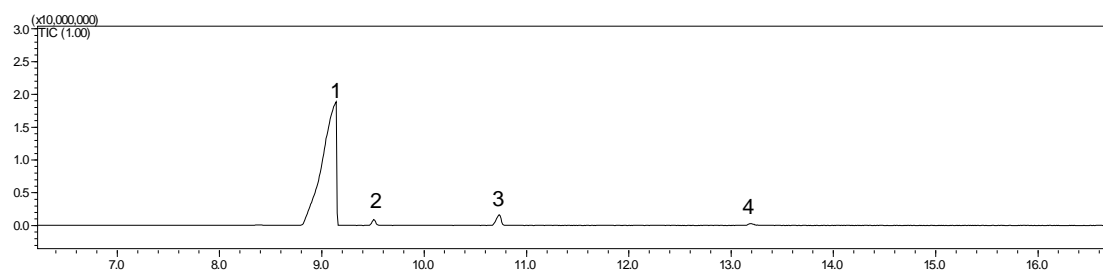


Figura 2.3. Cromatograma do óleo essencial comercial obtido da terebintina (SOC): **1:** α -pineno (93,59%); **2:** canfeno (1,58%); **3:** β -pineno (3,33%); **4:** β -felandreno (0,67%).

A validação do método de RMN de ^1H para quantificação de óleos essenciais foi realizada conforme as recomendações do guia "Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos DOQ-CGCRE-008", publicado pelo INMETRO, conforme exigido pela legislação brasileira.

Uma vez que esta resolução não estabelece limites para avaliar os parâmetros de validação, a Resolução RE 899-Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, aprovada pelo Conselho Adjunto da ANVISA também foi seguida.

Inicialmente foi obtido o RMN de ^1H do α -pineno (98%) (Figura 2.4), no qual foram observados nove sinais. Conforme esperado, o sinal devido ao hidrogênio vinílico foi observado em 5,23-5,17 (H-3, multipletto). Os sinais referentes aos hidrogênios ligados ao carbono 7 aparecem em 2,35 (H-7eq, duplo triplete) e em 1,17 ppm (H-7ax, duplete). Já os sinais referentes aos hidrogênios H-4eq e H-4ax e H-5 foram observados como multipletos em 2,21 e 2,12-2,14 ppm, respectivamente. Além disso, H-1 aparece como triplete duplo e H-10 como quarteto. Também foram observados os simpletos em 1,28 (H-8) e 0,85 ppm (H-9) referentes aos hidrogênios das metilas ligados aos carbonos 8 e 9, respectivamente.

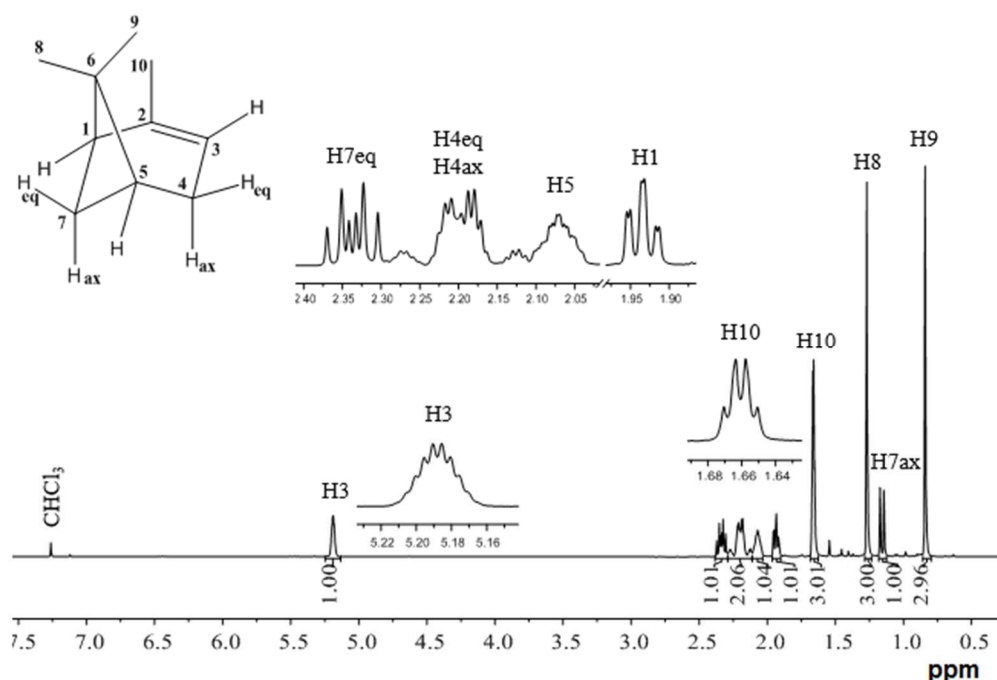


Figura 2.4. Espectro de RMN de ^1H do α -pineno 98% (300 MHz, em CDCl_3).

A especificidade e seletividade do método de RMN de ^1H foram comprovadas pela ausência de sobreposição de pelo menos um dos nove sinais do α -pineno com os sinais de CDCl_3 e OMCTS.

A razão de 1:1:2:1:1:3:3:1:3, determinada pela integral, para a área dos sinais em 5,23-5,17; 2,35; 2,21; 2,12-2,04; 1,94; 1,67; 1,28; 1,17; e 0,85 ppm do α -pineno no espectro de RMN de ^1H dos óleos essenciais avaliados, indica a não sobreposição destes sinais com sinais de outros constituintes presentes nos óleos essenciais. A seletividade do sinal em 5,17-5,23 ppm do α -pineno foi confirmada

pela obtenção de uma área sempre de menor intensidade para este sinal em relação às áreas dos demais sinais do α -pineno no espectro de RMN de ^1H dos óleos essenciais avaliados.

Dessa forma, o sinal em 5,17-5,23 ppm no espectro de RMN de ^1H foi escolhido para quantificação de α -pineno, em todas os óleos analisados, uma vez que ele não se sobrepõem a outros sinais. Para o óleo de pimenta rosa, embora o sinal em 5,17-5,23 ppm estivesse perto de sinais de outros compostos presentes na amostra de óleo essencial, a quantificação foi alcançada com sucesso (ver Tabela S1.48, dados suplementares 1).

Como a relaxação dos átomos de hidrogênio é muito rápida e homogênea, o RMN de ^1H é adequado como método quantitativo porque a área do pico corresponde à quantidade de hidrogênio que contribui para o sinal.

A linearidade do método foi avaliada para todos os sinais do α -pineno (5,17–5,23; 2,35; 2,21; 2,04–2,12; 1,94; 1,67; 1,28; 1,17 e 0,85 ppm) obtidos no espectro de RMN de ^1H do α -pineno, em diferentes quantidades, contendo OMCTS (Figura 2.5). Após os espectros de RMN de ^1H serem processados, o sinal referente ao padrão interno OMCTS foi integrado e atribuído o valor de 1000. A seguir, os sinais do α -pineno foram integrados em relação ao sinal do OMCTS (Figura 2.5). Pela substituição dos valores obtidos da integração dos sinais de α -pineno na Equação 2.1, foi possível determinar a quantidade de α -pineno contida em cada um dos tubos de RMN usados para determinação da linearidade. Uma curva de linearidade foi então construída plotando um gráfico da quantidade de α -pineno observada vs. quantidade de α -pineno esperada para cada sinal obtido no espectro de RMN de ^1H do α -pineno (Figura 2.6).

Para todos os sinais, o coeficiente de correlação obtido foi maior que o critério mínimo de aceitação descrito na Resolução RE 899 ($r \geq 0,99$) como mostrado na Tabela 2.1.

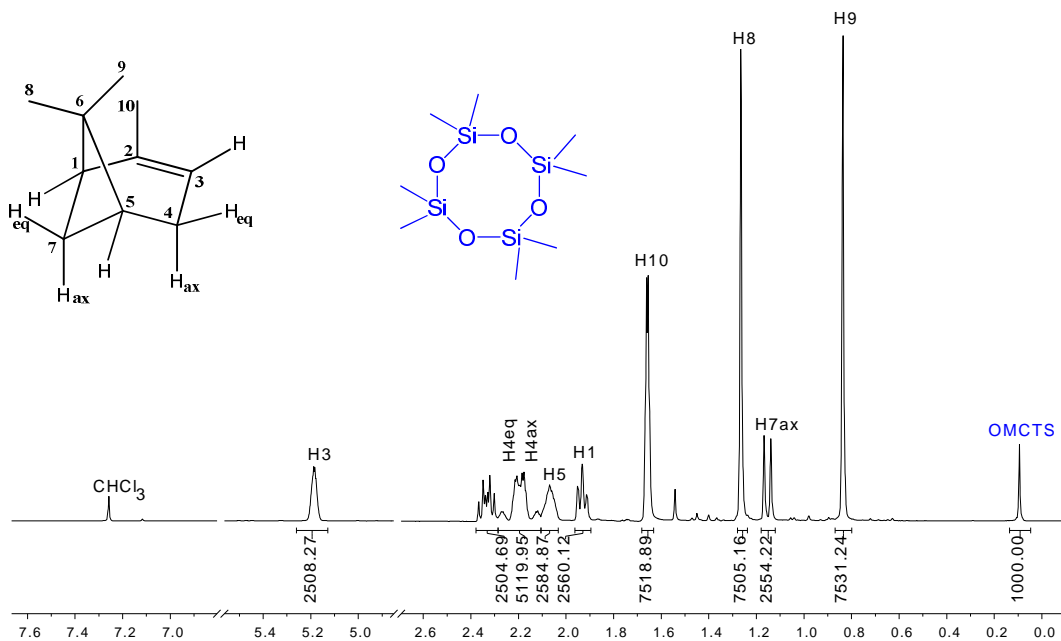


Figura 2.5. Espectro de RMN de ^1H de α -pineno (19,67 mg) (300 MHz, em CDCl_3) contendo o padrão interno OMCTS (0,71 mg) usado para determinação da linearidade do método de RMN de ^1H desenvolvido. À área do sinal correspondente ao OMCTS (em azul) foi atribuído o valor de 1000. A área dos demais sinais foi integrada em relação à do OMCTS.

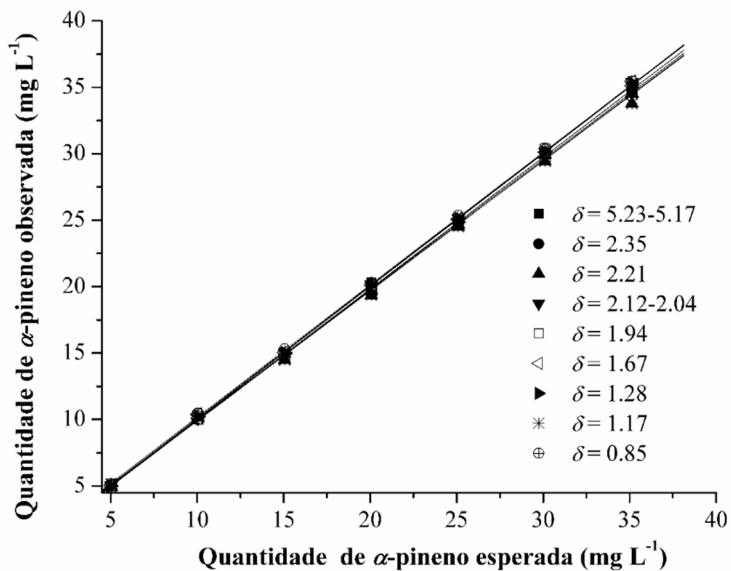


Figura 2.6. Curvas de linearidade da quantidade de α -pineno observada vs. quantidade de α -pineno esperada para cada sinal obtido no espectro de RMN de ^1H do α -pineno.

A robustez do método foi avaliada pela obtenção do espectro de RMN de ^1H usando número de transientes (nt) de 16 e de 8, com controle de temperatura a 25 °C, e nt de 16, sem controle de temperatura.

O método mostrou-se robusto, apresentando baixo coeficiente de variação (CV) sob as diferentes condições avaliadas. Além disso, a diferença de percentagem entre as massas de α -pineno obtida (%D) no experimento de robustez, foi significativamente baixa para todos os sinais observados no espectro de RMN de ^1H do α -pineno (veja os dados suplementares S1, Tabelas S1.37 a S1.45).

Tabela 2.1. Equação e coeficiente de correlação obtidos da curva de linearidade para cada sinal obtido no espectro de RMN de ^1H do α -pineno (98%) em CDCl_3 .

δ	Equação	Coeficiente de correlação (r)
5,23 – 5,17	$y = 1,0112x + 0,0048$	0,9998
2,35	$y = 1,0195x + 0,0502$	0,9999
2,21	$y = 1,0168x + 0,2018$	0,9998
2,12 – 2,04	$y = 0,9942x + 0,226$	0,9997
1,94	$y = 0,9983x + 0,1184$	0,9997
1,67	$y = 0,9973x + 0,0983$	0,9999
1,28	$y = 1,0006x + 0,0147$	0,9999
1,17	$y = 1,0227x + 0,0031$	1,0000
0,85	$y = 0,9904x + 0,0366$	0,9991

No experimento utilizando nt de 8 e temperatura controlada a 25 °C, o coeficiente de variação (CV) variou de 0,07% (1,28 ppm) a 2,28% (2,04-2,12 ppm). A diferença em percentagem (%D) entre as massas obtidas a partir dos dados de RMN utilizando número de transiente de 16 e de 8 variou de 0,07% (1,28 ppm) a 1,63% (2,21 ppm). Para o sinal em 5,17-5,23 ppm utilizado para quantificação das amostras avaliadas, foram obtidos CV máximo de 0,40% e %D de 0,76%.

Para os experimentos realizados com nt de 16 e sem controle de temperatura, foi observada uma variação de temperatura de 0,3 °C (temperatura variou de 19,1 a 19,4 °C). Nestas condições, o coeficiente de variação (CV) variou de 0,03% (5,17–5,23 ppm) a 2,28% (2,04–2,12 ppm). A diferença em percentagem entre as massas observadas dos espectros de RMN obtidos utilizando nt de 16, sem controle de temperatura variou de 0,21% (2,04–2,12 ppm) a 0,95% (1,67 ppm). Para as análises efetuadas com base na intensidade de ressonância do sinal em 5,17-5,23 ppm, foram obtidos CV máximo de 0,49% e %D de 0,65%.

Esses resultados mostram que a percentagem de α -pineno obtida a partir dos espectros de RMN de ^1H adquiridos utilizando nt de 16, sem controle de temperatura é similar à obtida dos espectros adquiridos utilizando nt de 8 e temperatura de 25 °C. Este aspecto é interessante já que o uso do nt de 8 ao invés de 16, na aquisição do espectros, reduz o tempo de análise de 10 para 5 min.

O método desenvolvido foi considerado repetitivo, uma vez que os valores de coeficiente de variação (CV) obtidos de todos os sinais no espectro de RMN de ^1H do α -pineno (desde 0,05% em 5,17-5,23 ppm a 1,93% em 2,09 ppm) foram inferiores ao máximo permitido pela resolução RE 899 (%CV \leq 5,0) (ANVISA, 2003).

A exatidão do método de RMN de ^1H foi avaliada usando um composto de pureza conhecida (α -pineno 98%). Inicialmente a pureza do α -pineno foi determinada experimentalmente conforme Equação (2.4). A seguir, a exatidão do método foi determinada pela relação entre a pureza observada experimentalmente (PO) e a pureza esperada (PE) de acordo com a Equação (2.5).

Desde que a resolução RE-899 não estabelece limite para a exatidão de um método, este parâmetro foi avaliado de acordo com as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR 14029) (ABNT, 2005) na qual os resultados obtidos devem situar-se entre 98 e 102%. Os resultados obtidos para os sinais em 5,17–5,23; 1,67; 1,28; 1,17 e 0,85 ppm do espectro de RMN de ^1H do α -pineno variaram entre $99,81 \pm 0,43\%$ (0,85 ppm) e $101,76 \pm 1,02\%$ (1,28 ppm) e foram considerados satisfatórios. Os resultados obtidos com base nos

sinais 2,35 e 1,94 ppm também foram considerados satisfatórios, embora tenha ocorrido uma pequena extrapolação do limite superior quando utilizada uma quantidade de aproximadamente 35 mg de α -pineno ($102,54 \pm 1,36\%$ e $102,54 \pm 1,25\%$, respectivamente para os sinais 2,35 e 1,94 ppm). Os demais sinais (2,21 e 2,04-2,12 ppm) excederam o limite superior estabelecido pela NBR-14029, sendo considerados insatisfatórios. Dessa forma, os sinais em 2,21 e 2,04-2,12 ppm obtidos no espectro de RMN de ^1H do α -pineno não devem ser utilizados para quantificação deste composto, uma vez que irá influenciar na exatidão dos resultados.

A estabilidade do analito e do padrão interno em solução foi avaliada utilizando todos os sinais observados no espectro de RMN de ^1H de α -pineno (aproximadamente 20 mg de α -pineno) obtidos a 25 °C em intervalos de tempo de 0 (inicial), 6, 12, 18 e 24 h.

As soluções foram consideradas estáveis, uma vez que os valores de coeficiente de variação obtidos (de 0,04% em 2,04-2,12 ppm após 6 h a 1,67% em 2,35 ppm após 24 h) foram menores do que o máximo permitido pela RE-899 resolução (%CV $\leq 5,0$). Para o sinal em 5,17-5,23 ppm, usado para quantificação das amostras avaliadas, o maior valor foi obtido no intervalo de 18 h (CV = 0,36%).

Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) foram determinados experimentalmente como descrito anteriormente. Para amostras de elevada pureza (α -pineno 98%) foram encontrados LD de 0,1 mg e LQ de 2,5 mg. Estes valores indicam que para α -pineno ser detectado numa amostra de 35 mg, ela deve conter pelo menos 0,3% deste composto. Além disso, 8% de α -pineno devem estar presentes na amostra para permitir uma quantificação adequada. O limite de detecção descrito na literatura para α -pineno em óleos essenciais provenientes de diferentes fontes foi de 0,23 e 80,7 mg L⁻¹ utilizando CG-DIC (Kardani *et al.*, 2011) e CG-EM (Lü *et al.*, 2011), respectivamente. Além disso, a partir das curvas analíticas usando CG-DIC, empregadas para quantificação de α -pineno neste trabalho, foram obtidos limites de detecção e de quantificação de α -pineno de 94,37 e de 285,9 mg L⁻¹, respectivamente. Embora o limite de detecção utilizando RMN de ^1H de 300 MHz tenha sido superior (137 mg L⁻¹), é suficiente para determinar α -pineno como constituinte majoritário em óleos essenciais

comerciais. Isso porque o teor dos constituintes majoritários de óleos essenciais geralmente é elevado.

Como antecipado, uma inadequada correção de fase do espectro de RMN de ^1H tem um impacto negativo na integração dos sinais de interesse (analito e padrão interno) causando erro nas análises. O maior erro para a integração da área foi encontrado quando se utiliza o processamento de fase automático. Este inconveniente é facilmente contornado quando o operador realiza a integração manual para obter a fase mais apropriada e, conseqüentemente, resultados exatos.

Além disso, o clorofórmio deuterado utilizado para preparar as soluções e quantificar as amostras deve estar à temperatura ambiente para evitar erros relacionados com a contração de volume do solvente quando baixas temperaturas são utilizadas (Zholonko e Tsibulin, 2003).

Uma vez que o método quantitativo usando espectroscopia de RMN de ^1H foi validado, as amostras de óleo de *Eucalyptus*, *Corymbia*, derivado de terebintina, e pimenta rosa foram submetidas à análise por CG-PI, CG-PE e CG-N e uma comparação destes resultados é mostrada na Figura 2.7.

Alguns espectros de RMN de ^1H representativos usados para quantificação de α -pineno em óleos voláteis de *Eucalyptus*, *Corymbia*, pimenta rosa e derivados de terebintina estão ilustrados na Figura 2.8.

Entre os métodos utilizados para quantificação de α -pineno, o que utiliza a técnica de RMN de ^1H apresentou os menores valores de desvios-padrão (DP < 1%), seguido pelos métodos cromatográficos utilizando padronização interna (DP < 2%) e padronização externa e normalização (DP < 4% em ambos os casos).

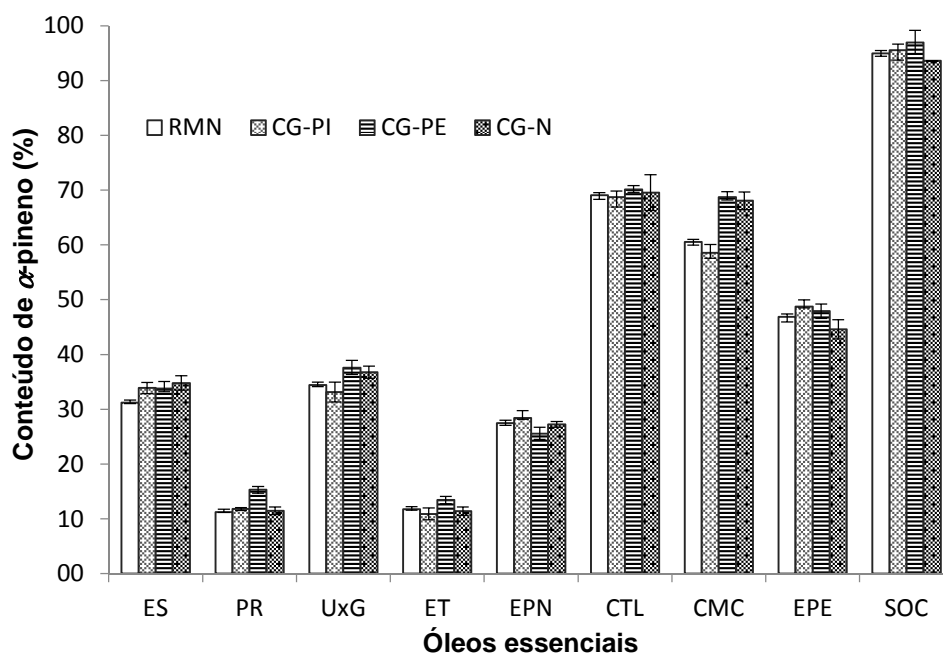


Figura 2.7. Conteúdo (%) de α -pineno em amostras de óleo essencial de *E. saligna* (ES), híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* (U x G), *E. tereticornis* (ET), *E. phoenicea* (EPE), *E. punctata* (EPN), *C. torelliana* (CTL), *C. maculata* (CMC), derivado de terebintina (SOC) e pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*) (PR) determinado pelos métodos de cromatografia gasosa-padronização externa (CG-PE), padronização interna (CG-PI), normalização de áreas (CG-N) e RMN de ^1H . O símbolo \perp contido em cada barra representa o desvio padrão.

Era esperado que os resultados obtidos pelo método de normalização de áreas fossem mais susceptíveis a erros que os obtidos pelos demais métodos utilizados para quantificar α -pineno. Isso porque, no método de CG-N, o teor do constituinte de interesse é determinado levando em consideração a área do pico referente a este constituinte em relação à área total dos picos do cromatograma. O número total de picos que aparecem no cromatograma depende dos parâmetros definidos para integração. Portanto, pequenas alterações nesses parâmetros podem resultar em um aumento ou decréscimo do número de picos, influenciando nos resultados.

Comparando o método de padronização interna ao de normalização de áreas, era esperado que a padronização interna fornecesse resultados mais exatos uma vez que, um solvente muito volátil (diclorometano) foi utilizado e qualquer descuido no manuseio das amostras poderia resultar na evaporação deste solvente. Isso levaria à concentração da amostra com consequente alteração dos resultados obtidos por normalização de áreas. Uma vez que, ao

concentrar a amostra, picos cujas áreas não atingiam os limites mínimos estabelecidos pelos parâmetros definidos para integração dos picos do cromatograma passam a atingí-los. Dessa forma, obtém-se um teor do analito subestimado por normalização de áreas. Entretanto, na padronização interna uma curva analítica é construída levando em consideração a razão entre a área obtida para o analito pela área obtida para o padrão interno no cromatograma da amostra. Essa razão será sempre constante, independente da quantidade de solvente que evaporar durante o masueio das amostras. Logo a evaporação do solvente não influencia no teor do analito determinado pelo método de padronização interna.

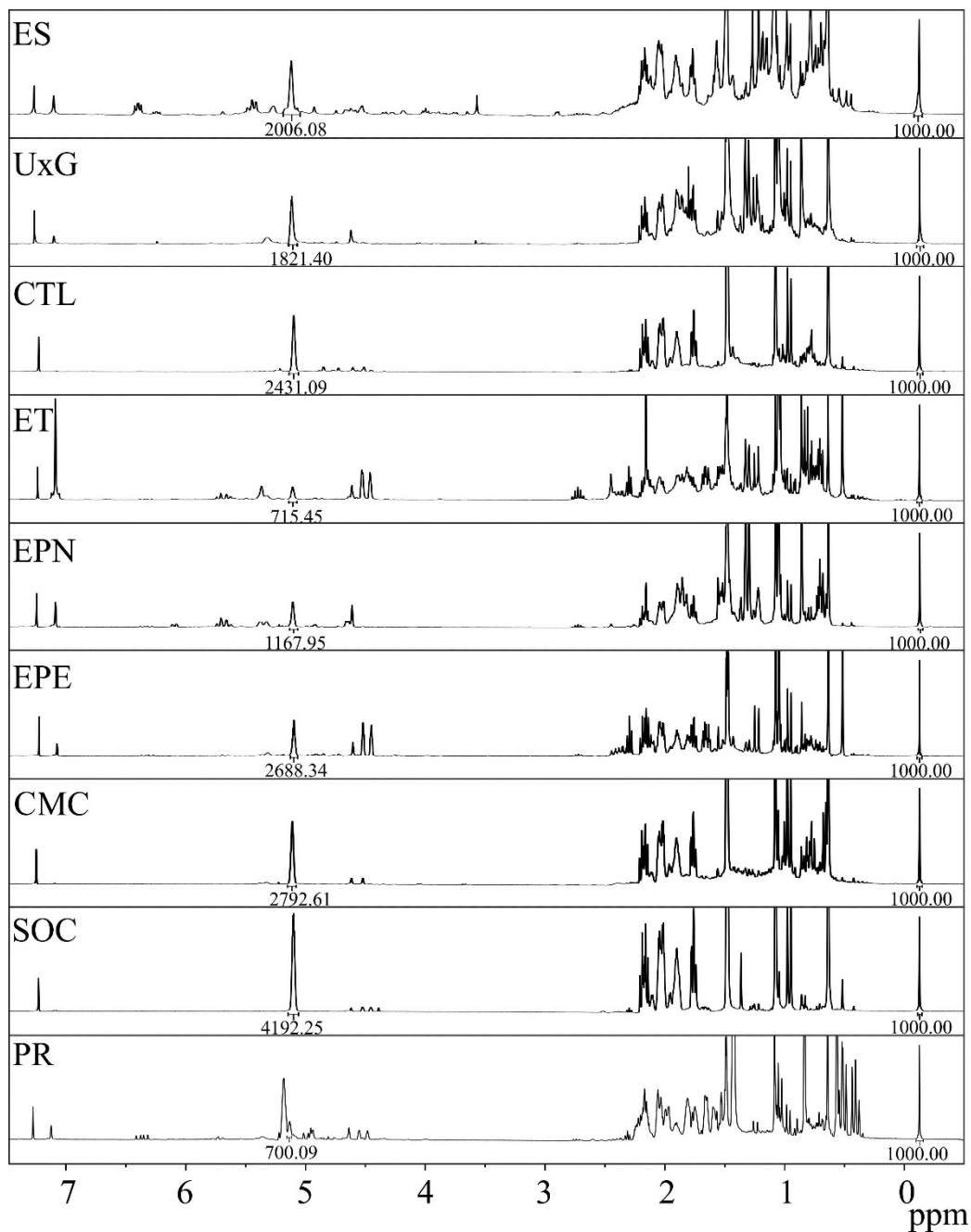


Figura 2.8. Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) representativos de amostras de óleo essencial de *E. saligna* (ES), híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* (U x G), *E. tereticornis* (ET), *E. phoenicea* (EPE), *E. punctata* (EPN), *C. torelliana* (CTL), *C. maculata* (CMC), pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*) (PR) e derivados de terebintina (SOC).

A similaridade dos métodos usados para determinação de α -pineno nas amostras analisadas foi comprovada por análise de variância (ANOVA) e pelos testes de Tukey (compara a média dos quatro métodos entre si) e de Dunnett (compara a média dos três métodos cromatográficos contra a média do método

de RMN de ^1H) com 95% de confiança. Observou-se que os valores das médias obtidas para o teor de α -pineno pelos métodos cromatográficos (CG-PI, CG-PE e CG-N) e pelo método de RMN de ^1H desenvolvido não apresentaram diferenças estatísticas (Ver Figura 2.7, pág. 60).

Além disso, valores de repetitividade e de reprodutibilidade (R&R) de 1,81; 4,44; 5,41 e 5,98% obtidos na análise de variância dos métodos de RMN, CG-PI, CG-N e CG-PE, respectivamente, mostraram que os métodos foram caracterizados como sistemas de medição adequados para quantificação de α -pineno em amostras de óleo essencial, já que eles apresentaram valores de R&R inferiores a 10%. O método de RMN de ^1H é o mais preciso, uma vez que apresentou o menor valor de R&R.

2.5. Conclusão

O método de RMN de ^1H desenvolvido é adequado para quantificação de α -pineno de *Eucalyptus* e *Corymbia* visto que diferentes fontes de óleos essenciais foram analisadas com sucesso. Além disso, α -pineno foi quantificado com êxito nas amostras de óleo essencial de derivados da terebintina e de pimenta rosa.

Limites de detecção ($\text{LD} \geq 0,10 \text{ mg}$) e de quantificação ($\text{LQ} \geq 2,5 \text{ mg}$) usando um espectrômetro de RMN de 300 MHz e nt de 16 foram determinados e estão em conformidade com as normas pertinentes.

Enquanto a quantificação de terpenos em óleos essenciais utilizando o tradicional método cromatográfico (CG-N) pode demorar até 70 min, a quantificação de α -pineno usando o método de RMN de ^1H desenvolvido é realizada em 10 min. Em contrapartida, o preparo de amostras para o método de RMN de ^1H é mais trabalhoso quando comparado ao método de CG-N, já que neste último não é necessário o uso de padrão interno.

Portanto, o método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleos essenciais é adequado, com resultados comparáveis aos obtidos por CG, mas com a vantagem de ser simples, rápido e aplicável ao controle de qualidade de um grande número de amostras.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE RMN DE ^1H PARA ANÁLISES DE α -BISABOLOL EM ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eremanthus erythropappus*

RESUMO

α -Bisabolol é um terpeno natural produzido por *Eremanthus erythropappus* sendo amplamente usado em produtos farmacêuticos e em cosméticos devido à suas propriedades anti-inflamatória, antibactericida e antimicótica. Devido a estas aplicações, o controle da composição e autenticidade dos óleos comerciais ricos neste terpeno é necessário, resultando na demanda por novos métodos para controle de qualidade. Neste trabalho, um rápido e eficiente método para quantificação de α -bisabolol no óleo essencial de *E. erythropappus* (candeia) usando RMN de ^1H foi desenvolvido, validado e comparado ao método de cromatografia gasosa (CG). A quantificação de α -bisabolol usando RMN de ^1H foi utilizada com sucesso para a maior parte das amostras de óleo essencial de *E. erythropappus* avaliadas, com exceção daquelas que têm composição complexa, nas quais o teor de α -bisabolol foi superestimado. Para contornar esta limitação, foi usado o mapa de contornos de RMN 2D de COSY. Este método provou ser uma alternativa rápida e eficiente, proporcionando resultados com desvios padrão inferiores a 0,3%. Todos os parâmetros avaliados (seletividade, linearidade, exatidão/precisão, repetitividade, robustez e estabilidade do analito e do padrão interno em solução) mostraram resultados satisfatórios de acordo com as normas brasileiras vigentes (Anvisa – RE 899 e ABNT NBR – 14029). Utilizando os sinais de RMN de ^1H em 5,36 e 5,13 ppm, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram de 0,26 e 2,59 mg, respectivamente. Os resultados obtidos pelo método de RMN de ^1H apresentou DP = 0,59%, inferior ao valor encontrado para a CG (DP = 1,18%). Análises de variância (ANOVA) e testes de Tukey mostraram que os resultados obtidos pelos métodos de RMN de ^1H e de COSY são semelhantes aos obtidos pela tradicional técnica de CG-DIC utilizando normalização, com 95% de confiança.

3.1. Introdução

A qualidade de óleo essencial tem sido amplamente avaliada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa equipada com detector por ionização em chamas (CG-DIC) (Khia *et al.*, 2014; Bajer *et al.*, 2015).

Tipicamente, a análise por estas técnicas leva cerca de 90 minutos e este é um fator limitante em situações onde o tempo é essencial. A quantificação dos constituintes majoritários de óleos essenciais comerciais é vital porque eles são extraídos de diferentes fontes e seu preço varia de acordo com o seu teor (Bizzo *et al.*, 2009; Guerrini *et al.*, 2011). Os óleos essenciais são compostos por um ou mais componentes majoritários presentes em elevadas concentrações, como por exemplo, citral (Barbosa *et al.*, 2008) e 1,8-cineol (Bizzo *et al.*, 2009) em *Cymbopogon citratus* e *Eucalyptus* que devem estar presentes em, no mínimo, 60% e 70%, respectivamente, para fins medicinais.

O controle de qualidade de medicamentos (Holzgrabe, 2010), bebidas alcoólicas e alimentos fermentados, café, chá, frutas, vegetais, azeite de oliva, leite e produtos diários, mel, peixe (Mannina *et al.*, 2012; Marcone *et al.*, 2013), carne (Mannina *et al.*, 2012; Marcone *et al.*, 2013, Siciliano *et al.*, 2013) e gasolina (Meusinger, 1999) tem sido realizado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio quantitativa (RMNq de ^1H). Além disso, RMN permite a determinação da razão entre diastereoisômeros e enantiômeros usando diferentes reagentes de deslocamentos em amostras e a quantificação simultânea de analitos, impurezas e solventes residuais (Holzgrabe, 2010).

A extração de carboidratos usando extração em fase sólida (EFS) seguida pela determinação simultânea dos alcaloides codotubulosina A e B (Figura 3.1) da planta *Radix Codonopsis* foi realizada por RMN de ^1H (Li *et al.*, 2009).

Eletroforese capilar por afinidade (ECA) e espectroscopia de ressonância magnética (RMN) foram usadas no estudo de complexação de risperidona e 9-hidroxisperidona (Figura 3.1) com sete ciclodextrinas em pH 2,5 e 7,4. A estereoquímica dos complexos, as constantes de ligação das ciclodextrinas que permitem maior complexação e a proposta de um mecanismo dependente de pH foram estabelecidas por RMN de ^1H . A influência do pH na termodinâmica da complexação foi avaliada por ECA (Danel *et al.*, 2008).

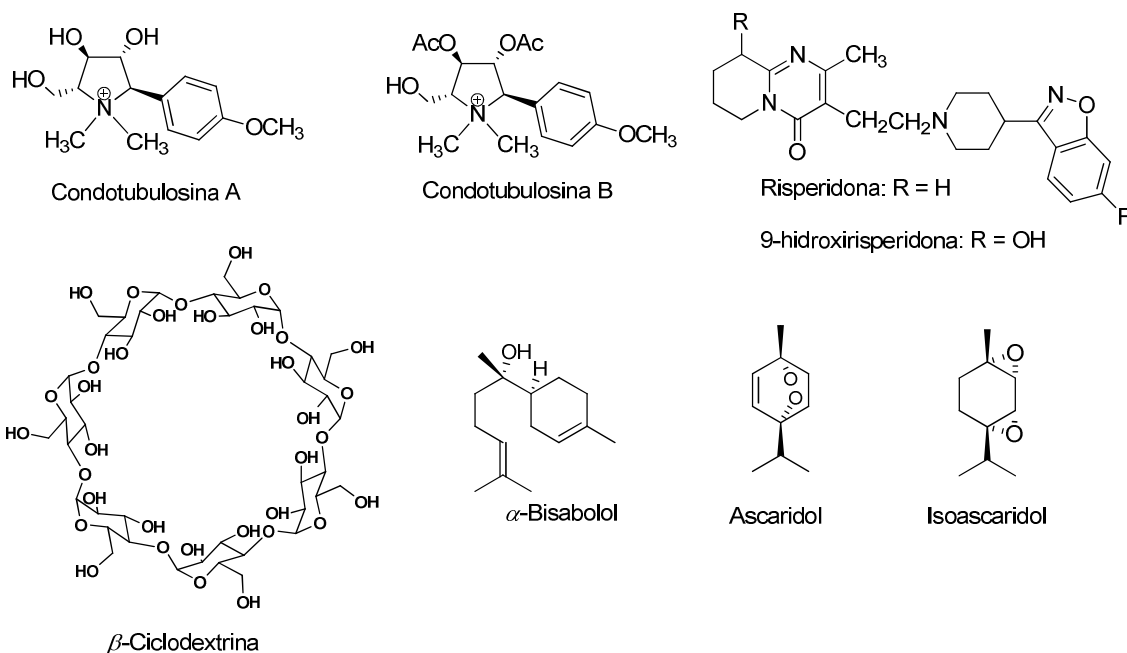


Figura 3.1. Estrutura dos compostos condotubulosina A e B, risperidona, 9-hidroxisperidona, β -ciclodextrina e dos terpenos α -bisabolol, ascaridol e isoascaridol.

Na literatura, apenas relatos usando RMN de ^1H para determinar componentes ativos em óleos essenciais de *Brickellia weronicaefolia* (Rivero-Cruz *et al.*, 2006), *Eucalyptus*, *Corymbia*, *Schinus terebinthifolius* e terebintina (Cerceanu *et al.*, 2016a), *Eremanthus erythropappus* (Cerceanu *et al.*, 2016b), *Foeniculum vulgare* (AbouZid, 2016), *Inula racemosa* e *Saussurea lappa* (Choudhary *et al.*, 2016) foram encontrados. Entretanto, o uso de RMN de ^{13}C para este propósito é muito mais explorado na literatura.

Experimentos de ^{13}C foram usados para quantificar dipropilenoglicol em extratos de perfume (Ottavioli *et al.*, 2011) e ácidos tipo eudesmano em óleo de *Dittrichia viscosa* sp (Blanc *et al.*, 2005). Além disso, a combinação das técnicas de CG-DIC e de RMN de ^{13}C foram usadas para determinar o conteúdo de ascaridol e de isoascaridol (Figura 3.1) em óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* (Cavalli *et al.*, 2004), e de germacrenos e elemenos em óleos essenciais de *Cleistopholis patens* (Ouattara *et al.*, 2013).

A condição principal para quantificação usando RMN é que pelo menos um dos sinais do analito não se sobreponha a nenhum outro sinal da amostra. No

entanto, a separação dos sinais pode ser obtida ajustando parâmetros e condições, tais como solvente, pH, concentração da amostra, temperatura e adicionando reagentes lantanídeos e reagentes auxiliares de deslocamento tais como ciclodextrinas (Holzgrabe, 2010).

Ao contrário da cromatografia, RMN é um método rápido, não destrutivo e que não requer curvas analíticas (Huang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). O método de RMN permite a quantificação simultânea de muitos componentes, utilizando um padrão interno e um único espectro (Wang *et al.*, 2015; Zuriarrain *et al.*, 2015). Além disso, não é necessário um padrão interno de elevado grau de pureza (Shen *et al.*, 2014) que seja semelhante ao analito de interesse para a quantificação exata. Também, RMN pode ser utilizado para a quantificação de compostos que se degradam à temperaturas elevadas, que não podem ser determinados por GC (Cavalli *et al.*, 2004; Pauli *et al.*, 2012).

Entretanto, RMN tem baixa sensibilidade, o que demanda o uso de espectrômetros de alto campo magnético. Além disso, a exatidão/precisão da RMNq é influenciada pela qualidade do *shimming*, pela estabilidade do campo magnético (Holzgrabe, 2010), pelos ajustes de fase e de linha de base e pela integração manual dos sinais (Huang *et al.*, 2014). Nas misturas contendo muitos componentes, é comum a ocorrência de sobreposição dos sinais no espectro de RMN de ^1H levando a superestimação dos analitos. Nesta situação, a técnica de COSY permite a atribuição dos sinais sobrepostos (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012) e pode ser usada como uma ferramenta quantitativa proporcionando resultados satisfatórios (Dufour *et al.*, 2015; Dufour *et al.*, 2015).

α -Bisabolol (Figura 3.1) é um álcool sesquiterpênico monocíclico encontrado em quantidades consideráveis na camomila (*Matricaria chamomilla*), sálvia (*Salvia runcinata*), *Myoporum crassifolium*, candeia (*Eremanthus erythropappus*) (Kamatou e Viljoen, 2010) e, recentemente, em negramina (*Siparuna guianensis*) (Montanari, 2010). Devido as suas propriedades anticarcinogênica, anti-inflamatória, antimicótica e antibactericida, α -bisabolol é considerado um ingrediente importante encontrado na formulação de vários produtos farmacêuticos e cosméticos (Kamatou e Viljoen, 2010).

O interesse no desenvolvimento de um método rápido, simples e exato para controle de qualidade de óleos essenciais ricos em α -bisabolol vem da

necessidade das indústrias farmacêuticas e de cosméticos obterem matéria-prima de alta qualidade para o desenvolvimento dos seus inúmeros produtos.

3.2. Experimental

3.2.1. Materiais e reagentes

Octametilciclotetrasiloxano (98%), α -bisabolol (95,5%) e octadecano padrão analítico (98,5%) foram comprados da Sigma Aldrich (Wisconsin, EUA). Clorofórmio deuterado foi adquirido da Tedia Brasil e diclorometano da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

Todas as amostras utilizadas são óleos essenciais de *E. erythropappus*. As amostras E1, E2, E3, E4 e E5 estavam disponíveis no Departamento de Química e Física da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brazil. E6 e E7 foram fornecidas pela empresa Atlântica Óleos Essenciais (Caeté, MG, Brasil). E8 e E9 foram fornecidas pela empresa Citróleo (Torrinha, SP, Brasil). Amostras E10 e E11 foram fornecidas pela Destilaria Bauru (Catanduva, SP, Brasil) e pelo Departamento de Química e Física da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil, respectivamente.

Todas pesagens foram realizadas em uma balança analítica Shimadzu (capacidade de 82 / 220 g e precisão de 0,1 mg / 0,01 mg). As transferências de volume foram feitas usando seringas cromatográficas de 500 μ L e de 5,00 mL. Frascos com tampas de 10,0 mL e tubos de RMN com diâmetro externo de 5 mm foram utilizados em todos os experimentos.

3.2.2. Método de RMN

Soluções

RMN de 1H

Solução estoque de α -bisabolol em $CDCl_3$ (105,0 mg mL⁻¹) e de octametilciclotetrasiloxano (OMCTS) em $CDCl_3$ (1,9 mg mL⁻¹) foram preparadas para determinar a linearidade, repetibilidade, exatidão/precisão, estabilidade de α -bisabolol e do OMCTS em solução, além da robustez do método. Soluções estoque de α -bisabolol (103,7 mg mL⁻¹) em $CDCl_3$ e de OMCTS em $CDCl_3$ (2,3 mg mL⁻¹) foram preparadas para determinar os limites de detecção e de quantificação. Para quantificação dos óleos essenciais, soluções estoque do

padrão interno OMCTS em CDCl_3 (concentrações de 1,7 a 2,9 mg mL^{-1}) foram preparadas.

Para preparar todas as soluções, os óleos e reagentes foram pesados diretamente nos frascos e tampados com septos de teflon. Clorofórmio deuterado foi adicionado aos frascos utilizando uma seringa cromatográfica.

COSY

Soluções estoque de α -bisabolol em CDCl_3 (197,9 mg mL^{-1}) e de OMCTS em CDCl_3 (3,5 mg mL^{-1}) foram preparadas para construção da curva analítica (contendo massa de α -bisabolol variando de 10 a 70 mg, com intervalos de 10 mg, e 0,90 mg de OMCTS) usada no método do COSY. A solução estoque de OMCTS também foi usada para quantificação de todas as amostras de óleos essenciais pelo método de COSY.

Instrumentação

Todas as análises foram realizadas em um espectrômetro Varian Mercury 300 MHz, equipado com uma sonda de dois canais (^1H - ^{13}C) de banda larga de 5 mm, unidade geradora de gradiente de campo e unidade de controle de temperatura.

A determinação da reprodutibilidade foi realizada em um espectrômetro Bruker 400 MHz, modelo Avance III com amostrador automático, sonda banda larga com detecção inversa (BBI) de 5 mm com ATMA, unidade geradora de gradiente de campo e unidade de controle de temperatura.

Condições experimentais

RMN de ^1H

O pulso de 45° (pw45) foi determinado para todas as amostras usando a sequência de calibração implementada pelo programa VnmrJ4.2 da Agilent Technologies. O tempo de relaxação longitudinal (T_1) foi determinado experimentalmente pela sequência de inversão recuperação para todos os hidrogênios da amostra, do α -bisabolol e do padrão OMCTS. O mais longo T_1 obtido para validação e para quantificação das amostras de óleos essenciais foi de 7 s. Os experimentos foram realizados utilizando a temperatura da sonda

controlada a 25 °C, usando número de transientes (nt) de 16, número de pontos no FID (np) de 32768, largura do pulso (pw) de 45°, sem rotação de amostra, largura espectral (sw) de 4800,8 Hz, tempo de aquisição (aq) de 4,555 s, tempo de atraso (d1) de 5 vezes T_1 entre os pulsos foi usado para garantir a relaxação completa dos átomos de hidrogênio (Caligiani *et al.*, 2007; Parikh e Gadape, 2011; Santos e Colnago, 2013). O *shimming* foi realizado automaticamente para todos os experimentos e a largura a meia altura do pico do clorofórmio foi sempre inferior a 0,7 Hz.

Para avaliar a robustez do método, espectros de RMN de ^1H foram adquiridos sem controle de temperatura usando nt de 16, e à temperatura de 25 °C, usando nt de 8. Os espectros foram processados usando o programa MestReNova 6.0.2 com correção automática de linha de base empregando o ajuste polinomial de Bernstein e ampliação da linha (lb) de 0,3 Hz. Correção de fase e integração dos espectros foram realizadas manualmente. O FID foi processado usando 64 K (Forshed *et al.*, 2005; Parikh e Gadape, 2011).

Cosy com gradiente de campo

Todas as análises foram realizadas a 25 °C (curva analítica contendo massa de α -bisabolol variando de 10 a 70 mg, com intervalos de 10 mg, e 0,90 mg de octametilciclotetrasiloxano, além da quantificação das amostras de óleos essenciais), usando um número de transientes de 6 (nt); número de pontos do FID de 800 (np); largura de pulso de 90° (pw); largura espectral de 2667,4 Hz (sw); tempo de aquisição de 0,150 s (aq); tempo de atraso de 1,00 s (d1); largura da banda de filtro de 1600 (fb); transição para o estado estável de 32 (ss – steady state transient); incrementos de 128 (ni); atenuação da energia do pulso transitório de 57 dB (tpwr) e gradientes gzlviE, gtE e Dratio de 1009; 0,001 e 1,000, respectivamente. O *shimming* foi feito automaticamente para todos os experimentos e a largura a meia altura do pico do clorofórmio no espectro de RMN de ^1H foi sempre inferior a 0,7 Hz.

Validação do método de RMN de ¹H

Para validação do método os seguintes parâmetros foram avaliados: especificidade e seletividade, linearidade, robustez, repetibilidade, reprodutibilidade, exatidão/precisão, estabilidade do analito e do padrão interno em solução, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) (Parikh e Gadape, 2011; INMETRO, 2011; Bharti e Roy, 2012).

Especificidade, seletividade e linearidade

A especificidade e seletividade do método proposto foi avaliada pela ausência de sobreposição de pelo menos um sinal do α -bisabolol com sinais da amostra, do solvente deuterado CDCl₃ e do padrão interno OMCTS no espectro de RMN de ¹H.

A linearidade foi checada pela adição a 7 tubos de RMN de uma quantidade de α -bisabolol variando de 5,0 a 35,0 mg. Os volumes da solução de α -bisabolol em CDCl₃ (105 mg mL⁻¹) adicionados aos tubos foram 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 μ L que correspondem a massas de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 mg de α -bisabolol, respectivamente. A cada um desses tubos, foram adicionados 310 μ L (0,61 mg) da solução estoque de OMCTS em CDCl₃ a uma concentração de 1,9 mg mL⁻¹. Clorofórmio deuterado a 20 °C também foi adicionado a esses tubos para completar o volume para 730 μ L. Todas as transferências de volume foram realizadas usando seringas cromatográficas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os sinais em 5,36; 5,13 e 1,10 ppm obtidos no espectro de RMN de ¹H do α -bisabolol foram integrados e usados para fazer um gráfico utilizando o programa OriginPro8. Para cada um destes sinais, foi obtida uma curva de linearidade usando a quantidade de α -bisabolol esperada (mg) vs. a quantidade de α -bisabolol obtida (mg) dos espectros de RMN de ¹H NMR pela Equação 3.1 (Parikh e Gadape, 2011; Santos e Colnago, 2013; Cerceau *et al.*, 2016a).

$$m_{Bis} = \frac{I_{Bis}}{I_{OMCTS}} \times \frac{N_{OMCTS}}{N_{Bis}} \times \frac{M_{Bis}}{M_{OMCTS}} \times m_{OMCTS} \quad (\text{Equação 3.1})$$

Onde, m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; M_{Bis} = massa molecular do α -bisabolol; M_{OMCTS} = massa molecular do octametilciclotetrasiloxano; m_{OMCTS} =

massa do octametilciclotetrasiloxano, I_{Bis} = área da integral do sinal no espectro de RMN de 1H usado para quantificação do α -bisabolol; I_{OMCTS} = 1000; N_{OMCTS} = número de átomos de hidrogênio presentes no octametilciclotetrasiloxano; N_{Bis} = número de átomos de hidrogênio que correspondem ao sinal no espectro de RMN de 1H NMR usado para quantificação do α -bisabolol.

Robustez

A robustez do método foi avaliada dos espectros de RMN de 1H adquiridos com número de transiente (nt) de 16 e de 8 e temperatura controlada a 25°C e, com nt de 16 sem controle de temperatura. A determinação da robustez do método foi realizada usando os tubos de RMN contendo aproximadamente 5,0; 20 e 35 mg de α -bisabolol, preparados para determinação da linearidade.

Os sinais em 5,36; 5,13 e 1,10 ppm obtidos no espectro de RMN do α -bisabolol foram integrados e os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), obtidos pela Equação 3.2 (Parikh e Gadape, 2011; Santos e Colnago, 2013; Cerceau *et al.*, 2016a).

$$DPR = CV = \frac{DP}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.2})$$

Onde, DPR = desvio padrão relativo entre as massas observado nas triplicatas, CV = coeficiente de variação, \bar{X} = média dos valores entre as massas obtidas nas triplicatas, DP = desvio padrão entre as massas observadas nas triplicatas.

Os resultados obtidos nos espectros de RMN adquiridos com nt de 16 e de 8 e temperatura controlada a 25 °C e, com nt de 16, sem controle de temperatura foram comparados e a diferença entre eles foi expressa em percentagem (%D), conforme Equação 3.3 (Parikh e Gadape, 2011; Cerceau *et al.*, 2016a).

$$\%D = \frac{m_{xi} - m_{xt}}{m_{xi}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.3})$$

Onde, %D = diferença em percentagem entre a massa observada no espectro adquirido usando nt = 16 e a massa observada no espectro adquirido usando nt =

8; m_{xi} = massa observada no espectro adquirido usando $n_t = 16$ e m_{xt} = massa observada no espectro adquirido usando $n_t = 8$.

Repetibilidade e reprodutibilidade

A repetibilidade do método foi checada 15 dias após a determinação da linearidade pela realização de um experimento similar, pelo mesmo analista, usando o mesmo laboratório e equipamento. Para avaliação da repetibilidade do método, os sinais em 5,36; 5,13 e 1,10 observados no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol foram integrados em relação ao sinal do padrão interno e os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV).

Para avaliar a reprodutibilidade do método, análises foram realizadas no laboratório de ressonância magnética nuclear da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Uma solução preparada com o padrão de α -bisabolol da Sigma Aldrich (95,5%) em CDCl_3 foi enviada a UFSCar para realizar a quantificação de α -bisabolol, seguindo o mesmo protocolo de RMNq de ^1H . Para as amostras E10 e E11, a quantidade de α -bisabolol foi determinada na UFSCar, onde elas foram preparadas. Portanto, a preparação e aquisição dos espectros das amostras E10 e E11 foram realizadas na UFSCar. Os resultados obtidos em nosso laboratório na UFV usando um espectrômetro de 300 MHz foram comparados aos obtidos na UFSCar usando um espectrômetro de 400 MHz.

Exatidão e estabilidade

A exatidão foi avaliada no mesmo experimento que a linearidade do método. O método analítico proposto para análise de composto de pureza conhecida (α -bisabolol 95,5%) foi usado e a pureza observada experimentalmente (PO) foi calculada usando a Equação 3.4 e a exatidão usando a Equação 3.5 (Parikh e Gadape, 2011; Santos e Colnago, 2013; Cerceau *et al.*, 2016a).

$$P_{Bis} = \frac{I_{Bis}}{I_{OMCTS}} \times \frac{N_{OMCTS}}{N_{Bis}} \times \frac{M_{Bis}}{M_{OMCTS}} \times \frac{m_{OMCTS}}{m} \times P_{OMCTS} \quad (\text{Equação 3.4})$$

Onde: M_{OMCTS} = massa molecular de octametilciclotetrasiloxano ($296,62 \text{ g mol}^{-1}$); M_{Bis} = massa molecular do α -bisabolol ($222,37 \text{ g mol}^{-1}$); m_{OMCTS} = massa de

octametilciclotetrasiloxano (em g); I_{Bis} = área medida pela integração do sinal de interesse no espectro de RMN de ^1H NMR do α -bisabolol; $I_{OMCTS} = 1000$; $N_{OMCTS} = 24$ (número de átomos de hidrogênio presentes no octametilciclotetrasiloxano); N_{Bis} = número de átomos de hidrogênio do sinal de interesse no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m = massa de α -bisabolol (em g); P_{OMCTS} = pureza do octametilciclotetrasiloxano (98%) informada pelo fabricante; P_{Bis} = pureza calculada do α -bisabolol (em % m/m).

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{OP}{EP} \times 100 \quad (\text{Equação 3.5})$$

Onde: PO = pureza observada; PE = pureza esperada (informada pelo fabricante).

A estabilidade do analito e do padrão interno em solução foi avaliada usando os tubos de RMN contendo aproximadamente 20 mg de α -bisabolol (como descrito na determinação da linearidade). As análises foram realizadas a 25 °C com intervalos de tempo de 0 (inicial), 6, 12, 18 e 24 horas. Os sinais em 5,36; 5,13 e 1,10 ppm, observados no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol, foram integrados para determinação da quantidade de α -bisabolol em cada intervalo de tempo de acordo com a Equação 3.1 e os resultados foram expressos como coeficiente de variação (CV) e como %D.

Limites de quantificação e de detecção

Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) foram determinados experimentalmente. Volumes apropriados da solução de α -bisabolol em CDCl_3 (99 mg mL^{-1}) correspondendo a 0,10; 0,50; 1,00; 2,50 e 5,00 mg de α -bisabolol foram adicionados aos tubos de RMN. A cada um desses tubos foram adicionados 310 μL (0,70 mg) da solução estoque de OMCTS em CDCl_3 na concentração de 2,3 mg mL^{-1} , seguido por clorofórmio deuterado a 20 °C para completar o volume para 730 μL . Obtidos os espectros de RMN de ^1H da mistura adicionada em cada tubo de RMN, os sinais em 5,36; 5,13 e 5,10 ppm do α -bisabolol foram integrados em relação ao sinal do padrão interno (0,10 ppm) e a quantidade de α -bisabolol contida em cada tubo foi determinada conforme Equação 3.1. Para determinação do LQ foi utilizada a razão sinal ruído maior igual a 150, de forma a garantir que

os resultados sejam obtidos com uma incerteza menor igual a 1% (Holzgrabe, 2010). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Quantificação de α -bisabolol em óleos essenciais usando RMN 1D e 2D

RMN de 1H

Para quantificação, uma quantidade exata (33,0 a 47,0 mg) de cada amostra de óleo essencial foi pesada diretamente nos tubos de RMN. A estes tubos foram adicionados 310 μ L (0,53; 0,72; 0,75 e 0,90 mg) da solução estoque de OMCTS em $CDCl_3$ (nas concentrações variando de 1,7 a 2,9 mg mL^{-1}) e o volume foi completado para 730 μ L pela adição de $CDCl_3$ a 20 °C. As amostras foram quantificadas em triplicata. Os espectros de RMN de 1H foram obtidos e o sinal do OMCTS (0,10 ppm) foi integrado e, arbitrariamente, a este foi atribuído o valor de 1000, usando o programa MestReNova. O sinal em 5,13 ppm foi integrado em todas as amostras e os valores das integrações foram usados para calcular a quantidade de α -bisabolol conforme Equação 3.1.

RMN de COSY

Para quantificação de óleo essencial utilizando COSY, uma curva analítica foi construída (Dufour *et al.*, 2015) pela adição de quantidades de α -bisabolol variando de 10,0 a 70,0 mg a 7 tubos de RMN. Os volumes da solução α -bisabolol em $CDCl_3$ (197,95 mg mL^{-1}) adicionados aos tubos de RMN foram de 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 μ L, que correspondem a massas de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 mg de α -bisabolol, respectivamente. A cada um destes tubos foi adicionado 250 μ L (0,91 mg) da solução estoque de OMCTS em $CDCl_3$ na concentração de 3,5 mg mL^{-1} . Clorofórmio deuterado a 20 °C foi adicionado a cada tubo para completar o volume para 600 μ L. Todas as transferências de volume foram feitas usando seringa cromatográfica. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os mapas de contornos dos COSY foram obtidos e a área da mancha correspondente ao padrão interno OMCTS na diagonal (0,10 ppm) foi integrada e arbitrariamente atribuído o valor de 1000 usando o programa MestReNova. Então, a área do pico de correlação em 5,13 x 2,06 ppm do α -bisabolol foi integrada em

relação a área do pico da diagonal do OMCTS. A equação da curva analítica ($Y = 10,123X + 0,92$ $r = 0,9995$) foi obtida plotando um gráfico da área do pico de correlação em $5,13 \times 2,06$ ppm do α -bisabolol em diferentes quantidades vs. massa de α -bisabolol (em mg).

Para quantificação, uma quantidade exata (33,0 a 59,0 mg) de cada amostra de óleo essencial foi pesada diretamente nos tubos de RMN. A estes tubos de RMN, foram adicionados 250 μ L (0,91 mg) da solução estoque de OMCTS em $CDCl_3$ ($3,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e o volume foi completado para 600 μ L pela adição de $CDCl_3$ a 20 °C.

A massa de α -bisabolol (em mg), em cada amostra, foi obtida pela substituição do valor da área do pico de correlação acima mencionado na equação da curva analítica.

3.2.3. Métodos utilizando cromatografia gasosa

Soluções

Para realizar os experimentos de CG-DIC uma solução de α -bisabolol em diclorometano ($9,6 \text{ mg mL}^{-1}$) foi preparada para os experimentos de cromatografia gasosa utilizando padronização externa (CG-PE) e interna (CG-PI). Uma solução de octadecano em diclorometano (20 mg mL^{-1}) foi preparada para os experimentos de cromatografia gasosa utilizando CG-PI.

Todas as soluções foram preparadas conforme descrito no item 3.2.2.

Para identificar os constituintes das amostras usando CG-EM, aproximadamente 10 mg de cada amostra foram dissolvidas em 1,00 mL de diclorometano.

Instrumentação

Cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM)

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás (Shimadzu, modelo 17A) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (RTX-5MS-Restek; 30 m x 0,25 mm d.i e espessura do filme de 0,25 μ m) conectado a um detector por espectrometria de massas (Shimadzu, modelo QP5050A).

Cromatografia gasosa-detector por ionização em chamas (CG-DIC)

A quantificação das amostras usando cromatografia gasosa com padronização externa (CG-PE), padronização interna (CG-PI) e normalização (CG-N) foram realizadas utilizando o cromatógrafo Shimadzu, modelo 17A, conectado ao detector por ionização em chamas (CG-DIC) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (SBP5-Supelco, 30 m x 0,25 mm d.i e 0,25 µm de espessura de filme).

Condições experimentais

CG-EM

A temperatura do forno foi programada para variar de 40 °C (2 min) a 200°C a uma taxa de 3 °C min⁻¹. O injetor e o detector foram mantidos a 200 e 240 °C, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a uma taxa de fluxo de 1,8 mL min⁻¹. A quantidade de 1,0 µL (solução do óleo essencial 1% m/v em diclorometano) foi injetada na razão de *split* foi de 1:5.

Os compostos foram identificados pelo tempo de retenção, pela comparação de seus espectros de massas com os espectros da base de dados do equipamento CG-EM (Willey 7 ed.; Nist 5 ed., Nist 8 ed. e Nist 11 ed.) e também comparando o índice aritmético calculado da injeção da mistura de alcanos lineares (C9 a C40) com os dados descritos na literatura (Martins *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2008; Adams, 2012).

CG-DIC

A temperatura da coluna foi programada para variar de 40 °C (4 min) a 200 °C a uma taxa de 3 °C min⁻¹. O injetor e o detector foram mantidos a 200 °C e 240 °C, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a uma taxa de fluxo de 1,8 mL mL⁻¹. A quantidade de 1,0 µL (solução do óleo essencial 1% m/v em diclorometano) foi injetada na razão de *split* foi de 1:10.

Quantificação de α -bisabolol em óleo essencial usando CG-DIC

A quantificação das amostras usando cromatografia gasosa foi realizada usando o método de normalização (CG-N). Além disso, as amostras E10 e E11 foram quantificadas usando normalização das áreas dos picos (CG-N),

padronização interna (CG-PI) e padronização externa (CG-PE) (Ribani *et al.*, 2004). GC-PI e CG-PE não foram usados para quantificar as demais amostras porque um trabalho realizado anteriormente pelo grupo, mostra que essas técnicas têm excelente concordância.

Normalização (CG-N)

Aproximadamente de 10 mg de amostra foram pesadas em frascos aos quais foi adicionado 1,00 mL de diclorometano. As análises foram realizadas em triplicata em condições previamente descritas. O conteúdo de α -bisabolol nas amostras foi calculado pela percentagem da área do pico correspondente ao α -bisabolol em relação a área total do cromatograma.

Padronização interna (CG-PI)

Uma curva analítica foi construída contendo α -bisabolol nas concentrações variando de 0,050 a 1,20 mg mL⁻¹ (n = 8 pontos) preparadas a partir da solução estoque de α -bisabolol em diclorometano (9,60 mg mL⁻¹). A cada uma das soluções foram adicionados 500 μ L da solução de octadecano em diclorometano (20,0 mg mL⁻¹) e o volume completado para 10,0 mL com este mesmo solvente. A equação da curva analítica ($y = 0,9738x + 0,023$; $r = 0,9998$) foi obtida pela razão entre a área do analito e a área do padrão interno (eixo y) vs. a concentração do analito (eixo x, em mg L⁻¹).

Aos balões volumétricos de 10,00 mL foram adicionadas quantidades de óleo essencial variando entre 5 a 30 mg contendo α -bisabolol (considerando o meio da curva em relação a quantidade de α -bisabolol), 500 μ L da solução estoque de octadecano em diclorometano a 20,0 mg mL⁻¹ e o volume final foi completado para 10,00 mL usando o mesmo solvente. As amostras foram analisadas em triplicata nas condições previamente descritas.

Padronização externa (CG-PE)

Uma curva analítica foi construída para α -bisabolol com concentrações variando de 0,050 a 1,20 mg mL⁻¹ (n = 8 pontos) preparadas a partir da solução estoque de 9,6 mg mL⁻¹ de α -bisabolol em diclorometano. A equação da curva

analítica ($y = 301,29x - 17580$; $r = 0,9960$) foi obtida da área vs. concentração do analito (em mg mL^{-1}).

As amostras de óleo essencial foram preparadas como descrito para o procedimento de padronização interna mas, sem adição de octadecano. As amostras foram analisadas em triplicata nas condições previamente descritas.

3.3. Comparação entre os métodos de quantificação

A comparação entre os métodos (CG-N, RMN de ^1H e COSY) utilizados na quantificação de α -bisabolol nos óleos essenciais de candeia foi realizada por análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% (Oliveira, 2008).

3.4. Resultados e discussão

Até o momento, o método mais comumente utilizado para análise de misturas complexas de óleos essenciais é a cromatografia gasosa acoplada a detectores por ionização em chama e de espectrometria de massas (Barbosa *et al.*, 2008). Após o desenvolvimento do método de RMN de ^1H para quantificação de α -pineno (Cerceanu *et al.*, 2016a), um protocolo eficiente para quantificação de α -bisabolol em várias amostras de óleo essencial foi desenvolvido.

O método desenvolvido para quantificação de α -bisabolol usando RMN de ^1H foi baseado no guia de Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - DOQ-CGCRE-008 publicado pelo INMETRO, 2011, conforme exigido pela legislação brasileira. Uma vez que esta resolução não estabelece limites para avaliar os parâmetros de validação, a Resolução RE 899 - Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, aprovada pelo Conselho da ANVISA também foi utilizada.

3.4.1. Desenvolvimento e validação do método de RMN de ^1H

Inicialmente o RMN de ^1H do α -bisabolol puro foi obtido. Conforme esperado, sinais devido aos hidrogênios olefínicos foram observados em 5,36 ppm (H-3', simpleto largo), 5,13 ppm (H-5, tripleto complexo). Um simpleto em 1,10 ppm foi observado para a metila ligada ao C-1 (Figura 3.2). Os sinais para os demais hidrogênios apareceram como um multipeto entre 1,20-2,20 ppm. Assim,

em princípio, os três sinais discretos listados acima (5,36; 5,13 e 1,10 ppm) podem ser aplicados para fins de quantificação. O sinal em 1,10 ppm proporcionou melhor sensibilidade, ele é integrado para 3 hidrogênios, enquanto cada um dos outros dois sinais são integrados para 1 hidrogênio. No entanto, o sinal em 1,10 ppm é propenso a interferências de sinais de outros componentes.

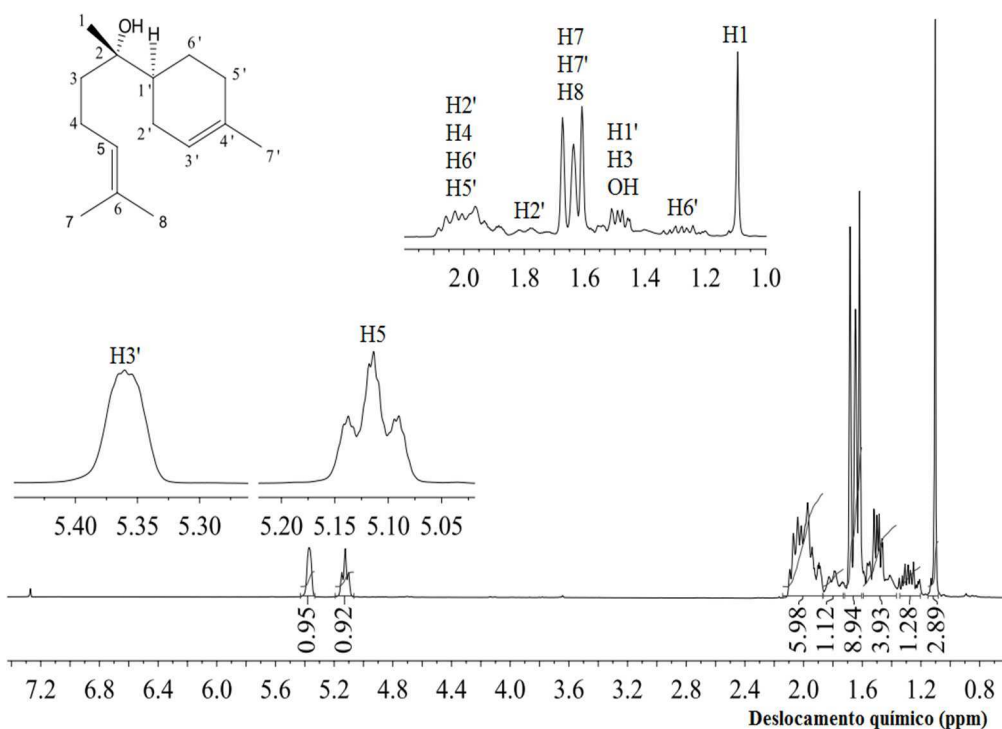


Figura 3.2. Espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol puro (300 MHz, em CDCl_3).

A especificidade e seletividade do método de RMN de ^1H foi comprovada pela ausência de sobreposição dos sinais do α -bisabolol com sinais do CDCl_3 e do OMCTS. Em sequência, será discutida a interferência dos sinais provenientes dos outros constituintes presentes nas amostras de óleos essenciais analisadas.

A linearidade do método foi avaliada para os sinais 5,36; 5,13 e 1,10 ppm (Figura 3.3). Para todos esses sinais, o coeficiente de correlação obtido foi superior ao critério mínimo de aceitação exigido pela Resolução RE 899 ($r \geq 0,99$) (Figura 3.3).

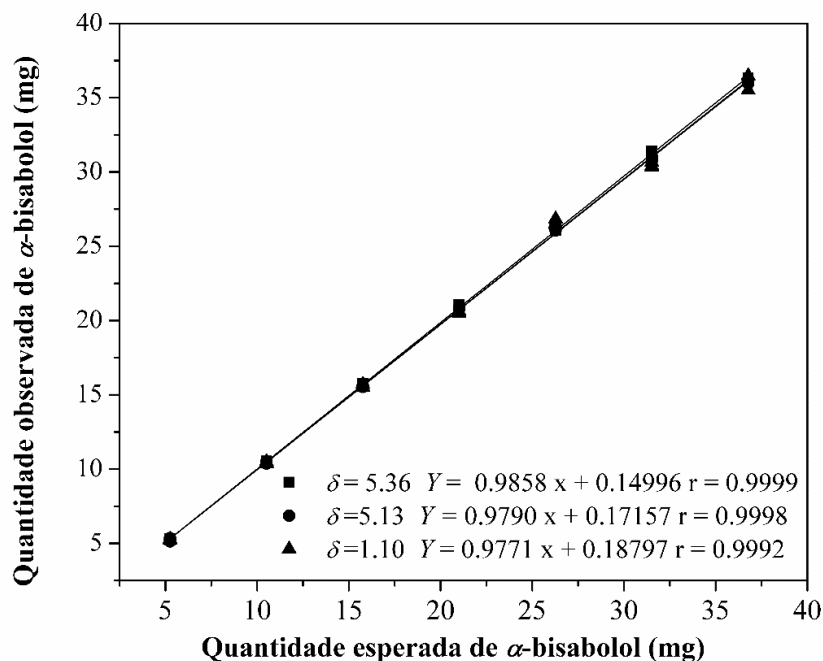


Figura 3.3. Curvas de linearidade da quantidade medida vs. quantidade esperada de α -bisabolol para os sinais em 1,10; 5,13, e 5,36 ppm obtidos do espectro de RMN de ^1H α -bisabolol.

Os valores de CV obtidos para os três sinais do espectro de α -bisabolol (de 0,26% em 5,36 ppm a 3,31% em 1,10 ppm) foram inferiores ao limite máximo permitido pela Resolução RE 899 (%CV \leq 5,0) (ANVISA, 2003) provando a repetitividade do método desenvolvido.

A análise de um composto de pureza conhecida (α -bisabolol 95,5%), na qual a exatidão é a relação entre a pureza observada experimentalmente (PO) e a pureza esperada (PE), de acordo com a Equação 3.4, foi usada para avaliar a exatidão do método de RMN de ^1H .

A exatidão do método foi avaliada de acordo com a Norma Técnica Brasileira NBR 14029 (ABNT, 2005), uma vez que a resolução RE-899 não estabelece limites que definem a exatidão de um método. Segundo a NBR 14029, um método é considerado exato quando fornece resultados entre 98 e 102% de exatidão. Os resultados obtidos para os sinais avaliados (5,36; 5,13 e 5,10 ppm) do espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol foram considerados satisfatórios para a maioria dos testes realizados nas diferentes quantidades de α -bisabolol, conforme a NBR 14029. No entanto, houve uma pequena extrapolação dos valores estabelecidos pela NBR-14029 (limites inferior e superior de 96,63% em 1,10 ppm

e de 102,77% em 5,36 ppm, respectivamente – Ver dados suplementares 2, Tabelas S2.7 a S2.9).

A reprodutibilidade do método de RMN de ^1H foi confirmada por testes realizados nos laboratórios de ressonância magnética nuclear da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e da Universidade Federal de Viçosa (UFV) usando os espectrômetros Bruker AVANCE III 400 MHz e Varian Mercury 300 MHz, respectivamente.

Embora as amostras tenham sido preparadas e analisadas por equipes diferentes, em locais diferentes, utilizando equipamentos distintos (Ribani *et al.*, 2004), a percentagem de α -bisabolol determinada nos laboratórios da UFV e da UFSCar foi similar (Tabela 3.1), comprovando a reprodutibilidade do método de RMN de ^1H desenvolvido. Além disso, foram obtidos baixos coeficientes de variação em todas as amostras avaliadas em ambos os laboratórios (CVs de 0,22; 0,18 e 0,13% para as amostras de óleos essenciais E10, E11 e α -bisabolol (95,5%), respectivamente (Tabela 3.1)).

Tabela 3.1. Percentagem de α -bisabolol determinada pelos espectrômetros Varian Mercury 300 MHz e Bruker 400 MHz.

Equipamento	α -Bisabolol* (%)	E10 (%)	E11 (%)
300 MHz	95,63 \pm 0,41	98,40 \pm 0,37	98,56 \pm 0,27
400 MHz	95,32 \pm 0,20	98,58 \pm 0,54	98,82 \pm 0,46
CV (%)	0,22	0,18	0,13

* Amostra padrão de α -bisabolol adquirido da Sigma Aldrich; CV = Coeficiente de variação.

A estabilidade do analito e do padrão interno em solução foi avaliada usando os sinais em 5,36; 5,13 e 1,10 ppm (aproximadamente 20 mg de α -bisabolol) obtidos a 25 °C nos intervalos de 0 (inicial), 6, 12, 18 e 24 horas.

As soluções foram consideradas estáveis uma vez que os valores de CV obtidos (de 0,07% após 24 horas a 0,71% após 12 horas, ambos em 1,10 ppm – Ver dados suplementares 2, Tabelas S2.10 a S2.11) foram inferiores ao limite máximo permitido pela Resolução RE 899 (%CV \leq 5,0).

De acordo com Malz e Jancke (2005), para alcançar uma certeza de 1% em uma quantificação usando RMN a razão sinal ruído deve ser de pelo menos

150. Assim, para os sinais em 5,36 e 5,13 ppm do espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol foram obtidos valores de LQ de 2,59 mg e de LD de 0,26 mg com S/R próximas a 150 e 10, respectivamente. Para o sinal em 1,10 ppm foram encontrados LQ de 0,51 mg e LD de 0,10 mg, com razões S/R próximas a 264 e 22, respectivamente. Os valores encontrados são consistentes, uma vez que o grupo metila (1,10 ppm) é mais facilmente detectado e quantificado do que os outros sinais.

Os valores de LD e de LQ obtidos indicam que uma amostra de óleo essencial de 35 mg deve conter pelo menos 0,74% (m/m) de α -bisabolol para que este constituinte seja detectado, usando os sinais em 5,36 e 5,13 ppm, no espectro de RMN de ^1H do óleo. Além disso, 7,40% (m/m) de α -bisabolol deve estar presente na amostra para permitir uma quantificação adequada usando ambos os sinais. Para o sinal em 1,10 ppm, o óleo deve conter pelo menos 0,29% (m/m) e 1,46% (m/m) de α -bisabolol para que ele seja detectado e quantificado, respectivamente.

A exatidão da quantificação de α -bisabolol é altamente dependente da integração dos sinais que depende da correção de fase do espectro. A correção de fase feita automaticamente pelo equipamento resultou em um maior erro para a integração da área do sinal. Portanto, uma correção de fase manual refinada é necessária para resultados exatos. Em trabalho anterior, foram encontrados resultados semelhantes para a análise de α -pineno em vários óleos essenciais (Cerceanu *et al.*, 2016a).

Além disso, experimentos de validação foram realizados usando solvente estocado em geladeira para preparar soluções estoque. A quantidade de analito detectada é inferior a esperada (erros acima de 10%) nas análises devido à contração do solvente. Assim, o solvente usado para preparar essas soluções deve estar à temperatura ambiente (Zholonko e Tsibulin, 2003).

3.4.2. Quantificação de α -bisabolol em óleos essenciais de candeia

Tendo desenvolvido as condições experimentais para a análise quantitativa de α -bisabolol utilizando espectroscopia de RMN de ^1H , diferentes amostras de óleos essenciais de *E. erythropappus* (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10 e

E11) foram submetidas à análise por RMN de ^1H como ilustrado por alguns espectros representativos mostrados na Figura 3.4.

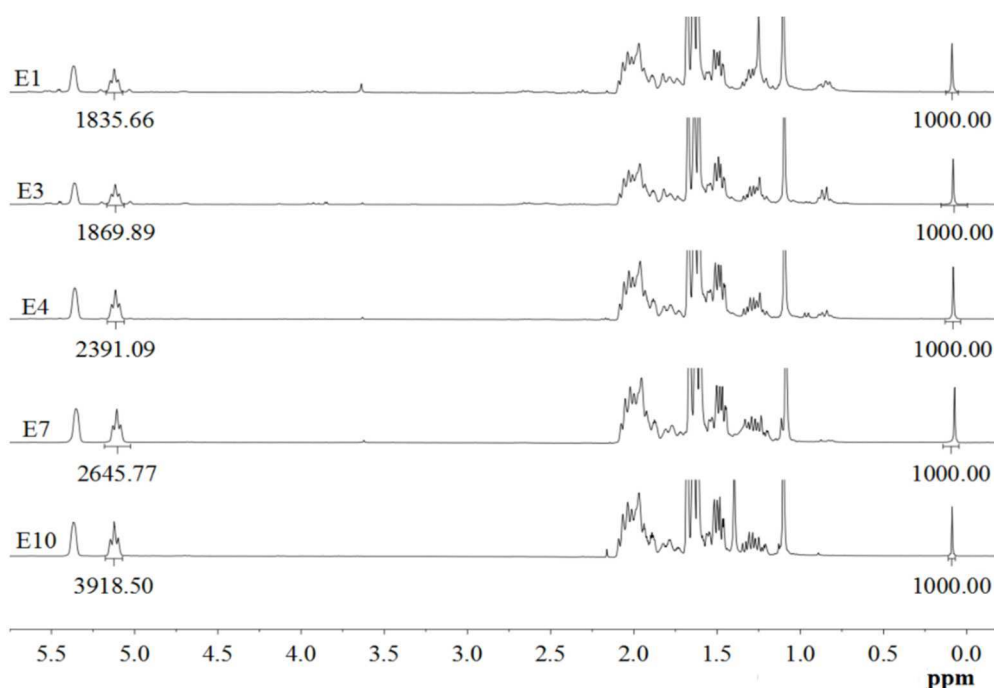


Figura 3.4. Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) representativos das amostras de óleo essencial de *E. erythropappus* (E1, E3, E4, E7 e E10). Os números embaixo de cada sinal são os valores das integrais e foram usados para quantificar α -bisabolol em cada uma das amostras.

Os óleos essenciais também foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) a fim de identificar todos os compostos presentes. Além disso, a quantificação dos componentes por cromatografia usando detector por ionização em chamas (CG-DIC) foi realizada, usando o procedimento de normalização de área (CG-N). Os resultados das análises indicaram que o conteúdo de α -bisabolol variou de 79 a 98% (Figuras 3.5 e 3.6) e que as amostras E3, E6, E8 e E9 têm uma maior variedade de compostos em comparação com os outros óleos analisados (Dados suplementares 2, Tabelas S2.22 e S2.23). As estruturas dos constituintes das amostras constam na Figura S2.1, dados suplementares 2.

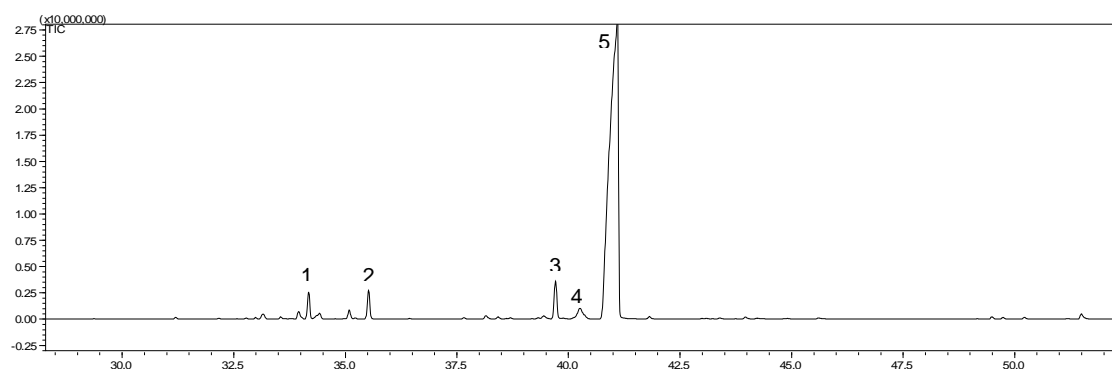


Figura 3.5. Cromatograma do óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* (E6): **1:** *Z*- α -bisaboleno (2,63%); **2:** *E*- α -bisaboleno (2,50%); **3:** óxido de α -bisabolol B (2,68%); **4:** não identificado (1,78%); **5:** α -bisabolol (79,23%).

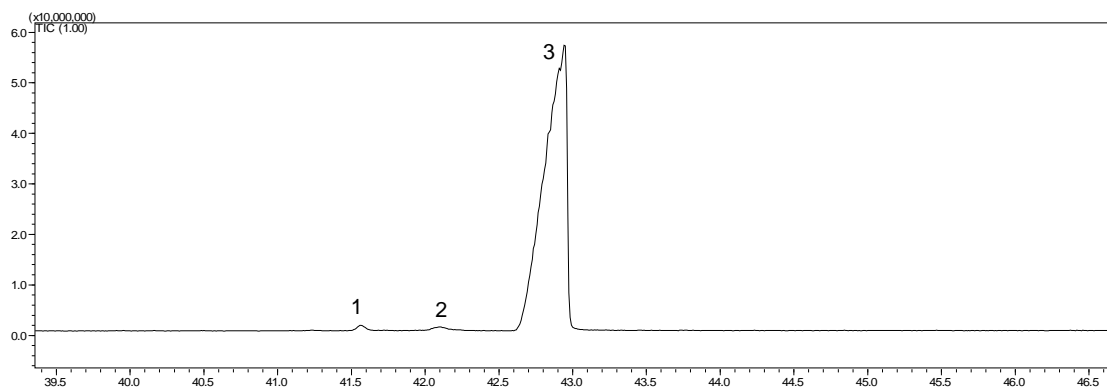


Figura 3.6. Cromatograma do óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* (E11): **1:** óxido de α -bisabolol B (1,82%); **2:** não identificado (0,80%); **3:** α -bisabolol (97,38%).

Resultados obtidos na quantificação de α -pineno em óleos essenciais previamente publicados (Cerceanu *et al.*, 2016a), confirmaram a similaridade entre os métodos cromatográficos usando padronização interna (CG-PI) e externa (CG-PE) para quantificação de óleos essenciais. Assim, as amostras comerciais E10 e E11 foram selecionadas aleatoriamente e o conteúdo de α -bisabolol nestes óleos foi determinado por CG-PE e CG-PI.

A razão de 1:1:3 para a área dos sinais em 5,36; 5,13 e 1,10 ppm de α -bisabolol no RMN de ^1H para os óleos essenciais em estudo é um indicativo de seletividade (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012). A razão de 1:1:3 indica a não

sobreposição destes sinais com os sinais de outros constituintes presentes na amostra.

Para a maior parte dos óleos essenciais (exceto E6, E8 e E9), o sinal em $\delta = 5,13$ foi sempre de menor intensidade que os sinais em $\delta = 5,36$ e $1,10$, sugerindo que ele não estivesse sobreposto com sinais de outros constituintes. Portanto, o sinal em $5,13$ ppm foi usado para quantificação de α -bisabolol pelo método de RMN de ^1H desenvolvido (Figura 3.4). Os resultados obtidos por RMN de ^1H foram comparados aos obtidos pelos métodos cromatográficos (CG-N, CG-PI e CG-PE) e foram satisfatórios para a maioria dos óleos analisados, exceto para E6, E8 e E9, nas quais o teor de α -bisabolol foi superestimado (Figura 3.7, ver também Tabela S2.21, dados suplementares 2).

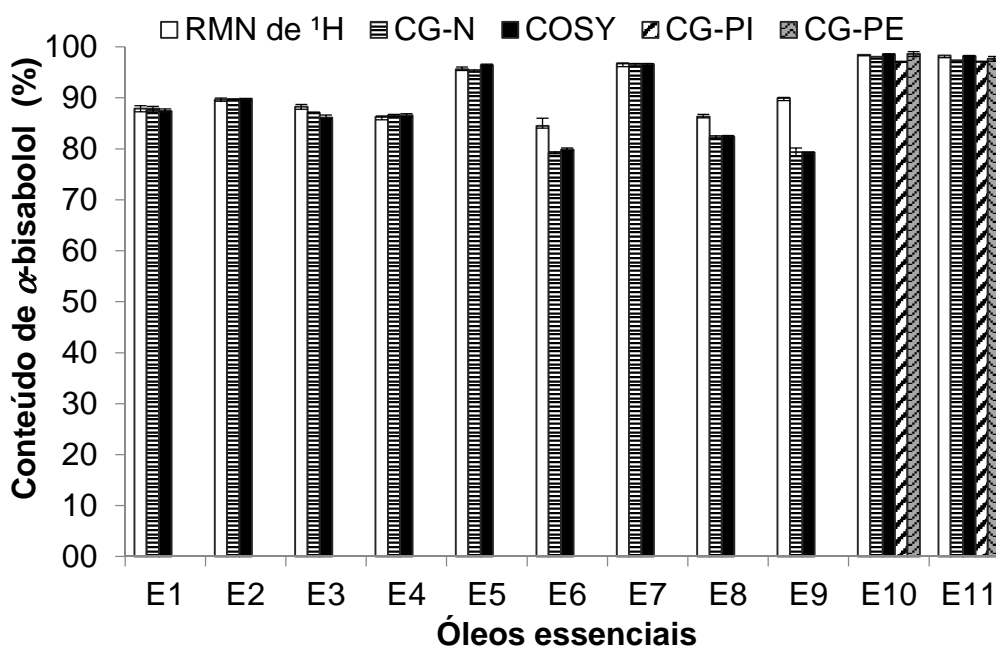


Figura 3.7. Conteúdo (%) de α -bisabolol para os óleos essenciais medidos por RMN de ^1H usando o sinal $\delta = 5,13$; COSY e cromatografia gasosa usando normalização (CG-N). Além das técnicas citadas, as amostras E10 e E11 também foram analisadas por cromatografia gasosa utilizando padronização externa (CG-PE) e interna (CG-PI). O símbolo \perp contido em cada barra representa o desvio padrão.

A especificidade do sinal em $\delta = 5,13$ no espectro de RMN de ^1H foi confirmada pelos experimentos de espectroscopia de correlação homonuclear (COSY) (Holzgrabe, 2010). Para amostra E9, como mostrado na Figura 3.8, a

presença dos picos de correlação em 5,13 x 2,06 ppm para α -bisabolol (B) e 5,13 x 2,69 ppm (C) para outro constituinte confirmam a sobreposição do sinal em 5,13 ppm. A mesma sobreposição de sinal foi observada para E6 e E8. Isso explica o valor superestimado de α -bisabolol determinado por RMN de ^1H em relação a CG-N para estas amostras. Para as demais amostras, conforme representado na Figura 3.8 para E1, o pico de correlação (C) no mapa de contorno de COSY para o sinal em 5,13 ppm do α -bisabolol não foi observado.

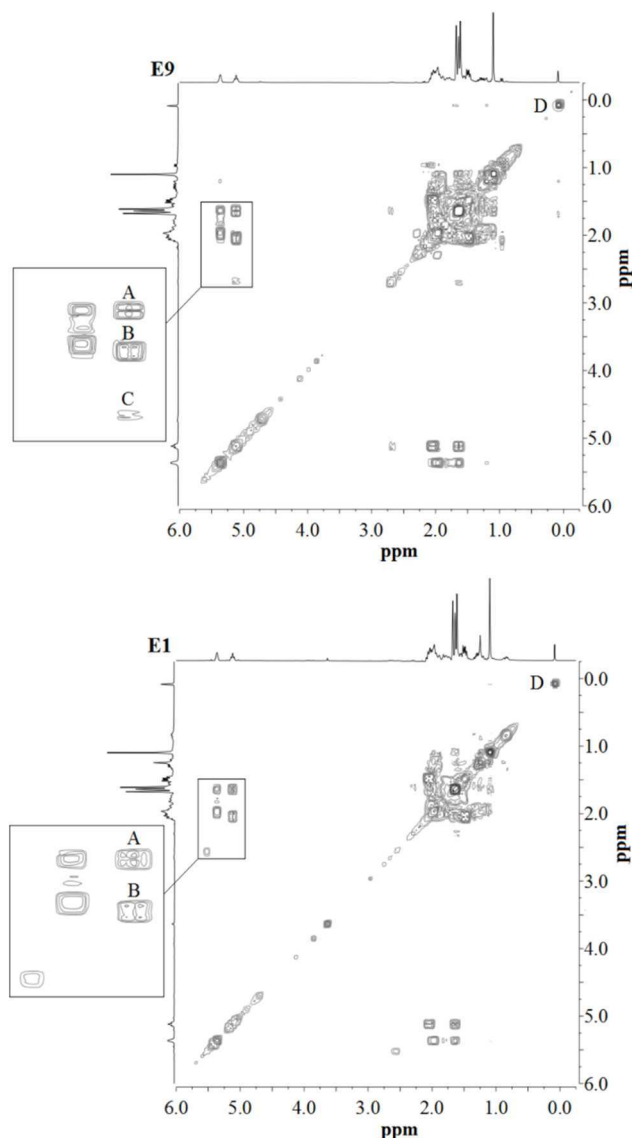


Figura 3.8. Mapa de contorno do COSY (300 MHz, em CDCl_3) representativo das amostras de óleo essencial de *E. erythropappus* sem e com ocorrência de sobreposição de sinais, respectivamente, E1 e E9. A região de interesse foi ampliada. A mancha C corresponde à correlação entre o H5 do α -bisabolol (5,13 ppm) e o hidrogênio (2,69 ppm) de um outro composto do óleo essencial.

Considerando o conteúdo superestimado de α -bisabolol para os óleos E6, E8 e E9 determinados por RMN de ^1H , todas as amostras de óleos essenciais foram também analisadas usando COSY (Dufour *et al.*, 2015).

Uma curva analítica foi construída para quantificação dos óleos essenciais usando COSY. Como apresentado na Figura 3.8, o pico da diagonal (D) no COSY para o padrão interno OMCTS (0,10 ppm) foi integrado e atribuído o valor de 1000 usando o programa MestReNova. Então, a área do pico de correlação em 5,13 x 2,06 ppm (B) do α -bisabolol, obtida nos espectros das soluções de α -bisabolol em CDCl_3 em diferentes concentrações, foi integrada e os valores obtidos foram usados para plotar a curva. O pico (B) foi escolhido porque é mais sensível (tem maior área) que o pico de correlação (A) na Figura 3.8. A equação da curva analítica ($Y = 10,123X + 0,92$ $r = 0,9995$) foi obtida plotando a área do pico de correlação 5,13 x 2,06 ppm do α -bisabolol (B na Figura 3.8) vs. massa de α -bisabolol (em mg). A massa de α -bisabolol (em mg), para cada amostra de óleo essencial foi obtida substituindo o valor da área do pico de correlação acima mencionado na equação da curva analítica.

O método de RMN de ^1H foi eficiente para quantificação de α -bisabolol na maior parte dos óleos essenciais avaliados (73%), apresentando desvios padrão inferiores a 0,60%, com exceção das amostras E6, E8 e E9, nas quais o teor deste constituinte foi superestimado devido a sobreposição do sinal em 5,13 ppm. Para estas amostras, o experimento de COSY proporcionou resultados satisfatórios com desvio padrão inferior a 0,30% (Figura 3.7).

Os dois métodos de RMN usados na quantificação de α -bisabolol são extremamente rápidos quando comparados ao tradicional método cromatográfico. A quantificação de α -bisabolol usando CG-N foi realizada em 70 min, enquanto as quantificações por RMN de ^1H e COSY foram realizadas em 10 e 16 min, respectivamente. Entretanto, o COSY exige uma etapa adicional quando comparado aos métodos de RMN de ^1H e de CG-N, que é a construção de curva analítica.

A similaridade dos resultados obtidos usando cromatografia gasosa (CG-N), RMN de ^1H e COSY foi confirmada pelas análises de variância usando teste de Tukey (compara a média dos três métodos entre si) com 95% de confiança. Os resultados obtidos usando RMN de ^1H para as amostras nas quais haviam sinais

coincidentes (E6, E8 e E9) não foram levados em conta para a avaliação estatística. Portanto, estatisticamente todos os métodos são similares.

3.5. Determinação dos interferentes do método de RMN de ^1H – $\delta = 5,13$

Para identificar os possíveis constituintes dos óleos E6, E8 e E9 que se sobrepõem com o sinal $\delta = 5,13$ do α -bisabolol no espectro de RMN de ^1H , os deslocamentos químicos dos compostos com teores acima de 0,90% foram avaliados. A Figura 3.9, que possibilita visualizar o intervalo de 0 a 5,5 ppm empregado para quantificação de α -bisabolol nos óleos essenciais de candeia, foi construída a partir da análise destes deslocamentos químicos, obtidos da literatura (Zangh *et al.*, 2015; Azarken *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 1996; Miyzawa *et al.*, 1995; Ming *et al.*, 1989; Vichnewski *et al.*, 1977; Crawford *et al.*, 1971; Andersen e Syrdal, 1970; Dосkotch e El-Feraly, 1970).

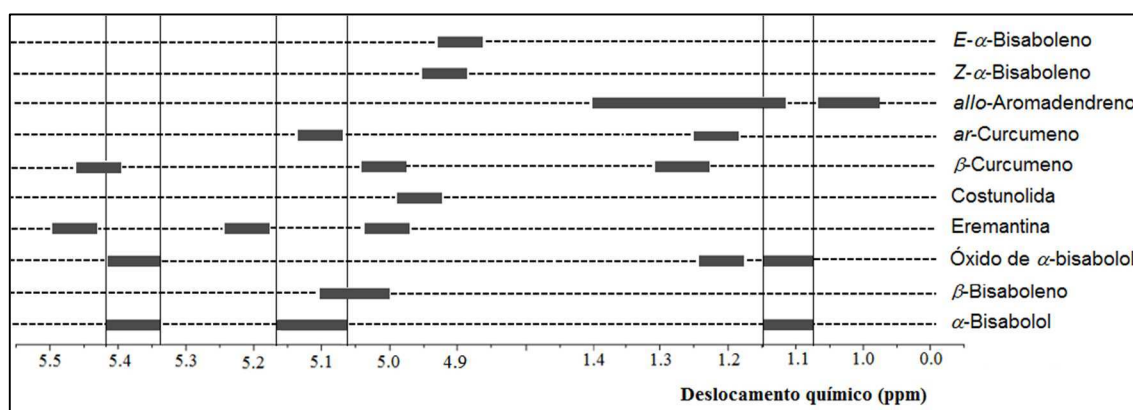


Figura 3.9. Deslocamentos químicos dos constituintes dos óleos essenciais de candeia com conteúdo acima de 0,90% (0-5,5 ppm, com cortes).

Analisando a Figura 3.9 é possível observar que o teor superestimado de α -bisabolol determinado por RMN de ^1H usando o sinal $\delta = 5,13$ pode ser devido à sobreposição com sinais dos compostos *ar*-curcumeno e β -bisaboleno. De fato, o óleo E6 contém tanto *ar*-curcumeno como β -bisaboleno, enquanto E8 e E9 não apresentam *ar*-curcumeno em sua composição. Além disso, esses dois compostos não fazem parte da constituição dos demais óleos essenciais avaliados (Tabelas S2.22 e S2.23, Dados Suplementares 2).

Entretanto, caso os compostos *ar*-curcumeno e β -bisaboleno sejam responsáveis pela sobreposição de sinais na amostra E6, a subtração entre o percentual de α -bisabolol obtido por RMN de ^1H ($84,51\% \pm 1,51\%$), diminuído do teor deste composto determinado por CG-N ($79,23\% \pm 0,21\%$), e a soma dos teores de *ar*-curcumeno ($0,99\% \pm 0,00$) e de β -bisaboleno ($0,90\% \pm 0,00\%$) obtidos por CG-N deverá resultar em valores próximos a zero. Também, se a sobreposição de sinais em 5,13 ppm na amostra E8 fosse devida ao β -bisaboleno, a subtração entre o percentual de α -bisabolol obtido por RMN de ^1H ($86,35\% \pm 0,40\%$), diminuído do teor deste composto determinado por CG-N ($82,26\% \pm 0,32\%$), e o teor de β -bisaboleno ($0,90\% \pm 0,00\%$) obtido por CG-N resultaria em valores próximos a zero. Da mesma forma, se β -bisaboleno fosse responsável pela sobreposição de sinais em 5,13 ppm na amostra E9, a subtração entre o percentual de α -bisabolol obtido por RMN de ^1H ($89,93\% \pm 0,40\%$), diminuído do teor deste composto determinado por CG-N ($79,38\% \pm 0,80\%$), e o teor de β -bisaboleno ($2,73 \pm 0,13$) obtido também por CG-N seria um valor próximo a zero. Entretanto, os resultados destas subtrações foram de 3,39%, 2,33% e 7,82% nas amostras E6, E8 e E9, respectivamente. Os dados utilizados nos cálculos foram retirados das Tabelas S2.21-S2.23, Dados Suplementares 2.

Dessa forma, é possível constatar que β -bisaboleno presente nas amostras E6, E8 e E9, assim como *ar*-curcumeno presente no óleo E6, são interferentes do método de RMN de ^1H desenvolvido para determinação de α -bisabolol em óleo de candeia. Isso porque que esses compostos apresentam sinais que se sobrepõem com o sinal em 5,13 ppm usado para quantificação do α -bisabolol. Entretanto, existem outros fatores que também interferem no método de RMN de ^1H que não foram identificados.

3.6. Conclusão

O método de RMN de ^1H desenvolvido para quantificação de α -bisabolol em óleo essencial de candeia mostrou-se adequado para 73% dos óleos avaliados (E1, E2, E3, E4, E5, E7, E10 e E11). Estes óleos têm um menor número de componentes e, por conseguinte, o sinal em $\delta = 5,13$ do α -bisabolol

não está sobreposto com sinais provenientes dos outros constituintes no espectro de RMN de ^1H dos óleos essenciais.

No entanto, 27% dos óleos avaliados (E6, E8 e E9) têm um maior número de constituintes e a ocorrência de sobreposição do sinal do α -bisabolol usado para quantificação com sinais de *ar*-curcumeno (E6) e de β -bisaboleno (E6, E8 e E9) presentes nestes óleos, além de outros fatores não identificados, fazem com que o teor de α -bisabolol seja superestimado pelo método de RMN de ^1H . Nestes casos, o COSY pode ser utilizado como uma alternativa rápida e eficiente, para a quantificação de α -bisabolol em óleos essenciais de candeia, atingindo resultados semelhantes aos obtidos pelos métodos cromatográficos tradicionais.

CAPÍTULO 4

UM MÉTODO DE RMN DE ¹H QUANTITATIVO PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE CITRONELAL, DE CITRONELOL E DE GERANIOL EM ÓLEOS ESSENCIAIS COMERCIAIS DE *Cymbopogon ssp.*

RESUMO

Um método simples, rápido e eficiente para quantificação simultânea de citronelal, de citroneolol e de geraniol em óleo essencial comercial de citronela usando RMN de ¹H foi desenvolvido e validado. Os resultados obtidos foram comparados aos tradicionais métodos de cromatografia gasosa. Todos os parâmetros avaliados (seletividade, linearidade, exatidão/precisão, repetitividade, robustez e estabilidade do analito e do padrão interno em solução) mostraram resultados satisfatórios. Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey mostraram que os resultados obtidos pelo método de RMN de ¹H são semelhantes aos obtidos por CG-DIC utilizando padronização interna (PI) e normalização de áreas (N), com 95% de confiança. Entretanto, para algumas amostras, pequenas diferenças foram encontradas quando o conteúdo de citronelal e de geraniol foram determinados por CG-N em comparação com os resultados obtidos por CG-PI e por RMN de ¹H. Essas diferenças mostram o quanto o CG-N depende dos parâmetros definidos para integração. A quantificação de geraniol usando RMN de ¹H deve ser realizada usando o sinal em $\delta = 4,13$, pois o sinal em $\delta = 5,36-5,42$ se sobrepõe com sinais de outros constituintes nos óleos. Além disso, uma amostra de citronelal que foi submetida a um experimento de degradação sob atmosfera de oxigênio e temperatura de 55 °C durante 48 h foi analisada com sucesso pelo método da RMN de ¹H. É possível diferenciar um óleo essencial de citronela puro dos formulados por meio da densidade relativa e do índice de refração dos óleos, com base nos limites estabelecidos pela Farmacopeia Britânica. Nenhum dos óleos puros avaliados apresentou simultaneamente os teores de citronelal, de citroneolol e de geraniol de acordo com os padrões de qualidade desta farmacopeia.

4.1. Introdução

Citronela é um nome popular de uma planta aromática e medicinal pertencente ao gênero *Cymbopogon*, membro de *Poncaeae* (Marco *et al.*, 2007), que compreende aproximadamente 500 gêneros e 8.000 espécies de plantas (Barbosa *et al.*, 2008). Os óleos essenciais extraídos das espécies *C. nardus* (citronela de Ceilão) e *C. winterianus* (citronela de Java) apresentam atividade repelente de insetos e ação fungicida e bactericida (Silveira *et al.*, 2012). Os terpenóides citronelal, citronelol, geraniol, linalol e citral (Figura 4.1) são isolados deste óleo e empregados industrialmente como fragrâncias e em cosméticos (Silva-Santos *et al.*, 2006). Além disso, citronelol tem atividade acaricida e antimicrobiana e é também utilizado na aromatização de ambientes (Castro *et al.*, 2010). Pesquisas realizadas no mercado europeu mostraram que o geraniol está presente na maior parte dos desodorantes avaliados (76%), em produtos domésticos (41%) e em cosméticos com ingredientes naturais (33%) (Chen e Viljoen, 2010).

Numerosas doenças tropicais, como malária, filariase, dengue, encefalite japonesa e febre amarela são transmitidas aos seres humanos por mosquitos. O óleo essencial de citronela, no qual citronelal é um dos principais constituintes, é usado como repelente para combater estes vetores em concentrações de até 15% (m/v) (Yang e Ma, 2005; Solomon *et al.*, 2014).

A importância econômica do óleo de citronela é devido à sua crescente demanda tanto no mercado interno quanto no externo (Marco *et al.*, 2008). Nos anos de 2015 e de 2016 o Brasil exportou mais de 600 Kg de óleo essencial de citronela para Paraguai, Alemanha, Argentina, Estados Unidos, Cingapura e Suíça (Aliceweb, 2017).

O valor dos óleos essenciais comerciais varia de acordo com o conteúdo de seus constituintes majoritários (Cerceanu *et al.*, 2016b; Barbosa *et al.*, 2016). Conforme a Farmacopeia Britânica, um óleo de citronela de qualidade deve conter citronelal (30 a 45%), geraniol (20 a 25%) e citronelol (9 a 15%) como constituintes majoritários (British Pharmacopeia, 1998).

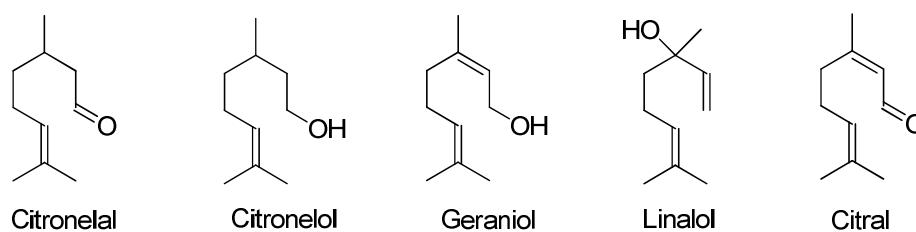


Figura 4.1. Estrutura química dos principais monoterpenos presentes no óleo de citronela.

Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa com detecção por ionização em chamas (CG-DIC) são as técnicas mais utilizadas para análises qualitativas e quantitativas de óleos essenciais (Cerceanu *et al.*, 2016a; Cerceanu *et al.*, 2016b). Apesar de CG ser uma técnica muito sensível, é demorada, requer seleção de colunas e pode apresentar problemas relacionados à sobreposição de picos cromatográficos (AbouZid, 2016).

Embora a técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) seja usada com sucesso para controle de qualidade de produtos diversificados (alimentos, bebidas, café, chás, gasolina, azeite, produtos naturais, metabólômicas, entre outros), ainda existem poucos estudos que relatam o uso da RMN ^1H para quantificação de constituintes majoritários de óleo essencial (Cerceanu *et al.*, 2016b). Isso porque, apesar de RMN de ^1H ser uma técnica de quantificação rápida, quando a matriz avaliada é composta por um grande número de constituintes pode haver sobreposição de sinais (Cerceanu *et al.*, 2016b). Os poucos relatos na literatura sobre análises quantitativas de óleos essenciais usando RMN de ^1H incluem: α -bisabolol (Figura 4.2) em óleo de *Eremanthus erythropappus* (Cerceanu *et al.*, 2016b), α -pineno (Figura 4.2) em óleo de *Eucalyptus*, *Corymbia*, pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*) e em derivados de terebintina (Cerceanu *et al.*, 2016a), *trans*-anetol (Figura 4.2) em *Foeniculum vulgare* (AbouZid, 2016) e lactonas sesquiterpênicas em *Inula racemosa* e em *Saussurea lappa* (Choudhary *et al.*, 2016). Além disso, Rivero-Cruz e colaboradores (2006), relataram o uso de RMN de ^1H para quantificação de 2,6-dimetoxibenzoato de benzil, 2'-metoxibenzoato de 2-hidroxibenzil, chamazuleno, β -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno e β -eudesmol (Figura 4.2) em óleo essencial de *Brickellia Weronicaefolia*.

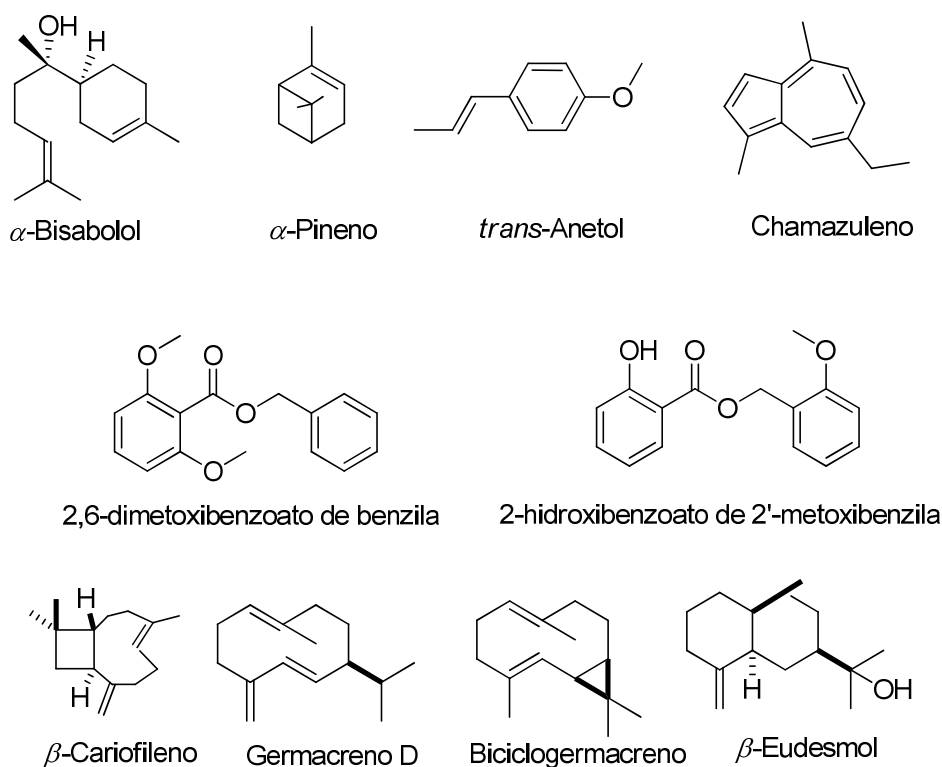


Figura 4.2. Terpenos quantificados em óleos essenciais usando RMN de ^1H .

Durante o armazenamento, transporte ou uso, os óleos essenciais podem ser expostos a fatores como calor, luz e oxigênio atmosférico. Tais condições podem causar degradação dos constituintes dos óleos através da oxidação, desidrogenação, isomerização, reações de polimerização, ou mesmo por meio de rearranjos térmicos (Turek e Stintzing, 2013). Essas modificações geralmente afetam a qualidade desses óleos, comprometendo suas propriedades organolépticas, padrões de toxicidade ou sua aplicabilidade farmacológica. Por outro lado, alguns dos produtos originados da degradação dos óleos essenciais podem ter propriedades e aplicabilidades interessantes (Beltrame *et al.*, 2013).

Apesar da importância econômica dos óleos de citronela, não foram encontrados estudos sistemáticos relacionados à degradação de seus principais componentes (citronelal, citronelol e geraniol) na literatura. Os poucos estudos encontrados incluem o uso de citronelol e de geraniol como fontes de carbono pelas bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas citronellolis* e *Pseudomonas mendocina*, levando à oxidação desses álcoois em seus respectivos aldeídos e ácidos (citronelal, ácido citronélico, geraniol e ácido

gerânico – Figura 4.3) (Höschle e Jendrossek, 2005). Além disso, Tozoni e colaboradores (2010) também relataram a formação de ácido citronélico na degradação de citronelal por *Pseudomonas mendocina*.

Considerando as inúmeras aplicações para o óleo essencial de citronela e o crescimento dos requisitos de exportação (Lubbe e Verpoorte, 2011), o desenvolvimento de métodos simples, rápidos e eficientes para avaliar a qualidade destes óleos é necessário. Além disso, estudos sobre a degradação dos constituintes majoritários dos óleos de citronela podem gerar informações de grande relevância para o controle de qualidade destes óleos.

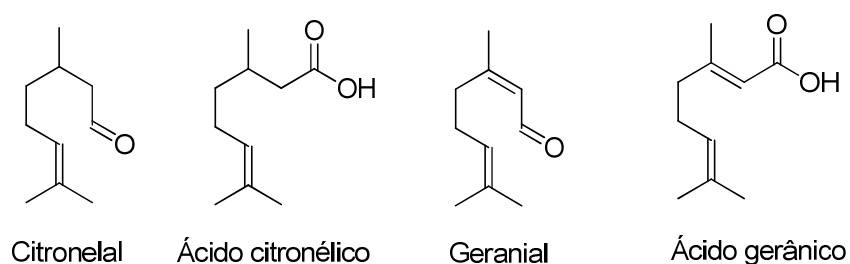


Figura 4.3. Estrutura química dos compostos formados na decomposição dos constituintes majoritários do óleo essencial de citronela (citronelal, citronelol e geraniol) relatados na literatura.

4.2. Experimental

4.2.1. Materiais e reagentes

Octametilciclotetrasiloxano (98%), citronelal (96%), citronelol (95%), geraniol (97%) e clorofórmio deuterado foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Wisconsin, USA). Diclorometano e acetato de etila foram comprados da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

Seis amostras de óleos essenciais de *Cymbopogon nardus* (C1, C2, C4, C5, C6 e C7) e duas de *Cymbopogon winterianus* (C3 e C8) de diferentes marcas e três óleos formulados (C9, C10 e C11) foram obtidas no mercado local, no Brasil.

Todas as pesagens foram realizadas em uma balança analítica Shimadzu (capacidade de 82 / 220 g e precisão de 0,1 mg / 0,01 mg). As transferências de volume foram feitas usando seringas cromatográficas de 500 μ L e de 5,00 mL.

Frascos com tampas de 10,0 mL e de 2,00 mL e tubos de RMN com diâmetro externo de 5 mm foram utilizados em todos os experimentos.

4.2.2. Determinação da densidade relativa, do índice de refração e da rotação óptica dos óleos essenciais

Densidade relativa

A densidade relativa de óleos essenciais puros e dos produtos formulados foi determinada pelo método da pipeta automática (Pavia *et al.*, 2012). A massa de dez frascos cônicos (incluindo suas tampas e forros) previamente limpas foi determinada. Usando uma pipeta automática, 100 μL de óleo essencial foram adicionados a cada um desses frascos e, em seguida, os frascos foram fechados corretamente e a massa obtida foi registrada. O procedimento também foi realizado para determinar a densidade da água Mili-Q. A densidade de cada óleo essencial em relação à água foi obtida dividindo a densidade do óleo (g mL^{-1}) pela densidade da água (g mL^{-1}).

Índice de refração

Os índices de refração (nD) dos óleos essenciais foram determinados utilizando um refratômetro de bancada ABBE (Biobrix, modelo 2WAJ) com escala de refração variando de 1300 a 1720.

Para realizar as análises, duas gotas de óleo foram colocadas diretamente na lâmina do refratômetro com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Em seguida, a leitura dos índices de refração foram realizadas.

Rotação óptica

A rotação óptica dos óleos essenciais foi determinada utilizando um polarímetro digital (Bellingham Stanley, modelo ADP 220) com escala de rotação óptica variando de -85° a $+85^\circ$, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Massas de óleo essencial variando de 11 a 14 mg foram pesadas diretamente em balão volumétrico de 2,00 mL e o volume foi completado com acetato de etila. As medições foram realizadas em uma cubeta de 1,00 dm, usando $\lambda = 589,3$ nm. Os parâmetros (massa, concentração e temperatura) utilizados na análise de cada óleo essencial são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Parâmetros utilizados para determinar a rotação óptica dos óleos essenciais comerciais de citronela.

Amostra	m (mg)	Conc (g cm ⁻³)	Temp (°C)
C1	11,82	0,00591	23,8
C2	10,32	0,00516	23,6
C3	13,52	0,00676	23,8
C4	14,14	0,00707	23,3
C5	11,45	0,00572	23,9
C6	12,29	0,00614	23,3
C7	13,54	0,00677	23,3
C8	10,77	0,00538	22,9
C9	11,12	0,00556	23,4
C10	12,11	0,00605	23,5
C11	11,35	0,00567	23,5

m = massa, conc = concentração e temp = temperatura. C1, C2, C4-C7 (*C. nardus*); C3 e C8 (*C. winterianus*) e C9-C11 (óleos formulados).

4.2.3. Método de RMN de ¹H

Soluções

Solução estoque de octametilciclotetrasiloxano (OMCTS) em CDCl₃ (5,44 mg mL⁻¹) e solução estoque da mistura de citronelal (98,56 mg mL⁻¹), de citronelol (109,0 mg mL⁻¹) e de geraniol (108,0 mg mL⁻¹) em CDCl₃ foram preparadas para determinar linearidade, estabilidade de citronelal, de citronelol, de geraniol e de OMCTS em solução, e robustez do método.

Solução de OMCTS em CDCl₃ (5,59 mg mL⁻¹) e solução estoque da mistura de citronelal (104,0 mg mL⁻¹), de citronelol (111,0 mg mL⁻¹) e de geraniol (107,0 mg mL⁻¹) em CDCl₃ foram preparadas para determinar a repetibilidade e a exatidão/precisão do método.

Soluções estoque da mistura de citronelal (104,6 mg mL⁻¹), de citronelol (103,6 mg mL⁻¹) e de geraniol (101,8 mg mL⁻¹) em CDCl₃ e do padrão interno OMCTS em CDCl₃ (7,12 mg mL⁻¹) foram preparadas para determinar os limites de detecção e de quantificação.

Solução estoque do padrão interno OMCTS em CDCl_3 ($4,00 \text{ mg mL}^{-1}$) foi preparada para quantificação de citronelal, de citronelol e de geraniol nos óleos essenciais.

Para preparar todas as soluções, os óleos e reagentes foram pesados diretamente nos frascos e tampados com septos de teflon. Clorofórmio deuterado foi adicionado aos frascos utilizando seringa cromatográfica.

Instrumentação

Todas as análises foram realizadas em um espectrômetro Varian Mercury 300 MHz, equipado com uma sonda de dois canais (^1H - ^{13}C) de banda larga de 5 mm, unidade geradora de campo e unidade de controle de temperatura.

Condições experimentais

O pulso de 45° (pw45) foi determinado para todas as amostras usando a sequência de calibração implementada pelo programa VnmrJ4.2 da Agilent Technologies. O tempo de relaxação longitudinal (T_1) foi determinado pela sequência de inversão recuperação para todos os hidrogênios do citronelal, do citronelol, do geraniol e do padrão OMCTS. O mais longo T_1 obtido para validação e para quantificação das amostras de óleos essenciais foi de 7 s. Os experimentos foram realizados utilizando a temperatura da sonda de 25°C , número de transientes (nt) de 16, número de pontos no FID (np) de 32768, largura do pulso (pw) de 45° , sem rotação de amostra, largura espectral (sw) de 4800,8 Hz, tempo de aquisição (aq) de 4,555 s, tempo de atraso (d1) de 5 vezes T_1 entre os pulsos foi usado para garantir a relaxação completa dos átomos de hidrogênio (Caligiani *et al.*, 2007; Parikh e Gadape, 2011; Santos e Colnago, 2013). O *shimming* foi realizado no modo automático para todos os experimentos e a largura a meia altura do sinal do clorofórmio foi sempre inferior a 0,7 Hz.

A robustez do método foi avaliada pela aquisição de espectros com 16 scans (nt) a 25°C e com 8 scans, sem controle de temperatura.

Os espectros foram processados usando o programa MestReNova 9.0.1. com correção automática de linha de base empregando o ajuste polinomial de Bernstein e ampliação da linha espectral (lb) de 0,3 Hz. Correção de fase e integração dos espectros foram realizadas manualmente. O FID foi processado

usando 64 K e preenchimento com zeros (Forshed *et al.*, 2005; Parikh e Gadape, 2011).

Validação do método de RMN de ¹H

Para validação do método de RMN de ¹H desenvolvido, foram avaliados os parâmetros especificidade e seletividade, linearidade, robustez, repetibilidade, exatidão/precisão, estabilidade dos analitos e do padrão interno em solução e limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) (Parikh e Gadape, 2011; INMETRO, 2011; Bharti e Roy, 2012).

Especificidade, seletividade e linearidade

A especificidade e seletividade do método proposto foi avaliada pela ausência de sobreposição de pelo menos um sinal de citronelal, de citronelol e de geraniol com sinais dos outros constituintes do óleo essencial, do CHCl₃ (presente no solvente CDCl₃) e do padrão interno OMCTS no espectro de RMN de ¹H. A linearidade foi checada pela adição a 7 tubos de RMN de uma quantidade de citronelal, de citronelol e de geraniol variando de 5,0 a 35,0 mg. Os volumes da mistura de citronelal (98,56 mg mL⁻¹), de citronelol (109,0 mg mL⁻¹) e de geraniol (108,0 mg mL⁻¹) em CDCl₃ adicionados aos tubos foram de 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 µL que correspondem às massas de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 mg de citronelal, de citronelol e de geraniol. A cada um desses tubos, foram adicionados 250 µL (1,36 mg) da solução estoque de OMCTS em CDCl₃ a uma concentração de 5,44 mg mL⁻¹ e clorofórmio deuterado a 20 °C para completar o volume para 600 µL. Todas as transferências de volume foram realizadas usando seringas cromatográficas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os sinais em 9,75 e 3,61-3,74 ppm, do citronelal e do citronelol, respectivamente e, os sinais em 5,36-5,42 e 4,13 ppm do geraniol foram integrados e usados para fazer um gráfico no programa OriginPro8. Para cada um destes sinais, foi obtida uma curva de linearidade usando a quantidade de citronelal, de citronelol e de geraniol esperada (mg) *versus* a quantidade (mg) destes compostos obtida dos espectros de RMN de ¹H utilizando a Equação 4.1

(Parikh e Gadape, 2011; Santos e Colnago, 2013; Cerceau *et al.*, 2016a; Cerceau *et al.*, 2016b).

$$m_x = \frac{I_x}{I_{OMCTS}} \times \frac{N_{OMCTS}}{N_x} \times \frac{M_x}{M_{OMCTS}} \times m_{OMCTS} \quad (\text{Equação 4.1})$$

Onde, m_x = quantidade de citronelal, de citronelol ou de geraniol encontrada; M_x = massa molecular de citronelal ($154,25 \text{ g mol}^{-1}$), de citronelol ($156,27 \text{ g mol}^{-1}$) ou de geraniol ($154,25 \text{ g mol}^{-1}$); M_{OMCTS} = massa molecular do octametilciclotetrasiloxano ($296,62 \text{ g mol}^{-1}$); m_{OMCTS} = massa do octametilciclotetrasiloxano, I_x = área da integral do sinal no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação dos compostos citronelal ($\delta = 9,75$), citronelol ($\delta = 3,61-3,74$) ou geraniol ($\delta = 5,36-5,42$ e $\delta = 4,13$); I_{OMCTS} = 1000; N_{OMCTS} = número de átomos de hidrogênio presentes no octametilciclotetrasiloxano; N_x = número de átomos de hidrogênio que correspondem ao sinal no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação dos compostos citronelal, citronelol ou geraniol.

Robustez

A robustez foi avaliada pelos espectros de RMN de ^1H adquiridos com número de transiente (nt) de 16 e temperatura controlada a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e com nt de 8, sem controle de temperatura. A determinação da robustez do método foi realizada usando os tubos de RMN contendo aproximadamente 15 mg de citronelal, de citronelol e de geraniol, preparados para determinação da linearidade.

Os sinais em 9,75 e 3,61-3,74 ppm do citronelal e do citronelol, respectivamente, e os sinais em 5,36-5,42 e 4,13 ppm do geraniol foram integrados e os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), obtidos pela Equação 4.2 (Parikh e Gadape, 2011; Santos e Colnago, 2013; Cerceau *et al.*, 2016a; Cerceau *et al.*, 2016b).

$$DPR = CV = \frac{DP}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Equação 4.2})$$

Onde, DPR = desvio padrão relativo entre as massas, observado nas triplicatas, CV = coeficiente de variação, \bar{X} = média dos valores entre as massas observadas nas triplicatas, DP = desvio padrão entre as massas observadas nas triplicatas.

Os resultados obtidos nos espectros de RMN de ^1H adquiridos com nt de 16 e temperatura controlada a 25°C e com nt de 8, sem controle de temperatura foram comparados e a diferença entre eles foi expressa em percentagem (%D), conforme Equação 4.3 (Parikh e Gadape, 2011; Cerceau *et al.*, 2016a; Cerceau *et al.*, 2016b).

$$\%D = \frac{m_{xi} - m_{xt}}{m_{xi}} \times 100 \quad (\text{Equação 4.3})$$

Onde, %D = diferença em percentagem entre a massa observada no espectro adquirido usando nt = 16 e temperatura de 25 °C e a massa observada no espectro adquirido usando nt = 8, sem controle de temperatura; m_{xi} = massa observada no espectro adquirido usando nt = 16 e temperatura de 25 °C e m_{xt} = massa observada no espectro adquirido usando nt = 8, sem controle de temperatura.

Repetibilidade

A repetibilidade do método foi checada 15 dias após a determinação da linearidade pela realização de um experimento similar, pelo mesmo analista, usando o mesmo laboratório e equipamento. Os sinais em 9,75 e 3,61-3,74 do citrionelal e do citrionelol, respectivamente, e os sinais em 5,36-5,42 e 4,13 ppm do geraniol foram integrados para avaliação da repetibilidade do método e os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV).

Exatidão e estabilidade

A exatidão foi avaliada no mesmo experimento que a linearidade do método. O método analítico proposto para análise de um composto de pureza conhecida (citrionelal 96%, citrionelol 95% e geraniol 97%) foi usado. A pureza experimental (PE) foi calculada usando a Equação 4.4 e a exatidão usando a

Equação 4.5 (Parikh e Gadape, 2011; Santos e Colnago, 2013; Cerceau *et al.*, 2016a; Cerceau *et al.*, 2016b).

$$PE = \frac{I_x}{I_{OMCTS}} \times \frac{N_{OMCTS}}{N_x} \times \frac{M_x}{M_{OMCTS}} \times \frac{m_{OMCTS}}{m} \times P_{OMCTS} \quad (\text{Equação 4.4})$$

Onde: M_{OMCTS} = massa molecular de octametilciclotetrasiloxano ($296,62 \text{ g mol}^{-1}$); M_x = massa molecular do citronelal ($154,25 \text{ g mol}^{-1}$), do citronelol ($156,27 \text{ g mol}^{-1}$) ou do geraniol ($154,25 \text{ g mol}^{-1}$); m_{OMCTS} = massa de octametilciclotetrasiloxano (em g); I_x = área medida pela integração do sinal de interesse no espectro de RMN de ^1H do citronelal, do citronelol ou do geraniol; $I_{OMCTS} = 1000$; $N_{OMCTS} = 24$ (número de átomos de hidrogênio presentes no octametilciclotetrasiloxano); N_x = número de átomos de hidrogênio do sinal de interesse no espectro de RMN de ^1H do citronelal, do citronelol ou do geraniol; m = massa de citronelal, de citronelol ou de geraniol (em g); P_{OMCTS} = pureza do octametilciclotetrasiloxano (98%) informada pelo fabricante; PE = pureza calculada do citronelal, do citronelol ou do geraniol (em %m/m).

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{PE}{PF} \times 100 \quad (\text{Equação 4.5})$$

Onde: PE = pureza experimental; PF = pureza informada pelo fabricante.

A estabilidade dos analitos e do padrão interno em solução foi avaliada usando os tubos de RMN contendo aproximadamente 20 mg de citronelal, de citronelol e de geraniol (como descrito na determinação da linearidade). As análises foram realizadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ com intervalos de tempo de 0 (inicial), 6, 12, 18 e 24 horas. Os sinais em 9,75 e 3,61-3,74 ppm do citronelal e do citronelol, respectivamente, e os sinais em 5,36-5,42 e 4,13 ppm do geraniol foram integrados para determinação da quantidade destes compostos em cada intervalo de tempo, de acordo com a Equação 4.1. Os resultados foram expressos como coeficiente de variação (CV) e como %D.

Limites de quantificação e de detecção

Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) foram determinados experimentalmente. Volumes apropriados da solução contendo uma mistura de citronelal (98,09 mg mL⁻¹), de citronelol (103,6 mg mL⁻¹) e de geraniol (101,8 mg mL⁻¹) em CDCl₃ correspondendo a 0,10; 0,50; 1,00; 2,50 e 5,00 mg de citronelal, de citronelol e de geraniol foram adicionados aos tubos de RMN. A cada um desses tubos foram adicionados 250 µL (1,15 mg) da solução estoque de OMCTS em CDCl₃ na concentração de 4,6 mg mL⁻¹, seguido por clorofórmio deuterado a 20 °C para completar o volume para 600 µL. Os espectros de RMN de ¹H da mistura foram obtidos e os sinais em 9,75 e 3,61-3,74 ppm referentes ao citronelal e ao citronelol, respectivamente, e os sinais em 5,36-5,42 e 4,13 ppm correspondentes ao geraniol foram integrados em relação ao sinal do padrão interno (0,10 ppm) e a quantidade de citronelal, de citronelol e de geraniol contidas em cada tubo foi determinada conforme equação 4.1. Para determinação de LQ, a razão sinal ruído superior a 150 foi utilizada para garantir que os resultados fossem obtidos com uma incerteza menor que 1% (Holzgrave, 2010). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Quantificação de citronelal, de citronelol e de geraniol em óleos essenciais comerciais de citronela usando RMN de ¹H

Para quantificação, quantidades exatas (54,0 a 61,0 mg) de cada amostra de óleo essencial foi pesada diretamente nos tubos de RMN. A estes tubos foram adicionados 250 µL (1,00 mg) da solução estoque de OMCTS 4,00 mg mL⁻¹ e o volume foi completado para 600 µL pela adição de CDCl₃ a 20 °C. As amostras foram quantificadas em triplicata. Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos e o sinal do OMCTS (0,10 ppm) foi integrado e arbitrariamente atribuído o valor de 1000 usando o programa MestReNova 9.0.1. Os sinais em 9,75 e 3,61-3,74 ppm do citronelal e do citronelol, respectivamente, e os sinais em 5,36-5,42 e 4,13 ppm do geraniol foram integrados e os valores das integrações foram usados para calcular a quantidade destes compostos de acordo com a Equação 4.1.

4.2.4. Métodos cromatográficos

Soluções

Solução estoque da mistura de citronelal ($15,7 \text{ mg mL}^{-1}$), de citronelol ($17,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e de geraniol ($17,2 \text{ mg mL}^{-1}$) em diclorometano e solução estoque do padrão interno octadecano ($32,4 \text{ mg mL}^{-1}$) em diclorometano foram preparadas para realização dos experimentos de cromatografia gasosa utilizando padronização interna (CG-PI).

Para identificar os constituintes das amostras usando CG-EM, aproximadamente 10 mg de cada amostra foram dissolvidas em 1,00 mL de diclorometano.

Instrumentação

Cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM)

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás (Shimadzu, modelo 17A) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (RTX-5MS-Restek; 30 m x 0,25 mm d.i e espessura do filme de 0,25 μm) conectado a um detector por espectrometria de massas (Shimadzu, modelo QP5050A).

Cromatografia gasosa com detecção por ionização em chamas (CG-DIC)

A quantificação das amostras pelo método de cromatografia gasosa usando normalização de áreas (CG-N) foi realizada utilizando o cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo 17A, conectado ao detector por ionização em chamas (CG-DIC) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (SBP5-Supelco, 30 m x 0,25 mm d.i e 0,25 μm de espessura de filme).

Condições experimentais

CG-EM

A temperatura do forno foi programada para variar de 40 °C (2 min) a 200°C a uma taxa de 3 °C min^{-1} . O injetor e o detector foram mantidos a 200 e 240 °C, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a uma taxa de fluxo de 1,8 mL min^{-1} . A quantidade de 1,0 μL (solução do óleo essencial 1% m/v em diclorometano) foi injetada na razão de *split* foi de 1:5.

Os compostos foram identificados pelo tempo de retenção, pela comparação de seus espectros de massas com os espectros da base de dados do equipamento CG-EM (Willey 7 ed.; Nist 5 ed., Nist 8 ed. e Nist 11 ed.) e também comparando o índice aritmético calculado da injeção da mistura de alcanos lineares (C9 a C40) com os dados descritos na literatura (Martins *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2008; Adams, 2012).

CG-DIC

A temperatura da coluna foi programada para variar de 40 °C (4 min) a 200 °C a uma taxa de 3 °C min⁻¹. O injetor e o detector foram mantidos a 200 e 240 °C, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a uma taxa de fluxo de 1,8 mL mL⁻¹. A quantidade de 1,0 µL (solução do óleo essencial 1% m/v em diclorometano) foi injetada na razão de *split* foi de 1:5.

Quantificação de citronelal, de citronelol e de geraniol em óleo essencial usando CG-DIC

A quantificação de citronelal, de citronelol e de geraniol nos óleos essenciais comerciais de citronela usando cromatografia gasosa foi realizada utilizando os métodos de normalização de áreas (CG-N) e de padronização interna (CG-PI).

Normalização (CG-N)

Aproximadamente 10 mg dos óleos essenciais foram pesadas em vials aos quais foi adicionado 1,00 mL de diclorometano. As análises foram realizadas em triplicata nas condições previamente descritas. O conteúdo de citronelal, de citronelol e de geraniol nos óleos essenciais foi calculado pela percentagem da área do pico destes compostos em relação a área total do cromatograma.

Padronização interna (CG-PI)

Uma curva analítica foi construída para cada constituinte a ser quantificado nos óleos essenciais de citronela. Para isso, citronelal (0,39 a 7,84 mg mL⁻¹), citronelol (0,44 a 8,76 mg mL⁻¹) e geraniol (0,43 a 8,63 mg mL⁻¹) foram

adicionados a 7 balões volumétricos de 2,00 mL. Os volumes da solução contendo a mistura de citronelal ($15,7 \text{ mg mL}^{-1}$), de citronelol ($17,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e de geraniol ($17,2 \text{ mg mL}^{-1}$) em diclorometano adicionados aos tubos foram de 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 μL que correspondem às concentrações de 0,39; 0,78; 1,57; 3,14; 4,70; 6,27 e 7,84 mg mL^{-1} para citronelal, de 0,44; 0,88; 1,75; 3,50; 5,26; 7,01 e 8,76 mg mL^{-1} para citronelol e de 0,43; 0,86; 1,73; 3,45; 5,18; 6,90 e 8,63 mg mL^{-1} para geraniol. A cada um desses tubos, foram adicionados 200 μL ($3,24 \text{ mg mL}^{-1}$) da solução estoque de octadecano em diclorometano a uma concentração de $32,40 \text{ mg mL}^{-1}$ e diclorometano a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ para completar o volume para 2000 μL .

As equações das curvas analíticas ($y = 0,1726X + 0,0345$, $r = 0,9988$; $y = 0,1951X + 0,0188$, $r = 0,9995$ e $y = 0,2053X - 0,0431$, $r = 0,9997$, para citronelal, citronelol e geraniol, respectivamente) foram obtidas pela razão entre a área do pico correspondente ao analito e a área do pico referente ao padrão interno vs. concentração analito (em mg L^{-1}).

Para determinar o teor de citronelal, de citronelol e de geraniol usando CG-PI, aproximadamente 19 a 22 mg dos óleos essenciais foram pesadas diretamente nos balões volumétricos de 2,00 mL aos quais foram adicionados, 200 μL da solução estoque de octadecano ($32,40 \text{ mg mL}^{-1}$) e diclorometano até completar o volume. As amostras foram analisadas em triplicata em condições previamente descritas.

4.3. Comparação entre os métodos de quantificação

Uma comparação entre os métodos (CG-N, CG-PI e RMN de ^1H) utilizados para quantificação de citronelal, de citronelol e de geraniol nos óleos essenciais comerciais de citronela foi realizada, utilizando um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (8×3), sendo oito óleos e três métodos. Foram realizadas análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey de acordo com a significância da interação, usando o Programa R 3.0.3 com intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$).

4.4. Resultados e discussão

De acordo com a Farmacopeia Britânica (1998) o controle de qualidade dos óleos essenciais de citronela envolve a determinação da densidade relativa, do índice de refração e da rotação óptica desses óleos. Além disso, o conteúdo dos constituintes majoritários citronelal, citronelol e geraniol deve ser determinado pela técnica de cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização em chamas utilizando o procedimento de normalização de áreas (CG-N). Entretanto, o método de CG-N pode levar a erros de integração uma vez que, o teor de um composto é determinado levando em consideração à área do pico referente ao composto de interesse em relação à área de todos os picos do cromatograma. Assim, ao selecionar os parâmetros para integração, alguns picos podem ser incluídos ou excluídos, interferindo nos resultados.

Dessa forma, neste trabalho, um método para determinação simultânea de citronelal, de citronelol e de geraniol em óleos essenciais comerciais de citronela usando RMN de ^1H foi desenvolvido e validado e os resultados obtidos foram comparados aos obtidos pelos métodos cromatográficos usando normalização de áreas (CG-N) e padronização interna (CG-PI).

Para avaliar a eficiência do método de RMN de ^1H desenvolvido, oito amostras de óleos essenciais de citronela puros e três óleos formulados, de diferentes marcas, foram adquiridos no mercado brasileiro. Conforme esperado, a análise dos parâmetros índice de refração (Dados Suplementares 3, Tabela S3.36) e densidade relativa (Dados Suplementares 3, Tabela S3.37) permitiu uma distinção entre os óleos essenciais puros e os formulados, de acordo com os limites estabelecidos da Farmacopeia Britânica (1998), que variam de 1,463 a 1,475 e de 0,881 a 0,895, respectivamente. Isso porque que os valores de índice de refração e de densidade relativa dos óleos puros estavam dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopeia, enquanto, nos óleos formulados, os valores obtidos excederam estes limites. Entretanto não foi possível estabelecer uma diferença entre óleos puros e formulados levando em consideração o parâmetro rotação óptica, já que os resultados obtidos para os dois tipos de óleo estão de acordo com a Farmacopéia Britânica (entre -4° e $+1,5^\circ$), com exceção do óleo puro C6, que apresentou rotação óptica de $+1,63^\circ$ (Ver Dados Suplementares 3, Tabela S3.35). Esse comportamento provavelmente ocorrerá quando o aditivo

usado nos óleos formulados for opticamente inativo e não afetar a rotação óptica desses óleos essenciais.

4.4.1. Desenvolvimento e validação do método de RMN de ^1H

O método de RMN de ^1H desenvolvido para determinação simultânea de citronelal, de citronelol e de geraniol em óleos essenciais comerciais de citronela foi validado de acordo com as recomendações do guia "Orientações sobre Validação de Ensaio Químicos DOQ-CGCRE-008" publicado pelo INMETRO, conforme exigido pela legislação brasileira (INMETRO, 2011). Uma vez que esta resolução não estabelece limites para avaliar os parâmetros de validação, a Resolução RE 899 - Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, aprovada pelo Conselho da ANVISA (ANVISA, 2003) e as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR-14029) Agrotóxicos e afins - Validação de Métodos Analíticos (ABNT, 2005) também foram utilizadas.

Inicialmente, o espectro de RMN de ^1H da mistura de citronelal (96%), de citronelol (95%) e de geraniol (97%), contendo aproximadamente 20 mg de cada constituinte, foi obtido. Como esperado, os sinais dos hidrogênios de alqueno dos três compostos, multiplete em 5,04-5,12 ppm referente aos H-5 do citronelal, do citronelol e do geraniol, apareceram sobrepostos (Figura 4.4). O tripleto em 9,75 ppm referente ao hidrogênio do aldeído (H-10) do citronelal, o multiplete em 3,61-3,74 ppm (H-10) do citronelol, o multiplete em 5,36-5,42 ppm e o duplete em 4,13 ppm (H-1 e H10, respectivamente) do geraniol, apareceram em uma região distante dos outros sinais. Os demais sinais no espectro de RMN de ^1H dos três compostos foram observados em uma região propensa à sobreposição com outros sinais no espectro (Figura 4.4). Assim, em princípio, os quatro sinais listados acima podem ser utilizados para fins de quantificação e, portanto, foram utilizados para validar o método.

A especificidade e a seletividade do método de RMN de ^1H foram comprovadas pela ausência de sobreposição dos sinais em $\delta = 9,75$; $\delta = 3,61-3,74$ do citronelal e do citronelol, respectivamente, e dos sinais $\delta = 5,36-5,42$ e $\delta = 4,13$ do geraniol com os sinais de CDCl_3 e de OMCTS (Figura 4.4).

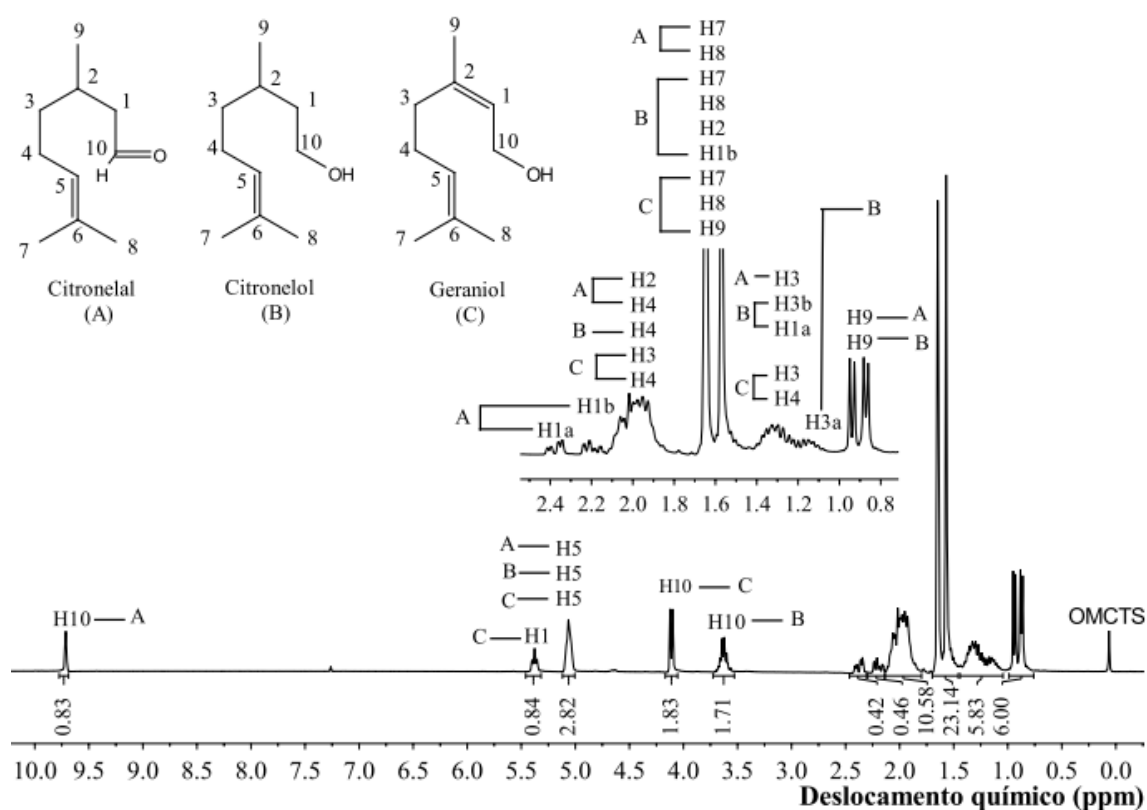


Figura 4.4. Espectro de RMN de ¹H da mistura de citronelal, de citronelol e de geraniol, contendo o padrão interno octametilciclotetrasiloxano (OMCTS) (300 MHz, em CDCl₃).

A linearidade do método foi avaliada para os sinais $\delta = 9,75$ do citronelal, $\delta = 3,61-3,74$ do citronelol e $\delta = 5,36-5,42$ e $\delta = 4,13$ do geraniol, obtidos no espectro de RMN de ¹H da mistura destes compostos, em diferentes quantidades, contendo OMCTS (Figura 4.4). Após os espectros serem processados, o sinal referente ao padrão interno OMCTS foi integrado e atribuído o valor de 1000. A seguir, os sinais do citronelal, do citronelol e do geraniol foram integrados em relação ao sinal do OMCTS (Figura 4.5). Pela substituição dos valores obtidos da integração dos sinais destes compostos na Equação 4.1, foi possível determinar a quantidade de citronelal, de citronelol e de geraniol contida em cada um dos tubos de RMN usados para determinação da linearidade. Uma curva de linearidade foi então construída plotando um gráfico da quantidade observada vs. quantidade esperada de citronelal ($\delta = 9,75$), de citronelol ($\delta = 3,61-3,74$) e de geraniol ($\delta = 5,36-5,42$ e $\delta = 4,13$) (Figura 4.6). Para todos estes sinais, os coeficientes de

correlação obtidos foram superiores ao critério mínimo estabelecido pela Resolução RE 899 ($r \geq 0,99$) (Figura 4.6).

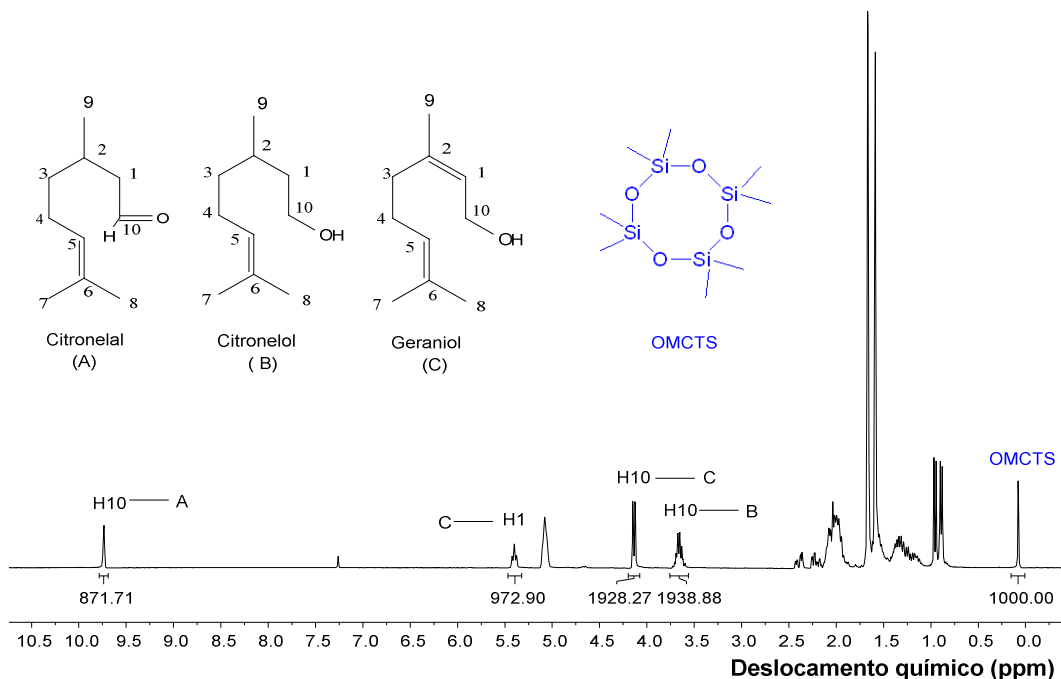


Figura 4.5. Espectro de RMN de ^1H da mistura de citronelal, de citronelol e de geraniol (19,71; 21,80 e 21,61 mg, respectivamente) (300 MHz, em CDCl_3) contendo o padrão interno OMCTS (1,36 mg) usado para determinação da linearidade do método de RMN de ^1H desenvolvido. À área do sinal correspondente ao OMCTS (em azul) é atribuído o valor de 1000. A área dos demais sinais é integrada em relação à do OMCTS.

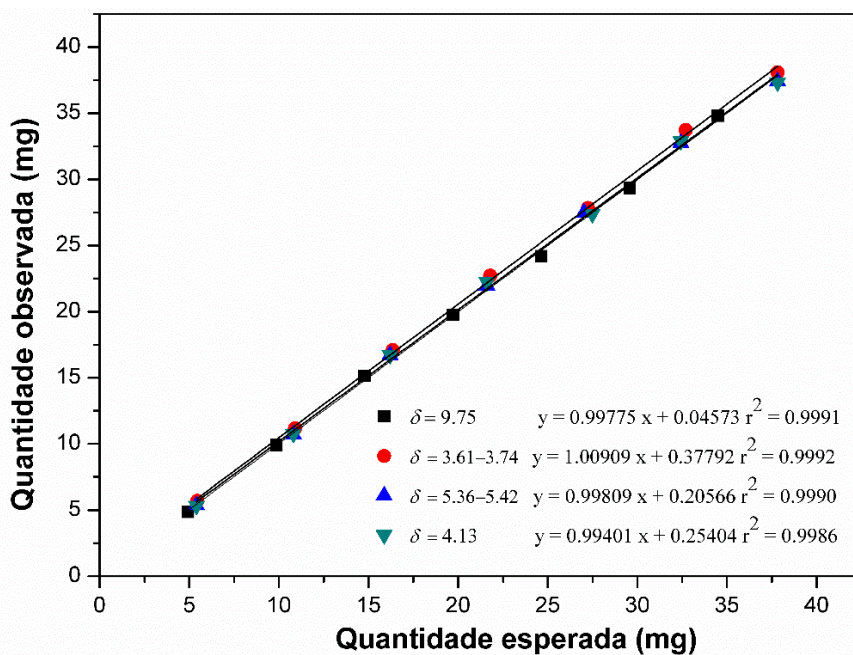


Figura 4.6. Curvas de linearidade da quantidade observada vs. quantidade esperada de citrônalo (■), de citrônolo (●) e de geraniol (▲ e ▼) obtidas do espectro de RMN de ^1H da mistura dos três componentes.

A robustez do método foi avaliada pela obtenção dos espectros de RMN de ^1H com 16 varreduras ($n = 16$), e temperatura controlada a $25\text{ }^\circ\text{C}$ e usando 8 varreduras, sem controle de temperatura.

O coeficiente de variação obtido ao adquirir os espectros sem controle de temperatura e usando 8 varreduras ($\text{CV} = 2,75$ em $9,75$ ppm para citrônalo; $\text{CV} = 1,61$ em $3,61\text{-}3,74$ ppm para citrônolo e $\text{CV} = 1,01$ em $5,36\text{-}5,42$ ppm e $\text{CV} = 1,49$ em $4,13$ ppm para geraniol) revelou que o método é robusto nas condições avaliadas. Além disso, a diferença em percentagem (%D) entre as massas de citrônalo, de citrônolo e de geraniol obtidas dos espectros adquiridos com 16 varreduras e temperatura de $25\text{ }^\circ\text{C}$ em relação às massas obtidas dos espectros adquiridos usando 8 varreduras, sem controle de temperatura foram significativamente baixas (%D = $2,47\%$ em $9,75$ ppm para citrônalo; $1,75\%$ em $3,61\text{-}3,74$ ppm para citrônolo e $2,72\%$ em $5,36\text{-}5,42$ ppm e $2,22\%$ em $4,13$ ppm para geraniol). Consulte as Tabelas S3.17 a S3.19, nos Dados Suplementares 3, para dados completos sobre robustez.

A repetibilidade do método foi confirmada para citrônalo ($\text{CV} = 0,12 - 2,57\%$ em $9,75$ ppm), para citrônolo ($\text{CV} = 0,62 - 4,56\%$ em $3,61\text{-}3,74$ ppm) e

para geraniol (CV = 0,14 - 3,59% em 5,36-5,42 ppm e CV = 0,40 - 3,96% em 4,13 ppm). Em todos os casos, a %CV \leq 5,0 estava de acordo com o máximo permitido pela Resolução RE 899 (Anvisa, 2003), conforme apresentado nas Tabelas S3.5 a S3.8 - Dados Suplementares 3.

A exatidão/precisão do método de RMN de ^1H foi avaliada usando compostos de pureza conhecida (citronelal 96%, citronelol 95% e geraniol 97%). A exatidão foi determinada pela razão entre a pureza experimental (PE) e a pureza fornecida pelo fabricante (PF), de acordo com a Equação (4.5).

A exatidão foi avaliada seguindo as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR 14029) [33], que estabelece um resultado na faixa de 98 a 102%. Os resultados obtidos para citronelal (98,14 a 101,06% em 9,75 ppm), para citronelol (99,79 a 101,97% em 3,61-3,74 ppm) e para geraniol (98,68 a 101,22% em 4,13 ppm e 98,16 a 101,65% em 5,36-5,42 ppm) estavam dentro dos limites estabelecidos pela NBR 14029 (ABNT, 2005) mostrando que a exatidão desse método é adequada (ver Tabelas S9 a S12 nos Dados Suplementares 3).

A estabilidade dos analitos e do padrão interno em solução foi avaliada usando os sinais em 9,75 ppm para citronelal; 3,61-3,74 ppm para citronelol e 5,36-5,42 ppm e 4,13 ppm para geraniol. Neste estudo os espectros de RMN de ^1H de uma mistura de aproximadamente 20 mg de cada composto (citronelal, citronelol e geraniol) foram obtidos a 25 °C, nos intervalos de 0 (inicial), 6, 12, 18 e 24 h.

As soluções foram consideradas estáveis, uma vez que os valores de CV obtidos para citronelal (variou de 0,14% após 12 h a 1,98% após 6 h, em 9,75 ppm), para citronelol (variou de 1,5% após 18 h a 2,45% após 24 h, em 3,61- 3,74 ppm) e para geraniol (variou de 1,42% após 18 h a 3,45% após 24 h, em 5,36-5,42 ppm e de 0,74% após 18 h a 2,55% após 24 h em 4,13 ppm) foram inferiores ao máximo permitido pela Resolução RE 899 (%CV \leq 5,0). Consulte Tabelas S13 a S16 nos Dados Suplementares 3 para obter dados completos sobre isso.

Para atingir uma certeza de 1% em uma quantificação usando RMN de ^1H , a relação sinal ruído deve ser de pelo menos 150 (Malz e Jancke, 2005). Dessa forma, um limite de quantificação (LQ) de 2,50 mg foi obtido para o citronelal (δ = 9,75; S/R = 204) e para o geraniol (δ = 5,36-5,42; S/R = 311 e δ = 4,13; S/R =

180). Entretanto, o LQ do citronelol foi de 5,00 mg ($\delta = 3,61-3,74$; S/R = 180). Além disso, um limite de detecção (LD) de 0,1 mg foi obtido para todos os compostos, variando apenas a relação sinal ruído (citronelal $\delta = 9,75$; S/R = 10; citronelol $\delta = 3,61-3,74$; S/R = 6 e geraniol $\delta = 5,36-5,42$; S/R = 14 e $\delta = 4,13$; S/R = 67).

Os valores de LQ do citronelal ($\delta = 9,75 - 1 H$) e do geraniol ($\delta = 5,36-5,42 - 1 H$ e $\delta = 4,13 - 2 H$) são os mesmos (2,5 mg), independentemente do número de núcleos que contribuem para o sinal nos espectros de RMN de 1H destes compostos. O LQ do citronelol é o dobro da quantidade (5,00 mg) necessária para a quantificação dos outros constituintes.

Os valores de LD do citronelal, do citronelol e do geraniol são os mesmos, independentemente do sinal avaliado, porque a mesma quantidade de substância é necessária para detecção (0,1 mg) desses constituintes. A relação S / R não é um fator chave para os valores LD.

4.4.2. Quantificação de citronelal, de citronelol e de geraniol em óleos essenciais comerciais de citronela

Inicialmente um grupo de oito amostras comerciais de óleo de citronela puro de *Cymbopogon nardus* (C1, C2, C4, C5, C6 e C7) e de *Cymbopogon winterianus* (C3 e C8) e três produtos formulados comerciais (C9-C11) foram submetidos à análises preliminares por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e por cromatografia gasosa equipada com detector de ionização em chamas (CG-DIC) usando normalização de áreas. Essas análises possibilitaram identificar e quantificar os constituintes dos óleos essenciais comerciais de citronela puros (Tabelas S3.32 e S3.33, Dados Suplementares 3) e dos formulados (Tabela S3.34, Dados Suplementares 3). Pelos resultados obtidos nestas análises, foi possível observar que os óleos essenciais puros têm composição química similar e que o conteúdo dos constituintes majoritários (citronelal, citronelol e geraniol) varia de um óleo para outro, conforme apresentado pelas Figuras 4.7 e 4.8.

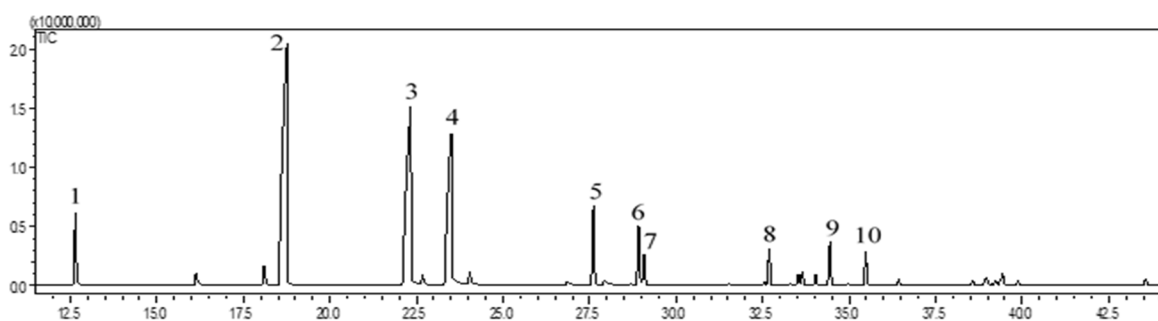


Figura 4.7. Cromatograma do óleo essencial comercial de *Cymbopogon nardus* (C2): **1:** limoneno (3,88%); **2:** citronelal (34,20%); **3:** citronelol (21,92%); **4:** geraniol (16,26%); **5:** acetato de citronelol (4,12%); **6:** acetato de geraniol (2,72%); **7:** β -elemeno (1,56 (1,56%); **8:** γ -muuloleno (2,53%); **9:** δ -cadineno (2,56%); **10:** elemol (1,49%).

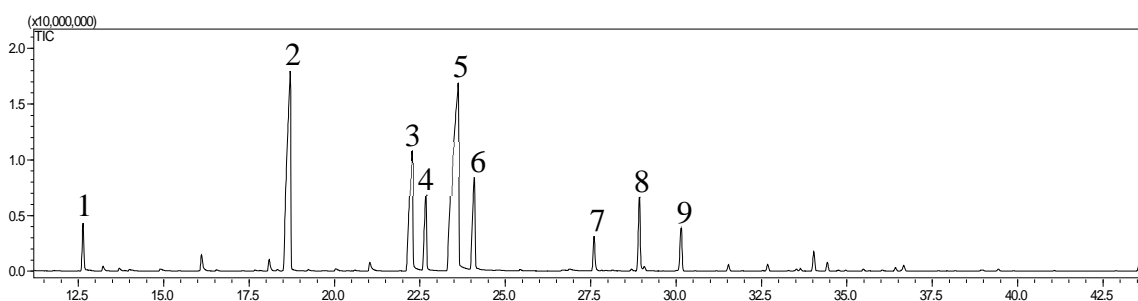


Figura 4.8. Cromatograma do óleo essencial comercial de *Cymbopogon winterianus* (C8): **1:** limoneno (2,24%); **2:** citronelal (23,74%); **3:** citronelol (11,78%); **4:** neral (5,58%); **5:** geraniol (34,38%); **6:** geranial (7,79%); **7:** acetato de citronelil (1,84%); **8:** acetato de geranil (3,87%); **9:** *E*-cariofileno (2,57%).

Foi observado também que o dipropilenoglicol é um aditivo comum aos três óleos formulados (C9-C11) e que, como esperado, quanto maior a quantidade de dipropilenoglicol adicionada aos óleos, menor a quantidade de constituintes detectados por CG, conforme Tabela S3.34 dos Dados Suplementares 3. Isso ocorre porque a adição de dipropilenoglicol dilui o óleo essencial, fazendo com que vários constituintes desses óleos estejam abaixo do limite de detecção das técnicas de CG-EM e de CG-DIC. A Figura S3.1, Dados Suplementares 3, apresenta a estrutura química de todos os constituintes dos óleos essenciais comerciais de citronela avaliados C1-C11.

Após a validação do método quantitativo de RMN de ^1H e a caracterização preliminar dos óleos comerciais, a seletividade dos sinais utilizados na validação do método foi avaliada nos óleos essenciais.

No presente estudo, a razão de 1:1 para a área dos sinais em 9,75 e 5,10 ppm do citronelal, de 1:2 para a área dos sinais em 5,10 e em 3,61-3,74 ppm do citronelol e de 1:1:2 para a área dos sinais em 5,10; 5,36-5,42 e 4,13 ppm do geraniol no espectro de RMN de ^1H indica a não sobreposição desses sinais com os sinais de outros constituintes presentes nos óleos (Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012). Em todos os óleos essenciais avaliados os sinais em 9,75; 3,61-3,74 e 4,13 ppm referentes ao citronelal, ao citronelol e ao geraniol, respectivamente, apresentaram área de menor intensidade quando comparada à área dos demais hidrogênios intramoleculares. Portanto, esses sinais foram usados para quantificação de citronelal, de citronelol e de geraniol nos óleos C1-C8. Embora a razão entre as áreas dos sinais do geraniol no espectro de RMN de ^1H dos óleos C1-C8 indique que o sinal em 5,36-5,42 ppm se sobrepõe a sinais de outros constituintes, este sinal também foi usado para quantificar geraniol para efeito de comparação com o teor de geraniol obtido usando o sinal em 4,13 ppm. Alguns espectros RMN de ^1H representativos para amostras C1-C8 são mostrados na Figura 4.9.

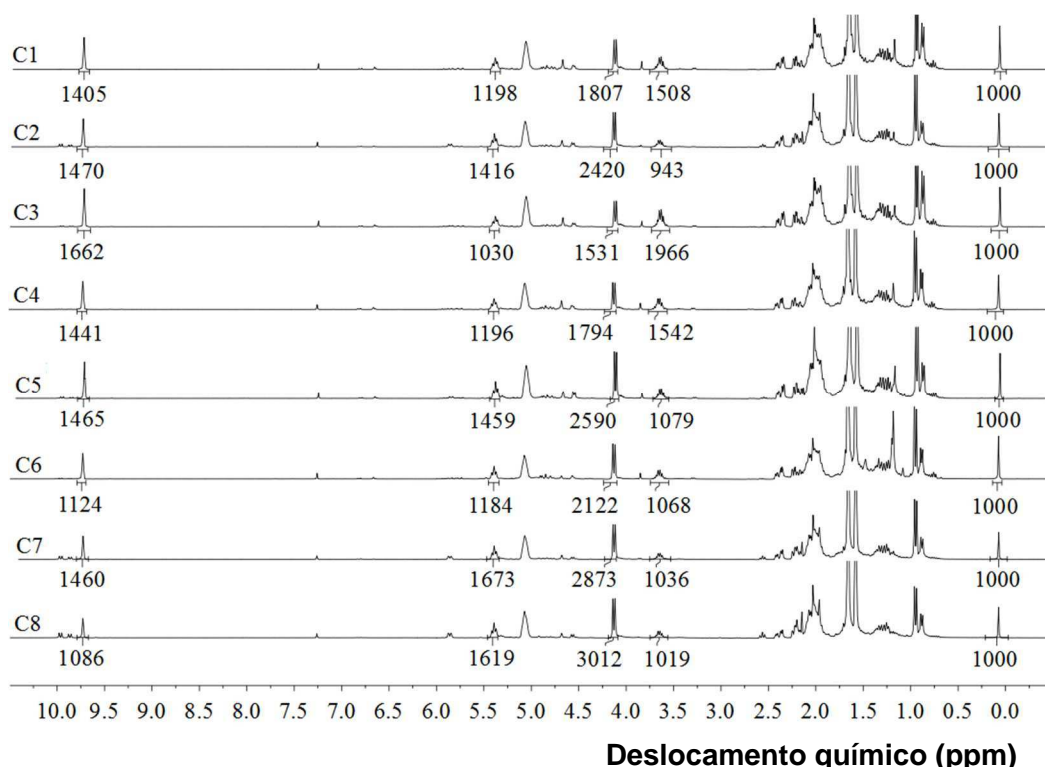


Figura 4.9. Espectros representativos de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) das amostras de óleos essenciais comerciais de *C. nardus* (C1, C2, C4, C5, C6 e C7) e de *C. winterianus* (C3 e C8). Os números abaixo de cada sinal são valores de integrais e foram utilizados para quantificar citronelal ($\delta = 9,75$), citronelol ($\delta = 3,61\text{-}3,74$) e geraniol ($\delta = 5,36\text{-}5,42$ e $\delta = 4,13$), em cada óleo essencial.

Nos óleos formulados C9, C10 e C11 (Figuras S3.2, S3.3 e S3.4 dos Dados Suplementares 3) não foi possível determinar o teor dos constituintes citronelal, citronelol e geraniol usando o método de RMN de ^1H desenvolvido. Isto é devido ao dipropilenoglicol presente nestes óleos, resultando em conteúdo de citronelal abaixo do limite de quantificação do método. Além disso, os sinais de dipropilenoglicol se sobrepõem com os sinais em $\delta = 3,61\text{-}3,74$ do citronelol e com os sinais $\delta = 5,36\text{-}5,42$ e $\delta = 4,13$ do geraniol, levando a uma superestimação de seus teores.

Na tentativa de separar os sinais de dipropilenoglicol sobrepostos com os sinais utilizados para quantificação de citronelol e de geraniol nos óleos formulados, o espectro de RMN de ^1H do formulado C11 foi adquirido substituindo o clorofórmio por benzeno deuterado (Dados Suplementares 3, Figura S3.5). Além disso, AlCl_3 foi adicionado ao tubo de RMN contendo o formulado C11 dissolvido em CDCl_3 (Dados Suplementares 3, Figura S3.6), numa tentativa de promover uma complexação do AlCl_3 com dipropilenoglicol. A complexação

poderia causar um deslocamento dos sinais do dipropilenoglicol que se sobrepõem com os sinais utilizados para quantificar citrônol e geraniol nos óleos formulados.

Entretanto, como observado nas figuras S3.5 e S3.6, Dados Suplementares 3, estes procedimentos não resultaram na separação dos sinais de dipropilenoglicol sobrepostos com nenhum dos sinais de interesse. Apenas uma pequena alteração na multiplicidade foi observada.

O conteúdo de citrônol (Figura 4.10), de citrônol (Figura 4.11) e de geraniol (Figura 4.12) obtidos por RMN de ^1H foram comparados aos obtidos pelos métodos cromatográficos usando normalização de área (GC-N) e padronização interna (CG-PI) (Ver também Dados Suplementares 3, Tabelas S3.29 a S3.31).

Testes estatísticos utilizando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey comprovaram a similaridade dos três métodos (CG-N, CG-PI e RMN de ^1H) utilizados para quantificação dos constituintes majoritários dos óleos essenciais comerciais de citrônol (citrônol, citrônol e geraniol) para a maior parte dos óleos avaliados. Entretanto, pequenas diferenças foram observadas no teor de geraniol obtidos pelo método de CG-N quando comparados aos obtidos por CG-PI e por RMN de ^1H ($\delta = 4,13$), apenas nos óleos C3 e C6 (Figura 4.12). Uma comparação entre o teor de geraniol obtido pelo método RMN de ^1H desenvolvido utilizando os sinais em $\delta = 5,36-5,42$ e em $\delta = 4,13$ e o determinado pelos métodos cromatográficos de padronização interna e de normalização de áreas (Figura 4.12), permite observar que o método de RMN de ^1H usando $\delta = 5,36-5,42$ fornece resultados superestimados de geraniol para todos os óleos puros avaliados. Isso acontece porque o sinal em $\delta = 5,36-5,42$ do geraniol se sobrepõem com sinais de outros constituintes presentes nos óleos essenciais avaliados. Devido a essa superposição de sinais, os resultados obtidos na quantificação de geraniol por RMN de ^1H usando o sinal em $\delta = 5,36-5,42$ não foram levados em consideração para avaliação estatística. Dessa forma, a quantificação de geraniol por RMN em óleo essencial deve ser realizada utilizando o sinal $\delta = 4,13$.

Os métodos de RMN de ^1H e de CG-PI foram estatisticamente equivalentes para a determinação de citrônol para a amostra C2. No entanto, RMN de ^1H e

CG-N foram estatisticamente equivalentes para a determinação de citronelal para a amostra C5 (Figura 4.10).

Para determinação de citronelol, os três métodos foram similares para todos os óleos avaliados (Figura 4.11). Essas diferenças mostram o quanto o método de CG-N é dependente dos parâmetros selecionados para integração dos picos em um cromatograma. De acordo com os parâmetros selecionados para integração (inclinação, área mínima), alguns picos podem ser incluídos ou excluídos, interferindo nos resultados.

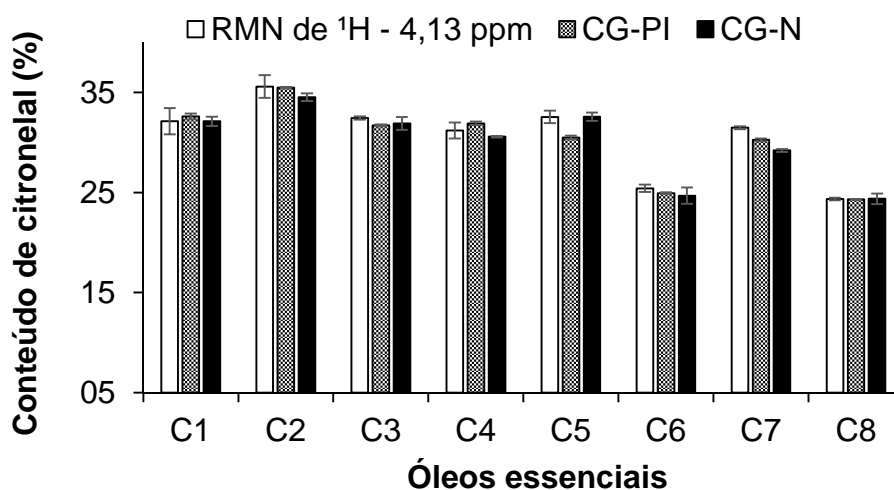


Figura 4.10. Conteúdo (%) de citronelal nos óleos essenciais de *C. nardus* (C1, C2, C4, C5, C6 e C7) e de *C. winterianus* (C3 e C8) medidos pelos métodos de cromatografia gasosa usando padronização interna (CG-PI), normalização de áreas (CG-N) e RMN de ¹H. O símbolo \pm contido em cada barra representa o desvio padrão.

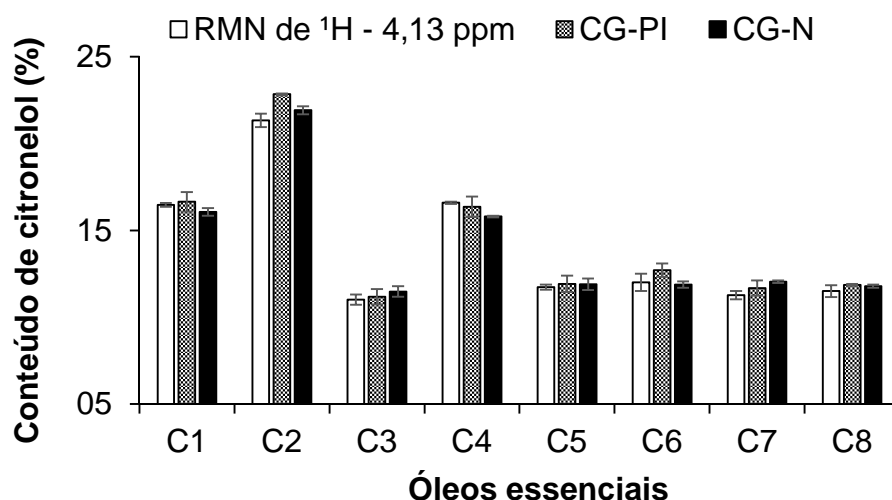


Figura 4.10. Conteúdo (%) de citronelol nos óleos essenciais de *C. nardus* (C1, C2, C4, C5, C6 e C7) e de *C. winterianus* (C3 e C8) medidos pelos métodos de cromatografia gasosa usando padronização interna (CG-PI), normalização de áreas (CG-N) e RMN de ¹H. O símbolo \pm contido em cada barra representa o desvio padrão.

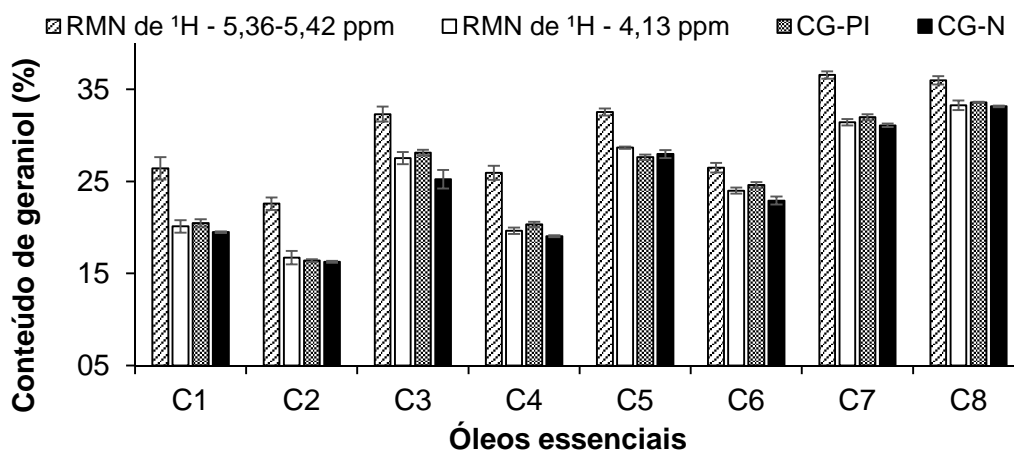


Figura 4.11. Conteúdo (%) de geraniol nos óleos essenciais de *C. nardus* (C1, C2, C4, C5, C6 e C7) e de *C. winterianus* (C3 e C8) medidos pelos métodos de cromatografia gasosa usando padronização interna (CG-PI), normalização de áreas (CG-N) e RMN de ¹H usando os sinais em $\delta = 5,36-5,42$ e $\delta = 4,13$. O símbolo \pm contido em cada barra representa o desvio padrão.

Para identificar os possíveis constituintes dos óleos essenciais de citronela que se sobrepõem com o sinal $\delta = 5,36-5,42$ do geraniol, os deslocamentos

químicos dos compostos com teores acima de 1,00% foram avaliados. A Figura 4.13, que possibilita visualizar o intervalo de 3,5-10,0 ppm, empregado para quantificação dos constituintes majoritários do óleo de citronela, foi construída a partir da análise destes deslocamentos químicos obtidos da literatura (Tissandié *et al.*, 2017; Guha *et al.*, 2016; Schiffrin *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2015; Faraldos *et al.*, 2012; Szafranek *et al.*, 2005).

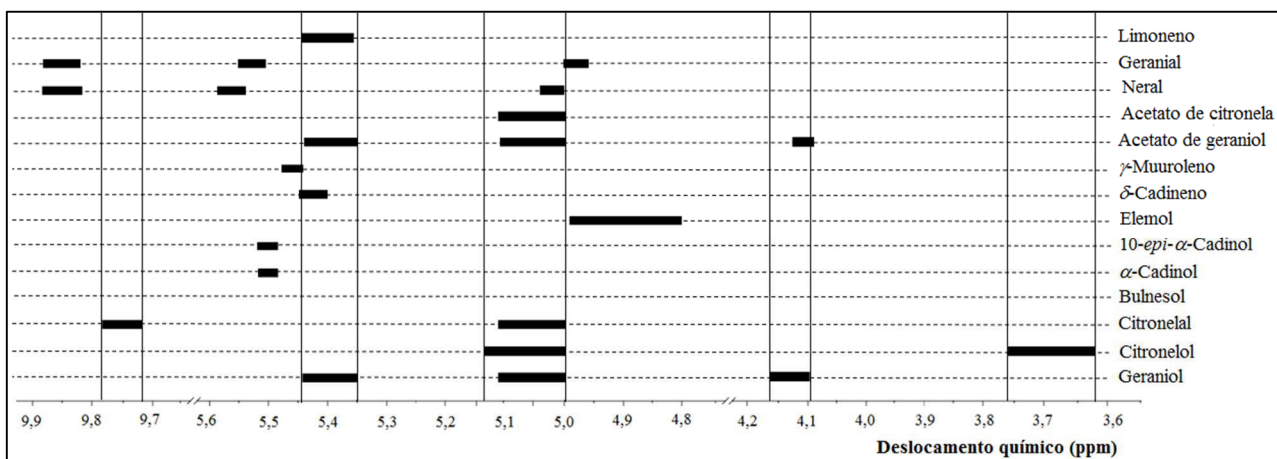


Figura 4.12. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H dos constituintes dos óleos essenciais de citronela com conteúdo acima de 1,00% (3,5-10,0 ppm).

Analisando a Figura 4.13, é possível observar que o teor superestimado de geraniol determinado por RMN de ^1H usando o sinal em 5,36-5,42 ppm (Figura 4.12) pode ser devido à sobreposição com sinais de limoneno, de acetato de geraniol e de δ cadineno, presentes em todos os óleos de citronela puros (C1-C8) avaliados.

Caso os compostos limoneno, acetato de geraniol e δ cadineno sejam responsáveis pela sobreposição de sinais no óleo C4, por exemplo, a subtração entre o percentual de geraniol obtido por RMN de ^1H usando $\delta = 5,36-5,42$ ($25,92\% \pm 0,78\%$), diminuído do teor deste composto determinado por CG-N ($19,05\% \pm 0,10\%$), e a soma dos teores de limoneno ($3,67\% \pm 0,03\%$), de acetato de geraniol ($3,03\% \pm 0,04\%$) e de δ cadineno ($0,19\% \pm 0,00\%$) obtidos por CG-N deve resultar em um valor próximo de zero. O resultado dessa subtração ($-0,02\%$) confirma que limoneno, acetato de geraniol e δ cadineno são responsáveis pelo teor superestimado de geraniol determinado usando o sinal $\delta = 5,36-5,42$ no óleo

C4. Os dados utilizados nos cálculos foram retirados das Tabelas S3.31-S3.33, Dados Suplementares 3).

A seguir, essa mesma análise é apresentada para os demais óleos.

Para C1, $[(26,41\% \pm 1,22\%) - (17,65\% \pm 0,61\%)] - [(4,26\% \pm 0,41\%) + (2,95\% \pm 0,25\%) + (2,90\% \pm 0,23\%)] = -1,35\%$

Para C2, $[(22,57\% \pm 0,69\%) - (16,26\% \pm 0,10\%)] - [(3,88\% \pm 0,24\%) + (2,72\% \pm 0,20\%) + (0,00\% \pm 0,00\%)] = -0,29\%$

Para C3, $[(32,30\% \pm 0,83\%) - (25,22\% \pm 1,02\%)] - [(3,33\% \pm 0,39\%) + (4,37\% \pm 0,23\%) + (1,40\% \pm 0,06\%)] = -2,02\%$

Para C5, $[(32,53\% \pm 0,38\%) - (27,43\% \pm 2,21\%)] - [(2,47\% \pm 0,29\%) + (5,49\% \pm 0,07\%) + (1,27\% \pm 0,12\%)] = -4,13\%$

Para C6, $[(26,49\% \pm 0,51\%) - (21,92\% \pm 1,00\%)] - [(1,25\% \pm 0,03\%) + (0,97\% \pm 0,04\%) + (1,17\% \pm 0,00\%)] = 1,18\%$

Para C7, $[(36,55\% \pm 0,40\%) - (30,75\% \pm 0,43\%)] - [(2,57\% \pm 0,20\%) + (2,68\% \pm 0,04\%) + (0,69\% \pm 0,02\%)] = -0,14\%$

Para C8, $[(35,96\% \pm 0,45\%) - (34,38\% \pm 1,72\%)] - [(2,24\% \pm 0,30\%) + (3,87\% \pm 0,33\%) + (0,30\% \pm 0,06\%)] = -4,83\%$.

Valores próximos a zero resultantes da subtração entre teor de geraniol obtido por RMN de ^1H diminuído do percentual deste mesmo composto determinado por CG-N e a soma dos teores dos compostos limoneno, acetato de geraniol e δ -cadineno determinados também por CG-N, indicam sobreposição entre limoneno, acetato de geraniol, δ -cadineno e geraniol. Dessa forma, nas amostras C2 e C7, estes compostos se sobrepõem, uma vez que os resultados obtidos foram próximos a zero. Para os óleos C1 e C6, considerando o desvio padrão dos teores dos compostos usados nos cálculos, o resultado também será próximo de zero. Observando os valores obtidos na análise das amostras C3, C5 e C8, percebe-se que em todas elas a subtração entre o percentual de geraniol obtido por RMN de ^1H usando $\delta = 5,36-5,42$ e o teor deste composto determinado por CG-N é sempre inferior à soma dos teores de limoneno, de acetato de geraniol e de δ -cadineno obtidos por CG-N. Isso indica que o teor dos compostos limoneno, acetato de geraniol e δ -cadineno determinados por RMN foi inferior ao obtido por CG-N. Isso é explicado pelo fato da concentração influenciar no deslocamento químico dos compostos nos espectros de RMN (Holzgrabe, 2010).

Assim, dependendo da concentração do composto, pode haver variação no deslocamento químico do sinal, ocasionando uma sobreposição parcial ou até mesmo a não sobreposição de sinais no espectro de RMN, diminuindo o teor dos compostos determinados por este método.

Portanto, o teor de geraniol em óleos essenciais de citronela deve ser determinado usando o sinal em 4,13 ppm.

Avaliando a qualidade dos óleos essenciais comerciais puros de citronela, verificou-se que o conteúdo citronelal (Figura 4.10) está em conformidade com a Farmacopeia Britânica (de 30 a 45% de citronelal), exceto nos óleos C6 e C8, nos quais o conteúdo citronelal é menor do que o esperado.

Por outro lado, o teor de citronelol (Figura 4.11) dos óleos C1, C2 e C4 está acima do limite estabelecido para controle de qualidade, de acordo com a Farmacopeia (de 9 a 15% de citronelol). Em relação ao constituinte geraniol (Figura 4.12), apenas as amostras C1 e C6 estão de acordo com os padrões de qualidade da Farmacopeia Britânica (de 20 a 25% de geraniol). O teor de geraniol na amostra C2 foi inferior a 20%, enquanto nas amostras C3, C4, C5, C7 e C8 foi superior ao limite de 25%. Em geral, nenhuma das amostras dos óleos essenciais comerciais de citronela avaliados apresentou simultaneamente o conteúdo de citronelal, de citronelol e de geraniol de acordo com os padrões de qualidade da Farmacopeia Britânica.

A degradação é uma das causas da redução da qualidade dos óleos essenciais, devido à exposição à luz, oxigênio e calor durante o armazenamento e transporte (Turek e Stintzing, 2013). Para avaliar se os compostos formados pela degradação do citronelal, constituinte majoritário do óleo essencial de citronela (farmacopeia Britânica, 1998), interferem com o método de RMN de ^1H desenvolvido, este composto foi submetido a uma temperatura de 55 °C, sob atmosfera de oxigênio durante 48 horas. Em seguida, a quantidade restante de citronelal foi determinada pelos métodos de RMN de ^1H e de CG-N (Tabela S3.39, Dados Suplementares 3). O conteúdo de citronelal variou de 96 a 38% e 26 compostos foram formados (Figura S3.7, Dados Suplementares 3).

Embora numerosos compostos tenham sido formados a partir da degradação de citronelal, o método do RMN de ^1H foi adequado para a quantificação do conteúdo deste composto após submissão às condições de

temperatura e oxigênio. O espectro de RMN de ^1H dos compostos formados na degradação (Figura S3.8) consta nos Dados Suplementares 3.

4.5. Conclusão

É possível diferenciar um óleo essencial de citronela puro dos formulados por meio de parâmetros simples como densidade relativa e índice de refração dos óleos, com base nos limites estabelecidos pela Farmacopeia Britânica. Embora os parâmetros físico-químicos de todos os óleos puros avaliados estejam em conformidade com a farmacopeia britânica, nenhum deles apresentou simultaneamente o conteúdo de todos os constituintes majoritários (citronelal, citronelol e geraniol) dentro do intervalo estabelecido.

O método de RMN de ^1H desenvolvido para quantificação de citronelal, de citronelol e de geraniol em óleos essenciais de *C. nardus* e de *C. winterianus* é rápido (10 min) e simples. Entretanto, a determinação do conteúdo de geraniol deve ser realizada usando o sinal em $\delta = 4,13$, uma vez que o sinal em $\delta = 5,36$ - $5,42$ leva à obtenção de um percentual de geraniol superestimado devido à ocorrência de sobreposição com sinais do limoneno, do acetato de geraniol e do δ -cadineno.

Embora a degradação de citronelal submetido ao excesso de oxigênio e à temperatura de $55\text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h tenha formado 26 produtos, a quantificação deste terpeno em meio aos produtos da degradação foi realizada com sucesso utilizando método de RMN de ^1H desenvolvido.

Referências

1. AbouZid, S., Use of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Analysis of Fennel Essential Oil, **Natural Product Sciences**, v.22, p. 30-34, 2016.
2. Adams, R. P., **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, fourth edition, Allured publishing Corporation, Carol Stream, USA, 2012. IL60188-2787. ISBN 978-1-932633-21.
3. Andersen, N. H. e Syrdal, D. D., Terpenes and sesquiterpenes of *Chamaecyparis nootkatensis* leaf oil, **Phytochemistry**, v.9. p.132-1340, 1970.
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Resolução-RE no. 899, de 29 de maio de

2003. 15p, 2003.
5. Andrade, I. S. Avaliação técnica e econômica de sistemas de manejo de candeias nativas. 2009 133f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
 6. Aydin, E., Türkez, H., Geyikoglu, F., Antioxidative, anticâncer and genotoxic properties of α -pinene on N2a neuroblastoma cells, **Biologia**, v.68, p.1004-1009, 2013.
 7. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14029**: Agrotóxicos e Afins – Validação de Métodos Analíticos. Rio de Janeiro, 2005.
 8. Azarken, R., Guerra, R. F., Moreno-Dorado, F. J., Jorge, Z. D., Massanet, G. M., Substituent effects in the transannular cyclizations of germacranes. Synthesis of 6-*epi*-costunolide and five natural steiractinolides, **Tetrahedron**, v.64, p.10896–10905, 2008.
 9. Bajer, T., Janda, V., Bajerová, Kremr, D., Eisner, A., Ventura, K., Chemical composition of essential oils from *plantago lanceolata* L. leaves extracted by hydrodistillation, **Journal of Food Science and Technology**, 2015e
 10. Baldovini, N., Tomi, F., Casanova, J., Identification and quantitative determination of furanodiene, a heat-sensitive compound, in essential oil by ^{13}C -NMR, **Phytochemical Analysis**, v.12, p.58-63, 2001.
 11. Barbosa, L. C. A., Pereira, U., Martinazzo, A. P., Maltha, C. R. A., Teixeira, R. R., Melo, E. C., Evaluation of the chemical composition of Brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) stapf samples, **Molecules**, v.13, p.1864–1874, 2008.
 12. Barbosa, L. C. A., Filomeno, C. A., Teixeira, R. R., Chemical Variability and Biological Activities of *Eucalyptus* spp. Essential Oils, **Molecules**, v.21, p. 1671, 2016.
 13. Barison, A., Silva, C. W. P., Campos, F. R., Simonelli, F., Lenz, C. A., Ferreira, A. G., A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ^1H NMR spectroscopy, **Magnetic Resonance in Chemistry**. v.48, p.642-650, 2010.
 14. Bekiroglu, S., Myrbeg, O., Ostman, K., Ek, M., Arvidsson, T. Rundlof, T., Hakkarainen, B., Validation of a quantitative NMR method for suspected counterfeit products exemplified on determination of benzethonium chloride in

- grapefruit seed extracts, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.47, p.958-961, 2008.
15. Beltrame, J. M., Angnes, R. A., Chiavelli, L. U. R., Costa, W. F., Rosa, M. F., Lobo, V. S., Pomini, A. M., Photodegradation of essential oil from marjoram (*Origanum Majorana L.*) studied by GC-MS and UV-VIS, **Revista Latinoamericana de Química**, v.41, p.81-88, 2013.
 16. Berregi, I., Campo, G., Caracena, R., Miranda, J. I., Quantitative determination of formic acid in apple juices by ^1H NMR spectrometry, **Talanta**, v.72, p.1049–1053, 2007.
 17. Bharti, S. K., Roy, R., Quantitative ^1H NMR spectroscopy, **Trends in Analytical Chemistry**, v.35, p. 5–26, 2012.
 18. Bizzo, H. R., Maria, A., Hovell, C., Rezende, C. M., Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas, **Química Nova**, v.32, p.588–594, 2009.
 19. Blanc, M. C., Bradesi, P., Casanova, J., Identification and quantitative determination of eudesmane-type acids from the essential oil of *Dittrichia viscosa* sp. viscosa using ^{13}C -NMR spectroscopy, **Phytochemical Analysis**, v.16, p.150–154
 20. Bussy, U., Giraudeau, P., Tea, I., Boujtita, M., Understanding the degradation of electrochemically-generated reactive drug metabolites by quantitative NMR, **Talanta**, v.116, p.554–558, 2013.
 21. Campo, G., Berregi, I., Caracena, R., Zuriarrain, J., Quantitative determination of caffeine, formic acid, trigonelline and 5-(hydroxymethyl)furfural in soluble coffees by ^1H NMR spectrometry, **Talanta**, v.81, p.367–371, 2010.
 22. Caligiani, A., Acquotti, D., Palla, G., Bocchi, V., Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution ^1H NMR spectroscopy, **Analytica Chimica Acta**, v.585, p.110–119, 2007.
 23. Cavalli, J. F., Tomi, F., Bernardini, A. F., Casanova, J., Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ^{13}C -NMR spectroscopy: Quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound, **Phytochemical Analysis**, v.15, p.275–279, 2004.

24. Cerceau, C. I., Barbosa, L. C. A., Filomeno, C. A., Alvarenga, E. S., Demuner, A. J., Fidencio, P. H., An optimized and validated ^1H NMR method for the quantification of α -pinene in essential oils, **Talanta**, v.150, p.97–103, 2016a.
25. Cerceau, C. I., Barbosa, L. C. A., Alvarenga, E. S., Ferreira, A. G., Thomasi, S. S., A validated ^1H NMR method for quantitative analysis of α -bisabolol in essential oils of *Eremanthus erythropappus*, **Talanta**, v.161, p.71–79, 2016b.
26. Choudhary, A., Sharma, R. J., Singh, I. P., Determination of Major Sesquiterpene Lactones in Essential Oil of *Inula racemosa* and *Saussurea lappa* Using qNMR, **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.1, p.20-31, 2016.
27. Christophoridou, S., Dais, P., Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy, **Analytica Chimica Acta**, v.633, p. 283–292, 2009.
28. Claridge, D. W. Timothy. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. 2. ed. Elsevier, 2009. 383p.
29. Craveiro, A. A.; Queiroz, D. C.; Óleos essenciais e Química Fina. **Química Nova**. v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.
30. Crawford, R. J., Erman, W. F., Broaddus, C. D., Metalation of Limonene. A Novel Method for the Synthesis of Bisabolane Sesquiterpenes, **Journal of the American Chemical Society**, p.4298-4306, 1972.
31. Danel, C., Azaroual, N., Brunel, A., Lannoy, D., Vermeersch, G., Odou, P., Vaccher, C., Study of the complexation of risperidone and 9-hydroxyrisperidone with cyclodextrin hosts using affinity capillary electrophoresis and ^1H NMR spectroscopy, **Journal of Chromatography A**, v.1215, p.185–193, 2008.
32. Demuner, A. J., Barbosa, L. C. A., Magalhães, C. G., Silva, C. J., Maltha, C. R. A., Pinheiro, A. L., Seasonal variation in the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of three species of *Leptospermum* (Myrtaceae) grown in Brazil, **Molecules**, v.16, p.1181-1191, 2011.
33. Doskotch, R. W., El-Ferally, F. S., The Structure of Tulipinolide and Epitulipinolide. Cytotoxic Sesquiterpenes from *Liriodendron tulipifera* L., **Journal of Organic Chemistry**, v.35, p.1928-1936, 1970.
34. Dufour, G., Evrard, B., Tullio, P., 2D-Cosy NMR Spectroscopy as a Quantitative Tool in Biological Matrix: Application to Cyclodextrins, **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.17, p.1501–1510, 2015.

35. Dufour, G., Evrard, B., Tullio, P., Rapid quantification of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in liquid pharmaceutical formulations by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.73, p.20–28, 2015.
36. Faraldos, J. A., Miller, D. J., González, V., Yoosuf-Aly, Z., Cascón, O., Li, A., Allemann, R. K., A 1,6-ring closure mechanism for (+)- δ -cadinene synthase?, **Journal of the American Chemical Society**, v.134, p. 5900–5908, 2012.
37. Feula, A., Fossey, J. S. Base and solvent dependency of an oxidative retro-alkylation of secondary and tertiary benzylamines, **Royal Society of Chemistry Advances**, v.3, p.5370–5373, 2013.
38. Formacek, V., Kubeczka, K. H., **Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy**, second ed., Wiley Cop, Chichester, 2002. 480p. ISBN 978-0-471-96314-1.
39. Forshed, J., Erlandsson, B., Jacobsson, S. P., Quantification of aldehyde impurities in poloxamer by ^1H NMR spectrometry, **Analytica Chimica Acta**, v.552, p.160–165, 2005.
40. Guha, N. R., Sharma, S., Bhattacharjee, D., Thakur, V., Bharti, R., Reddy, C. B., Das, P., Oxidative “reverse-esterification” of ethanol with benzyl/alkyl alcohols or aldehydes catalyzed by supported rhodium nanoparticles, **Green Chemistry**, v.18, p.1206–1211, 2016.
41. Guerrini, A., Rossi, D., Paganetto, G., Tognolini, M., Muzzoli, M., Romagnoli, C., Antognonie, F., Vertuani, S., Medici, A., Bruni, A., Useli, C., Tamburini, E., Bruni, R., Sacchetti, G., Chemical characterization (GC/MS and NMR fingerprinting) and bioactivities of South-African *Pelargonium capitatum* (L.) L’her. (Geraniaceae) essential oil, **Chemistry and Biodiversity**, v.8, p.624–642, 2011.
42. Holzgrabe, U., Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications, **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v.57, p.229–240, 2010.
43. Höschle, B., Jendrossek, D., Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol, **Microbiology**, v.151, p.2277–2283, 2005.

44. Huang, T., Zhang, W., Dai, X., Zhang, X., Quan, C., Li, H., Yang, Y., Precise measurement for the purity of amino acid and peptide using quantitative nuclear magnetic resonance, **Talanta**, v.125, p.94–101, 2014.
45. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), **Orientações Sobre Validações de Métodos de Ensaio Químicos**. DOQ-CGCRE-008, Revisão 2, 24p, 2011.
46. Joseph, G. R., Szabo, C. M., Quantitative NMR for Solutions, **eMagRes**, v.2, p.193–204, 2013.
47. Kardani, F., Daneshfar, A., Sahrae, R., Ghaedi, M., Application of Coacervative microextraction for extraction of volatile compounds in thymus essential oil and fruit juices by chromatography with flame ionization detection application of coacervative microextraction for extraction of volatile compound, **Journal of Essential Oil Research**, v.23, p.61-69, 2011.
48. Kamatou, G. P. P., Viljoen, A., A Review of the Application and Pharmacological Properties of α -bisabolol and α -bisabolol-Rich Oils, **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.87, p.1–7, 2010.
49. Keeler, J. **Understanding NMR Spectroscopy**. Wiley, 2002. 211p.
50. Khia, A., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Aberchane, M., Quaboul, B., Chaouch, A., Amusant, N., Charrouf, Z., Effect of provenance on the chemical and microbiological quality of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. in Morocco [Effet de la provenance sur la qualité chimique et microbiologique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. du Maroc], **Phytothérapie**, v.12, p.341–347, 2014.
51. Kosir, I. J., Kidric, J. Identification of Amino Acids in Wines by One- and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.50-56, 2011.
52. Leal, Ana Paula, F. **Aplicação do método de ressonância magnética nuclear para identificação e quantificação de polissacarídeos meningocócicos sorogrupos C e W135**. 2013. 122f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Rio de Janeiro, 2013.

53. Li, C.-Y., H.-X. Han, Q.-B., Wu, T.-S., Quality assessment of Radix Codonopsis by quantitative nuclear magnetic resonance, **Journal of Chromatography A**, v.1216, p.2124–2129, 2009.
54. Lü, D.-Y., Cao, Y., Li, L., Zhu, Z.-Y., Dong, X., Zhang, H., Chai, Y.-F., Lou, Z.-Y. Comparative analysis of essential oils found in *Rhizomes Curcumae* and *Radix Curcumae* by gas chromatography – mass spectrometry, **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.1, p.203–207, 2011.
55. Lubbe, A., Verpoorte, R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials, **Industrial Crops and Products**, v.34, p.785–801, 2011.
56. Maltz, F., Jancke, H., Validation of quantitative NMR, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.38, p.813–823, 2005.
57. Mannina, L., Sobolev, A. P., Viel, S., Liquid state ^1H high field NMR in food analysis, **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v.66, p.1–39, 2012.
58. Marcone, M. F., Wang, S., Albabish, W., Nie, S., Somnarain, D., Hill, A., Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology, **Food Research International**, v.51, p.729–747, 2013.
59. Martins, F. T., Santos, M. H., Polo, M., Barbosa, L. C. A., Variação química do óleo de *Hyptis suaveolens* (L.) poit., sob condições de cultivo, **Química Nova**, v.29, p.1203–1209, 2006.
60. Mercier, B., Prost, J., Prost, M., The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): a review, **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v.22, p.331–342, 2009.
61. Meusinger, R., Qualitative and quantitative determination of oxygenates in gasolines using nuclear magnetic resonance spectroscopy, **Analytica Chimica Acta**, v.391, p.277–288, 1999.
62. Michaleas, S., Antoniadou-Vyza, E., A new approach to quantitative NMR: Fluoroquinolones analysis by evaluating the chemical shift displacements, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p. 405–410, 2006.
63. Ming, C. W., Mayer, R., Zimmermann, H., Rücker, G., A non-oxidized melampolide and other germacranolides from *Aristolochia yunnanensis*, **Phytochemistry**, v.28, n.11, p.3233-3234, 1989.

64. Miyazawa, M., Nankai, H., Kameoka, H., Biotransformation of (-)- α -bisabolol by plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulate*, **Phytochemistry**, v.39, p.1077-1080, 1995.
65. Montanari, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparuna e Verbenaceae**. Minas Gerais, 2010. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2010.
66. Ohtsuki, K. sato, Y. Abe, N. Sugimoto, H. Akiyama, Quantification of acesulfame potassium in processed foods by quantitative ^1H NMR, **Talanta**, v.131, p.712–718, 2015.
67. Oliveira, A. F. G., Testes estatísticos para comparação de médias, **Revista Eletrônica Nutritime**, v.5, p.777–788, 2008.
68. Ottavioli, J., Casanova, J., Bighelli, A., Identification and quantitative determination of dipropylene glycol in terpene mixtures using ^{13}C NMR spectroscopy, **Spectroscopy Letters**, v.4, p.221–228, 2011.
69. Ouattara, Z. A., Boti, J. B., Ahibo, A. C., Casanova, J., Tomi, F., Bighelli, A., Analysis of *Cleistopholis patens* Leaf and Trunk Bark Oils Using Combined GC-Flame Ionisation Detection, GC-Retention Index, GC-MS and ^{13}C -NMR, **Phytochemical Analysis**, v.24, p.574–580, 2013.
70. Parikh, K. S., Gadape, H. H., **Quantitative NMR Spectroscopy in Pharmaceuticals. Method Development and Validation of Some Pharmaceutical by Modern Analytical Techniques**, First edition, Lap Lambert Academic Publishing & Co. KG, USA, 2011. 248p. ISBN 978-3-8454-7884-5.
71. Pauli, G. F. Goedecke, T., Jaki, B. U., Lankin, D. C., Quantitative ^1H NMR: Development and potential of an analytical method - an update, **Journal of Natural Products**, v.75, p.834–851, 2012.
72. Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, C. S. F., Melo, L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, v.27, p.771–780, 2004.
73. Rivero-Cruz, B., Rivero-Cruz, I., Rodriguez, J. M., Cerda-Garcia-Rojas, C. M., Mata, R., 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, p.1172–1176, 2006.

74. Rodrigues, J. E. A., Erny, G. L., Barros, A. S., Esteves, V. I., Brandão, T., Ferreira, A. A. Gil, A. M., Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR) based methods, **Analytica Chimica Acta**, v.674, p.166–175, 2010.
75. Santos, M. S., Colnago, L. A., Validação de método quantitativo por RMN de ^1H para análises de formulações farmacêuticas, **Química Nova**, v.36, p.324–330, 2013.
76. Salem, A. A., Mossa, H. A., Method validation and determinations of levofloxacin, metronidazole and sulfamethoxazole in an aqueous pharmaceutical, urine and blood plasma samples using quantitative nuclear magnetic resonance spectrometry, **Talanta**, v.88, p.104–114, 2012.
77. Schiffrin, A., Khatri, Y., Kirsch, P., Thiel, V., Schulz, S., Bernhardt, R., A single terpene synthase is responsible for a wide variety of sesquiterpenes in *Sorangium cellulosum* Soce56, **Organic Biomolecular Chemistry**, v.1, p. 3385–3393, 2016.
78. Sette, M., Lange, H., Crestini, C., Quantitative HSQC analyses of lignin: a practical comparison, **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.6, p.1-7, 2013.
79. Shen, S., Yao, J., Shi, Y., Quantitative proton nuclear magnetic resonance for the structural and quantitative analysis of atropine sulfate, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.89, p.118–21, 2014.
80. Siciliano, C., Belsito, E., De Marco, R., Di Gioia, M. L., Leggio, A., Liguori, A., Quantitative determination of fatty acid chain composition in pork meat products by high resolution ^1H NMR spectroscopy, **Food Chemistry**, v.136, p.46–554, 2013.
81. Silva, C. J., Barbosa, L. C. A., Maltha, C. R. A., Pinheiro, A. L., Ismail, F. M. D., Comparative study of the essential oils of seven *Melaleuca* (Myrtaceae) species grown in Brazil, **Flavor Fragrance Journal**, v.22, p.474–478, 2007.
82. Silva, C. J., Barbosa, L. C. A., Demuner, A. J., Montanari, R. M., Pinheiro, A. L., Dias, I., Andrade, N. J., Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of *myrtaceae* species planted in Brazil, **Química Nova**, v.33, p.104–108, 2010.
83. Silva-santos, A.; Antunes, A. M. S.; Bizzo, H. R.; D’avila, L. A Proteção patentária na utilização de óleos essenciais e compostos terpênicos para o desenvolvimento

- tecnológico e industrial. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.8, n.4, p.14-22, 2006.
84. Souza, S. A. M.; Meira, M. R.; Figueiredo, L. S.; Martins, E. R. Óleos essenciais: aspectos econômicos e sustentáveis. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**. Goiânia. v.6, n. 10, p.1-11, 2010.
85. Szafranek, B., Chrapkowska, K., Pawińska, M., Szafranek, J., Analysis of leaf surface sesquiterpenes in potato varieties., **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.2817–2822, 2005.
86. Tanaka, T., Maeda, K., Mikamiyama, H., Funakoshi, Y., Uenaka, K., Iwata, C., Synthetic Studies on Aromadendrane-Type Compounds. III. Stereoselective Total Syntheses of (+)-Aromadendrene and (-) Alloaromadendrene, **Tetrahedron**, v.52, p.4257-4268, 1996.
87. Tissandié, L., Gaysinski, M., Brévard, H., Meierhenrich, U. J., Filippi, J. J., Revisiting the Chemistry of Guaiacwood Oil: Identification and Formation Pathways of 5,11- and 10,11-Epoxyguaianes, **Journal of Natural Products**, v.80, p.526–537, 2017.
88. Tozoni, D., Zacaria, J., Vanderlinde, R., Delamare, A. P. L., Echeverrigaray, S. Degradation of citronellol, citronellal and citronellyl acetate by *Pseudomonas mendocina* IBPse 105, **Electronic Journal of Biotechnology**, v.13, p. 1-7, 2010.
89. Turek, C., Stintzing, F. C., Stability of Essential Oils: A Review, **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.12, p.40-53, 2013.
90. University of Ottawa NMR Facility Blog [internet]. Ottawa: Glen Facey. 2007 outubro - [citado em outubro de 2007]. Disponível em: u-of-o-nmr-facility.blogspot.com.br.
91. Valente, A. M. M. P., Boffo, E. F., Melo, I. S., Ferreira, A. G., Quantification of myco phenolic acid and citrinin produced by *Penicillium* sp. using ¹H NMR, **Applied Magnetic Resonance**, v.45, p.207–215, 2014.
92. Vichnewski, W., Eregoyazin and Eregoyazidin, Two New Guaianolides from *Eremanthus goyazensis*, **Journal of Organic Chemistry**, v.42, p.3910-3913, 1977.
93. Vila, R.; Santana, A. I.; Pérez-Rosés, R.; Valderrama, A.; Castelli, M. V.; Mendonça, S.; Zacchino, S.; Gupta, M.P.; Cañigüeral, S. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a

- new source of α -bisabolol. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 2510–2514, 2010.
94. Visentainer, J. V., Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos, **Química Nova**, v. 35, p. 274–279, 2012.
95. Wang, W., Ma, Guo, X., Zhao, M., Tu, P., Jiang, Y., A series of strategies for solving the shortage of reference standards for multi-components determination of traditional Chinese medicine, *Mahoniae Caulis* as a case, **Journal of Chromatography A**, v. 1412, p. 100–111, 2015.
96. Wider, G.; Dreier, L., Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy, **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 2571-2576, 2006.
97. Zhang, C., Ji, J., Ji, M., Fan, P., Acetylcholinesterase inhibitors and compounds promoting SIRT1 expression from *Curcuma xanthorrhiza*, **Phytochemistry Letters**, v.12, p.215–219, 2015.
98. Zheng, G.; Price, W. S., Solvent signal suppression in NMR, **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 56, p. 267–288, 2010.
99. Zeng, S., Kapur, A., Patankar, M. S., Xiong, M. P., Formulation, characterization, and antitumor properties of *trans*- and *cis*-citral in the 4T1 breast cancer xenograft mouse model, **Pharmaceutical Research**, v.32, p.2548–2558, 2015.
100. Zholonko, N. N., Tsibulin, V. V., Role of the orientational subsystem in the expansion of pure SF₆, CHCl₃, C₆H₆, CCl₄, and N₂O with Kr impurity, **Low Temperature Physics**, v.29, p.768-770, 2003.
101. Zuriarrain, A., Zuriarrain, J., Villar, M., Berregi, I., Quantitative determination of ethanol in cider by ¹H NMR spectrometry, **Food Control**, v.50, p.758–762, 2015.

DADOS SUPLEMENTARES 1 (S1)

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO EMPREGANDO RMN DE ^1H PARA QUANTIFICAÇÃO DE α -PINENO EM ÓLEOS ESSENCIAIS

Conteúdo:

1. Dados de validação do método de ^1H NMR (linearidade Tabelas S1.1 a S1.9; repetibilidade Tabelas S1.10 a S1.18; exatidão/precisão Tabelas S1.19 a S1.27; estabilidade do analito e do padrão interno em clorofórmio deuterado Tabelas S1.28 a S1.36; robustez Tabelas S1.37 a S1.45; limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), Tabela S1.46.
2. Dados da quantificação de α -pineno nas amostras de óleo essencial por RMN ^1H Tabela S1.47 e comparação do conteúdo de α -pineno obtido nas amostras de óleo essencial por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (NMR de ^1H), cromatografia gasosa usando padronização interna (CG-PI), externa (CG-PE) e normalização (CG-N), Tabela S1.48.
3. Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais usando cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização em chamas (CG-DIC), respectivamente (Tabelas S1.49 e S1.50).

Tabela S1.1. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno nos óleos essenciais usando o sinal em $\delta = 5,17-5,23$.

m (mg)	Rep	$\delta = 5,17-5,23$		m_{Pin} (mg)	M_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
4,92	1	509,56	632,61	4,98	5,00	0,02	0,46
	2	503,36	637,61	5,02			
	3	524,84	637,67	5,02			
9,84	1	1024,79	1290,09	10,15	10,07	0,07	0,70
	2	1078,26	1277,40	10,05			
	3	984,53	1272,77	10,01			
14,75	1	1693,20	1881,02	14,80	14,83	0,02	0,16
	2	1615,49	1885,44	14,83			
	3	1691,91	1886,99	14,85			
19,67	1	1680,95	2507,22	19,72	19,73	0,01	0,04
	2	1250,30	2509,29	19,75			
	3	2128,74	2508,27	19,73			
24,59	1	2760,49	3137,66	24,68	24,81	0,19	0,78
	2	1215,32	3140,23	24,70			
	3	2415,95	3181,36	25,03			
29,51	1	2708,50	3828,95	30,12	30,13	0,01	0,02
	2	1193,73	3828,51	30,12			
	3	2610,73	3830,05	30,13			
34,43	1	2138,33	4414,58	34,73	34,72	0,01	0,02
	2	2281,59	4414,47	34,74			
	3	2284,09	4412,85	34,72			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.2. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno nos óleos essenciais usando o sinal em $\delta = 2,35$.

m (mg)	Rep	$\delta = 2,35$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
4,92	1	482,31	636,05	5,00	5,00	0,02	0,43
	2	472,51	639,01	4,98			
	3	482,86	637,67	5,03			
9,84	1	952,47	1304,21	10,26	10,22	0,05	0,46
	2	1002,02	1300,46	10,23			
	3	922,49	1292,59	10,17			
14,75	1	1555,22	1912,05	15,04	14,99	0,06	0,40
	2	1505,78	1907,83	15,01			
	3	1609,49	1897,28	14,93			
19,67	1	1532,60	2561,49	20,15	20,16	0,03	0,16
	2	1130,73	2567,68	20,20			
	3	1800,57	2560,12	20,14			
24,59	1	2560,49	3195,72	25,14	25,04	0,16	0,63
	2	1128,32	3160,21	24,89			
	3	2236,54	3193,95	25,13			
29,51	1	2549,16	3831,87	30,15	30,15	0,00	0,01
	2	1108,47	3832,78	30,15			
	3	2449,59	3832,02	30,15			
34,43	1	1940,44	4491,47	35,34	35,16	0,18	0,50
	2	2140,65	4470,55	35,17			
	3	2110,82	4447,24	34,99			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.3. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno nos óleos essenciais usando o sinal em $\delta = 2,21$.

m (mg)	Rep.	$\delta = 2,21$		m_{Pin} (mg)	M_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
	1	483,84	1312,89	5,16			
4,92	2	474,33	1280,96	5,04	5,12	0,07	1,34
	3	489,24	1309,00	5,15			
	1	962,14	2662,24	10,47			
9,84	2	1006,64	2653,75	10,44	10,39	0,12	1,14
	3	919,24	2606,39	10,25			
	1	1569,10	3790,93	14,91			
14,75	2	1508,92	3893,37	15,31	15,05	0,23	1,55
	3	1585,05	3790,27	14,91			
	1	1548,97	5077,89	19,97			
19,67	2	1178,76	5159,37	20,29	20,14	0,16	0,80
	3	1896,36	5119,95	20,14			
	1	2595,91	6441,91	25,34			
24,59	2	1124,45	6355,92	25,00	25,37	0,39	1,54
	3	2232,69	6553,64	25,78			
	1	2504,45	7662,61	30,14			
29,51	2	1102,77	7736,25	30,43	30,29	0,15	0,48
	3	2413,33	7702,96	30,30			
	1	1963,88	9010,40	35,44			
34,43	2	2123,46	8852,21	34,82	35,08	0,32	0,93
	3	2111,67	8890,36	34,97			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.4. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno nos óleos essenciais usando o sinal em $\delta = 2,04-2,12$.

m (mg)	Rep	$\delta = 2,04-2,12$		m_{Pin} (mg)	M_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
	1	335,11	658,63	5,180			
4,92	2	329,50	645,53	5,080	5,14	0,06	1,08
	3	343,46	656,59	5,170			
	1	680,66	1296,25	10,20			
9,84	2	700,31	1299,08	10,22	10,15	0,09	0,93
	3	643,94	1277,12	10,05			
	1	1108,65	1845,05	14,52			
14,75	2	1066,98	1897,00	14,92	14,64	0,25	1,71
	3	1109,59	1839,13	14,47			
	1	1099,08	2461,24	19,36			
19,67	2	817,410	2513,66	19,78	19,61	0,22	1,12
	3	1421,68	2504,69	19,70			
	1	1812,68	3139,51	24,70			
24,59	2	783,530	3115,12	24,51	24,88	0,50	2,00
	3	1586,10	3234,74	25,45			
	1	1741,10	3741,76	24,44			
29,51	2	769,780	3808,78	29,96	29,77	0,29	0,99
	3	1697,47	3803,69	29,92			
	1	1429,70	4392,39	34,56			
34,43	2	1487,32	4293,91	33,78	34,28	0,43	1,27
	3	1480,78	4386,12	34,51			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.5. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno nos óleos essenciais usando o sinal em $\delta = 1,94$.

m (mg)	Rep	$\delta = 1,94$		m_{Pin} (mg)	M_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
	1	536,77	636,85	5,01			
4,92	2	531,01	623,84	4,91	4,95	0,05	1,05
	3	537,94	628,26	4,94			
	1	1090,36	1296,25	10,20			
9,84	2	1208,29	1299,08	10,22	10,15	0,09	0,93
	3	1043,80	1277,12	10,05			
	1	1797,43	1845,05	14,52			
14,75	2	1715,65	1897,00	14,92	14,64	0,25	1,71
	3	1794,12	1839,13	14,47			
	1	1752,22	2461,24	19,36			
19,67	2	1323,43	2513,66	19,78	19,61	0,22	1,12
	3	2236,34	2504,69	19,70			
	1	2958,77	3139,51	24,70			
24,59	2	1285,73	3115,12	24,51	24,88	0,50	2,00
	3	2563,66	3234,74	25,45			
	1	2808,05	3741,76	29,44			
29,51	2	1278,09	3808,78	29,96	29,77	0,29	0,99
	3	2780,76	3803,69	29,92			
	1	2298,95	4392,39	34,56			
34,43	2	2434,44	4293,91	33,78	34,28	0,43	1,27
	3	2409,45	4386,12	34,51			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.6. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno nos óleos essenciais usando o sinal em $\delta = 1,67$.

m (mg)	Rep	$\delta = 1,67$		m_{Pin} (mg)	M_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
4,92	1	2462,21	1877,05	4,92	4,94	0,02	0,47
	2	2448,43	1894,81	4,96			
	3	2505,91	1886,23	4,94			
9,84	1	4935,41	3861,61	10,12	10,07	0,17	1,64
	2	5252,22	3897,33	10,21			
	3	4757,26	3774,50	9,89			
14,75	1	8041,20	5612,98	14,70	14,74	0,03	0,23
	2	7746,38	5637,57	14,77			
	3	8249,59	5631,79	14,75			
19,67	1	8059,63	7513,38	19,68	19,72	0,06	0,29
	2	6084,49	7554,24	19,79			
	3	9545,71	7518,89	19,70			
24,59	1	13393,60	9386,58	24,59	24,55	0,04	0,16
	2	5883,79	9357,90	24,51			
	3	11413,90	9364,10	24,53			
29,51	1	13197,10	11266,83	29,52	29,50	0,01	0,04
	2	5757,73	11260,15	29,50			
	3	12575,50	11258,22	29,49			
34,43	1	9860,83	13137,65	34,42	34,50	0,17	0,49
	2	11122,90	13242,83	34,69			
	3	10937,10	13124,77	34,38			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.7. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno nos óleos essenciais usando o sinal em $\delta = 1,28$.

m (mg)	Rep	$\delta = 1,28$		m_{Pin} (mg)	M_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
4,92	1	4770,96	1866,38	4,89	4,90	0,01	0,25
	2	4729,27	1875,65	4,91			
	3	4752,84	1872,20	4,90			
9,84	1	9500,60	3832,58	10,04	10,01	0,10	1,00
	2	9995,11	3851,80	10,09			
	3	9423,59	3778,15	9,90			
14,75	1	15908,00	5590,82	14,65	14,63	0,09	0,63
	2	15437,80	5613,04	14,70			
	3	16185,00	5544,30	14,52			
19,67	1	15518,40	7513,70	19,68	19,67	0,01	0,06
	2	11477,40	7508,37	19,67			
	3	18336,70	7505,16	19,66			
24,59	1	26580,20	9358,69	24,52	24,51	0,08	0,34
	2	11740,70	932295	24,42			
	3	22894,30	9385,72	24,59			
29,51	1	25577,80	11269,57	29,52	29,58	0,13	0,45
	2	11676,80	11347,11	29,73			
	3	25230,50	11251,81	29,48			
34,43	1	19996,50	13154,91	34,46	34,44	0,03	0,08
	2	21958,10	13135,24	34,41			
	3	24414,10	13143,84	34,43			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.8. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno nos óleos essenciais usando o sinal em $\delta = 1,17$.

m (mg)	Rep	$\delta = 1,17$		m_{Pin} (mg)	M_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
4,92	1	877,40	635,01	5,00	5,01	0,02	0,47
	2	865,07	635,47	5,04			
	3	880,02	640,38	5,00			
9,84	1	1729,05	1282,58	10,09	10,12	0,05	0,52
	2	1847,31	1293,43	10,18			
	3	1717,22	1281,22	10,08			
14,75	1	2914,85	1914,45	15,06	15,03	0,04	0,27
	2	2828,87	1905,19	14,99			
	3	2989,51	1913,52	15,05			
19,67	1	2834,92	2559,33	20,13	20,14	0,05	0,23
	2	2095,49	2566,10	20,19			
	3	3314,78	2554,22	20,09			
24,59	1	4891,66	3194,11	25,13	25,12	0,03	0,10
	2	2139,78	3196,61	25,15			
	3	4189,44	3190,19	25,10			
29,51	1	4751,77	3832,05	30,15	30,15	0,01	0,05
	2	2138,12	3833,86	30,16			
	3	4683,90	3830,15	30,13			
34,43	1	3652,35	4473,42	35,19	35,24	0,15	0,43
	2	4069,65	4500,25	35,40			
	3	3941,79	4462,99	35,11			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.9. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno nos óleos essenciais usando o sinal em $\delta = 0,85$.

m (mg)	Rep	$\delta = 0,85$		m_{Pin} (mg)	M_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
4,92	1	4996,53	1875,06	4,91	4,91	0,00	0,06
	2	4933,52	1877,16	4,92			
	3	4978,62	1876,14	4,91			
9,84	1	9873,13	3786,09	9,92	9,91	0,07	0,67
	2	10473,00	3805,13	9,97			
	3	9809,20	3754,91	9,84			
14,75	1	16525,80	5606,38	14,69	14,71	0,04	0,26
	2	16048,70	5605,23	14,68			
	3	16959,10	5631,16	14,75			
19,67	1	16163,10	7590,00	19,88	19,77	0,09	0,48
	2	11914,70	7524,37	19,71			
	3	18811,50	7531,24	19,73			
24,59	1	27616,20	9358,70	24,52	23,43	1,94	8,27
	2	12225,30	9382,61	24,58			
	3	23681,20	8090,02	21,19			
29,51	1	26725,00	11263,74	29,51	29,50	0,01	0,02
	2	12131,20	11258,48	29,49			
	3	26276,40	11259,52	29,50			
34,43	1	20628,30	13136,28	34,41	34,41	0,01	0,03
	2	22918,40	13136,87	34,41			
	3	2299,80	13130,58	34,40			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.10. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 5,17-5,23 ppm.

m (mg)	Rep	$\delta = 5,17-5,23$		m_{Pin} (mg)	M_{mPin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
5,01	1	529,16	625,91	5,01			
	2	523,28	626,77	5,01	5,01	0,01	0,10
	3	260,39	625,52	5,00			
10,01	1	1018,62	1252,54	10,02			
	2	1021,05	1252,97	10,02	10,05	0,05	0,46
	3	1026,42	1262,85	10,10			
15,02	1	1597,68	1875,21	15,00			
	2	1615,02	1868,94	14,95	14,99	0,04	0,24
	3	1702,70	1877,60	15,02			
20,02	1	1731,93	2520,79	20,16			
	2	1090,48	2512,19	20,10	20,11	0,05	0,22
	3	2187,61	2510,17	20,08			
25,03	1	2559,95	3106,50	24,85			
	2	2300,93	3125,78	25,00	24,94	0,08	0,32
	3	2384,40	3120,71	24,96			
30,04	1	2624,04	3753,39	30,03			
	2	2595,12	3748,34	29,98	30,02	0,04	0,12
	3	2592,23	3757,45	30,06			
35,04	1	2213,52	4377,69	35,02			
	2	2220,16	4382,04	35,05	35,03	0,02	0,05
	3	2316,86	4378,79	35,03			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.11. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 2,35 ppm.

m (mg)	Rep	$\delta = 2,35$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
5,01	1	489,69	631,95	5,06	5,06	0,03	0,56
	2	477,60	635,77	5,09			
	3	523,77	628,73	5,03			
10,01	1	952,11	1258,34	10,07	10,06	0,05	0,46
	2	955,26	1262,33	10,10			
	3	949,08	1250,82	10,01			
15,02	1	1478,26	1875,42	15,00	14,96	0,09	0,62
	2	1508,55	1879,04	15,03			
	3	1604,84	1857,48	14,86			
20,02	1	1575,15	2502,44	20,02	20,25	0,27	1,32
	2	1578,25	2567,93	20,54			
	3	1841,11	2523,94	20,19			
25,03	1	2387,18	3148,38	25,19	25,32	0,13	0,50
	2	2200,71	3179,33	25,43			
	3	2205,90	3168,50	25,35			
30,04	1	2474,75	3791,07	30,33	30,29	0,05	0,15
	2	2438,01	3789,25	30,31			
	3	2435,56	3780,16	30,24			
35,04	1	2001,73	4551,00	36,41	35,97	0,48	1,32
	2	2079,15	4505,45	36,04			
	3	2146,02	4433,12	35,46			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.12. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 2,21 ppm.

m (mg)	Rep	$\delta = 2,21$		m_{Pin} (mg)	M_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
5,01	1	495,17	1259,20	5,04	5,05	0,03	0,61
	2	491,02	1256,70	5,03			
	3	519,28	1271,10	5,08			
10,01	1	950,81	2606,54	10,43	10,45	0,03	0,31
	2	942,76	2621,96	10,49			
	3	954,95	2610,14	10,44			
15,02	1	1488,89	3771,01	15,08	15,33	0,21	1,39
	2	1503,02	3862,31	15,45			
	3	1592,52	3864,81	15,46			
20,02	1	1611,07	5103,27	20,41	20,78	0,34	1,65
	2	1596,21	5272,69	21,09			
	3	1972,77	5211,94	20,85			
25,03	1	2369,77	6416,50	25,66	25,81	0,13	0,52
	2	2186,01	6457,43	25,83			
	3	2207,87	6482,68	25,93			
30,04	1	2418,51	7733,49	30,93	30,92	0,04	0,12
	2	2385,28	7738,69	30,95			
	3	2382,14	7720,57	30,88			
35,04	1	2036,59	9021,14	36,06	36,21	0,12	0,33
	2	2058,35	9060,12	36,24			
	3	2144,84	9079,63	36,32			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.13. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 2,04-2,12 ppm.

m (mg)	Rep	$\delta = 2,04-2,12$		m_{Pin} (mg)	M_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
5,01	1	347,33	636,83	5,09	5,08	0,02	0,36
	2	342,06	636,34	5,09			
	3	361,23	632,68	5,06			
10,01	1	669,52	1321,98	10,58	10,59	0,05	0,46
	2	663,53	1330,15	10,64			
	3	667,93	1318,34	10,55			
15,02	1	1053,14	1915,41	15,32	15,41	0,08	0,55
	2	1068,93	1935,88	15,49			
	3	1111,52	1929,76	15,44			
20,02	1	1135,06	2655,59	21,24	21,10	0,18	0,87
	2	1142,05	2612,23	21,90			
	3	1453,64	2647,09	21,18			
25,03	1	1688,68	3270,47	26,16	26,23	0,15	0,57
	2	1034,92	3300,00	26,40			
	3	1564,94	3265,82	26,12			
30,04	1	1691,12	3912,71	31,30	31,27	0,16	0,50
	2	1684,21	3887,47	31,10			
	3	1681,95	3925,72	31,40			
35,04	1	1475,12	4567,28	36,54	36,26	0,70	1,93
	2	1443,70	4597,54	36,78			
	3	1504,56	4433,07	35,46			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.14. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 1,94 ppm.

m (mg)	Rep	$\delta = 1,94$		m_{Pin} (mg)	M_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
5,01	1	560,96	616,19	4,93	4,95	0,02	0,36
	2	547,90	621,01	4,97			
	3	591,55	619,89	4,96			
10,01	1	1075,19	1258,34	10,07	10,10	0,03	0,32
	2	1065,21	1262,23	10,10			
	3	1074,57	1266,53	10,13			
15,02	1	1705,50	1875,72	15,00	15,01	0,02	0,15
	2	1709,53	1873,92	14,99			
	3	1801,46	1879,34	15,03			
20,02	1	1819,73	2559,92	20,48	20,37	0,17	0,83
	2	1817,18	2557,11	20,46			
	3	2285,16	2521,92	20,17			
25,03	1	2723,50	3133,91	25,07	25,15	0,17	0,66
	2	2358,74	3130,98	25,05			
	3	2533,27	3168,50	25,35			
30,04	1	2710,21	3788,53	30,31	30,23	0,07	0,24
	2	2745,31	3777,71	30,22			
	3	2742,67	3770,50	30,16			
35,04	1	2371,26	4225,30	36,20	35,97	0,44	1,22
	2	2360,14	4531,19	36,25			
	3	2447,78	4433,12	35,46			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.15. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 1,67 ppm.

m (mg)	Rep	$\delta = 1,67$ ppm		m _{Pin} (mg)	M _{mPin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I _{Pin}				
5,01	1	2553,03	1877,10	5,00	4,99	0,03	0,57
	2	2520,92	1884,06	5,02			
	3	2759,84	1863,13	4,96			
10,01	1	4930,41	3778,28	10,06	10,05	0,01	0,13
	2	4948,94	3768,73	10,04			
	3	5006,55	3772,79	10,05			
15,02	1	7623,68	5641,00	15,03	15,03	0,03	0,18
	2	7716,04	5652,65	15,06			
	3	8271,52	5632,95	15,01			
20,02	1	8378,17	7692,30	20,49	20,28	0,19	0,94
	2	8292,15	7554,22	20,12			
	3	9879,20	7589,58	20,22			
25,03	1	12145,20	9433,67	25,13	25,09	0,04	0,18
	2	11001,21	9426,39	25,11			
	3	11280,70	9402,01	25,04			
30,04	1	12742,20	11320,10	30,15	30,11	0,04	0,12
	2	12497,00	11303,34	30,11			
	3	12493,00	11292,32	30,08			
35,04	1	10236,60	13266,31	35,34	35,29	0,07	0,20
	2	10774,80	13217,05	35,21			
	3	11113,20	13255,64	35,31			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{mPin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.16. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 1,28 ppm.

m (mg)	Rep	$\delta = 1,28$		m_{Pin} (mg)	M_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
5,01	1	4979,26	1878,23	5,00	4,99	0,03	0,57
	2	4797,43	1883,94	5,02			
	3	5358,32	1863,13	4,96			
10,01	1	9608,71	3751,83	9,99	10,05	0,05	0,47
	2	9455,35	3785,92	10,08			
	3	9526,95	3777,25	10,06			
15,02	1	15139,00	5662,16	15,08	15,08	0,03	0,17
	2	15436,40	5649,75	15,05			
	3	16211,50	5668,95	15,10			
20,02	1	16005,80	7560,99	20,14	20,17	0,07	0,36
	2	16015,20	7604,60	20,26			
	3	18877,80	7555,48	20,13			
25,03	1	24550,30	9497,64	25,30	25,26	0,04	0,15
	2	22457,80	9481,91	25,26			
	3	22601,90	9469,83	25,23			
30,04	1	24761,00	11275,79	30,04	30,04	0,04	0,12
	2	25007,10	11293,17	30,08			
	3	25004,80	11267,34	30,01			
35,04	1	20683,90	13652,13	36,37	35,86	0,69	1,92
	2	21336,10	13538,88	36,06			
	3	21757,00	13159,65	35,05			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.17. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 1,17 ppm.

m (mg)	Rep	$\delta = 1,17$		m_{Pin} (mg)	M_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
5,01	1	917,62	630,68	5,05	5,04	0,01	0,25
	2	891,56	632,16	5,06			
	3	993,67	628,96	5,03			
10,01	1	1760,06	1259,53	10,08	10,10	0,05	0,52
	2	1735,85	1270,51	10,16			
	3	1744,86	1258,81	10,07			
15,02	1	2768,95	1876,52	15,01	15,09	0,08	0,52
	2	2822,79	1884,81	15,08			
	3	2991,97	1895,98	15,17			
20,02	1	2736,69	2517,75	20,14	20,07	0,06	0,31
	2	2831,56	2502,26	20,02			
	3	3426,26	2507,58	20,06			
25,03	1	4506,30	3135,05	25,08	25,18	0,09	0,34
	2	4070,90	3152,37	25,22			
	3	4138,48	3454,85	25,24			
30,04	1	4589,62	3758,56	30,07	30,08	0,04	0,14
	2	4636,38	3755,52	30,04			
	3	4633,44	3765,97	30,13			
35,04	1	3780,33	4519,86	35,16	35,59	0,57	1,60
	2	3943,22	4450,83	35,60			
	3	4005,17	4377,72	35,02			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.18. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 0,85 ppm.

m (mg)	Rep	$\delta = 0,85$		m_{Pin} (mg)	M_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)
		S/R	I_{Pin}				
5,01	1	5183,38	1880,96	5,01	5,00	0,03	0,67
	2	5021,77	1887,40	5,03			
	3	5599,97	1863,13	4,96			
10,01	1	10001,00	3797,10	10,11	10,11	0,13	1,24
	2	9843,53	3841,35	10,23			
	3	9949,80	3747,46	9,98			
15,02	1	15728,20	5630,46	15,00	14,99	0,06	0,43
	2	16032,90	5649,25	15,05			
	3	16901,50	5601,20	14,92			
20,02	1	15494,50	7628,65	20,32	20,11	0,22	1,11
	2	16001,20	7562,83	20,15			
	3	19456,10	7462,26	19,88			
25,03	1	25554,80	9354,62	24,92	24,94	0,04	0,17
	2	24979,60	9351,21	24,91			
	3	23389,60	9380,82	24,99			
30,04	1	25081,20	11112,03	29,60	29,84	0,21	0,70
	2	26030,42	11238,80	29,94			
	3	26027,90	11255,95	29,98			
35,04	1	21372,60	13254,16	35,31	35,19	0,12	0,34
	2	22249,40	13218,94	35,21			
	3	22660,10	13163,82	35,07			

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H usado para quantificação; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da massa de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.19. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 5,17-5,23 ppm.

Rep	$\delta = 5,17-5,23$		P_{Pin} (%)	Exa (%)	M_{Exa} (%)	DP (%)	CV (%)
	S/R	I_{Pin}					
1	529,16	625,91	97,92	99,92			
2	523,28	626,77	98,05	100,06	99,94	0,10	0,001
3	260,39	625,52	97,86	99,86			
1	1018,62	1252,54	97,98	99,98			
2	1021,05	1252,97	98,01	100,01	100,26	0,47	0,005
3	1026,42	1262,85	98,78	100,80			
1	1597,68	1875,21	97,79	99,78			
2	1615,02	1868,94	97,46	99,45	99,71	0,24	0,002
3	1702,70	1877,60	97,91	99,91			
1	1731,93	2520,79	98,59	100,60			
2	1090,48	2512,19	98,25	100,26	100,35	0,23	0,002
3	2187,61	2510,17	98,17	100,18			
1	2559,95	3106,50	97,20	99,18			
2	2300,93	3125,78	97,80	99,80	99,54	0,32	0,003
3	2384,40	3120,71	97,64	99,64			
1	2624,04	3753,39	97,87	99,86			
2	2595,12	3748,34	97,73	99,73	99,85	0,12	0,001
3	2592,23	3757,45	97,97	99,97			
1	2213,52	4377,69	97,84	99,83			
2	2220,16	4382,04	97,93	99,93	99,88	0,05	0,001
3	2316,86	4378,79	97,86	99,86			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; P_{Pin} = pureza calculada do α -pineno; Exa = exatidão; M_{Exa} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.20. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 2,35 ppm.

Rep	$\delta = 2,35$		P_{Pin} (%)	Exa (%)	M_{Exa} (%)	DP (%)	CV (%)
	S/R	I_{Pin}					
1	489,69	631,95	99,86	100,88			
2	477,60	635,77	99,46	101,49	100,91	0,56	0,006
3	523,77	628,73	98,36	100,37			
1	952,11	1258,34	98,43	100,44			
2	955,26	1262,33	98,74	100,76	100,34	0,47	0,005
3	949,08	1250,82	97,84	99,84			
1	1478,26	1875,42	97,80	99,79			
2	1508,55	1879,04	97,99	99,99	99,54	0,61	0,006
3	1604,84	1857,48	96,86	98,84			
1	1575,15	2502,44	97,87	99,87			
2	1578,25	2567,93	100,43	102,48	101,03	1,33	0,013
3	1841,11	2523,94	98,71	100,73			
1	2387,18	3148,38	98,51	100,52			
2	2200,71	3179,33	99,48	101,51	101,06	0,50	0,005
3	2205,90	3168,50	99,14	101,16			
1	2474,75	3791,07	98,85	100,87			
2	2438,01	3789,25	98,80	100,82	100,75	0,16	0,002
3	2435,56	3780,16	98,56	100,57			
1	2001,73	4551,00	101,71	103,79			
2	2079,15	4505,45	100,69	102,75	102,54	1,36	0,013
3	2146,02	4433,12	99,08	101,10			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; P_{Pin} = pureza calculada do α -pineno; Exa = exatidão; M_{Exa} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.21. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 2,21 ppm.

Rep	$\delta = 2,21$		P_{Pin} (%)	Exa (%)	M_{Exa} (%)	DP (%)	CV (%)
	S/R	I_{Pin}					
1	495,17	1259,20	98,50	100,51			
2	491,02	1256,70	98,30	100,31	100,76	0,61	0,006
3	519,28	1271,10	99,43	101,46			
1	950,81	2606,54	101,94	104,02			
2	942,76	2621,96	102,55	104,64	104,28	0,32	0,003
3	954,95	2610,14	102,08	104,17			
1	1488,89	3771,01	98,32	100,33			
2	1503,02	3862,31	100,71	102,76	101,97	1,42	0,014
3	1592,52	3864,81	100,77	102,83			
1	1611,07	5103,27	99,80	101,83			
2	1596,21	5272,69	103,11	105,21	103,68	1,71	0,017
3	1972,77	5211,94	101,92	104,00			
1	2369,77	6416,50	100,38	102,43			
2	2186,01	6457,43	101,02	103,08	103,00	0,53	0,005
3	2207,87	6482,68	101,42	103,49			
1	2418,51	7733,49	100,82	102,88			
2	2385,28	7738,69	100,89	102,95	102,84	0,12	0,001
3	2382,14	7720,57	100,65	102,71			
1	2036,59	9021,14	100,81	102,86			
2	2058,35	9060,12	101,24	103,31	103,24	0,34	0,003
3	2144,84	9079,63	101,46	103,53			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; P_{Pin} = pureza calculada do α -pineno; Exa = exatidão; M_{Exa} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.22. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 2,04-2,12 ppm.

Rep	$\delta = 2,04-2,12$		P_{Pin} (%)	Exa (%)	M_{Exa} (%)	DP (%)	CV (%)
	S/R	I_{Pin}					
1	347,33	636,83	99,63	101,66			
2	342,06	636,34	99,55	101,58	101,41	0,36	0,004
3	361,23	632,68	98,98	101,00			
1	669,52	1321,98	103,41	105,52			
2	663,53	1330,15	104,05	106,17	105,64	0,48	0,005
3	667,93	1318,34	103,12	105,23			
1	1053,14	1915,41	99,88	101,92			
2	1068,93	1935,88	100,95	103,01	102,54	0,56	0,005
3	1111,52	1929,76	100,63	102,69			
1	1135,06	2655,59	103,86	105,98			
2	1142,05	2612,23	102,17	104,25	105,29	0,92	0,009
3	1453,64	2647,09	103,53	105,64			
1	1688,68	3270,47	102,33	104,42			
2	1034,92	3300,00	103,25	105,36	104,68	0,59	0,006
3	1564,94	3265,82	102,18	104,27			
1	1691,12	3912,71	102,02	104,10			
2	1684,21	3887,47	101,36	103,43	103,99	0,52	0,005
3	1681,95	3925,72	102,36	104,45			
1	1475,12	4567,28	102,07	104,16			
2	1443,70	4597,54	102,75	104,85	103,37	2,00	0,019
3	1504,56	4433,07	99,07	101,10			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; P_{Pin} = pureza calculada do α -pineno; Exa = exatidão; M_{Exa} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.23. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 1,94 ppm.

Rep	$\delta = 1,94$		P_{Pin} (%)	Exa (%)	M_{Exa} (%)	DP (%)	CV (%)
	S/R	I_{Pin}					
1	560,96	616,19	96,48	98,45			
2	547,90	621,01	97,15	99,14	98,85	0,36	0,004
3	591,55	619,89	96,98	98,96			
1	1075,19	1258,34	98,43	100,44			
2	1065,21	1262,23	98,73	100,75	100,76	0,33	0,003
3	1074,57	1266,53	99,07	101,09			
1	1705,50	1875,72	97,81	99,81			
2	1709,53	1873,92	97,72	99,72	99,84	0,15	0,001
3	1801,46	1879,34	98,00	100,0			
1	1819,73	2559,92	100,12	102,16			
2	1817,18	2557,11	100,01	102,05	101,62	0,85	0,008
3	2285,16	2521,92	98,63	100,65			
1	2723,50	3133,91	98,06	100,06			
2	2358,74	3130,98	97,96	99,96	100,39	0,67	0,007
3	2533,27	3168,50	99,14	101,16			
1	2710,21	3788,53	98,78	100,80			
2	2745,31	3777,71	98,50	100,51	100,54	0,24	0,002
3	2742,67	3770,50	98,31	100,32			
1	2371,26	4225,30	101,14	103,20			
2	2360,14	4531,19	101,27	103,33	102,54	1,25	0,012
3	2447,78	4433,12	99,08	101,10			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; P_{Pin} = pureza calculada do α -pineno; Exa = exatidão; M_{Exa} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.24. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 1,67 ppm.

Rep	$\delta = 1,67$		P_{Pin} (%)	Exa (%)	M_{Exa} (%)	DP (%)	CV (%)
	S/R	I_{Pin}					
1	2553,03	1877,10	97,89	99,88			
2	2520,92	1884,06	98,25	100,25	99,76	0,57	0,006
3	2759,84	1863,13	97,16	99,14			
1	4930,41	3778,28	98,51	100,52			
2	4948,94	3768,73	98,27	100,27	100,39	0,13	0,001
3	5006,55	3772,79	98,37	100,38			
1	7623,68	5641,00	98,06	100,06			
2	7716,04	5652,65	98,26	100,26	100,08	0,18	0,002
3	8271,52	5632,95	97,92	99,91			
1	8378,17	7692,30	100,28	102,33			
2	8292,15	7554,22	98,48	100,49	101,26	0,95	0,009
3	9879,20	7589,58	98,94	100,96			
1	12145,20	9433,67	98,39	100,40			
2	11001,21	9426,39	98,31	100,32	100,26	0,18	0,002
3	11280,70	9402,01	98,06	100,06			
1	12742,20	11320,10	98,39	100,39			
2	12497,00	11303,34	98,24	100,25	100,26	0,12	0,001
3	12493,00	11292,32	98,14	100,15			
1	10236,60	13266,31	98,83	100,85			
2	10774,80	13217,05	98,46	100,47	100,69	0,20	0,002
3	11113,20	13255,64	98,75	100,77			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; P_{Pin} = pureza calculada do α -pineno; Exa = exatidão; M_{Exa} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.25. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 1,28 ppm.

Rep	$\delta = 1,28$		P_{Pin} (%)	Exa (%)	M_{Exa} (%)	DP (%)	CV (%)
	S/R	I_{Pin}					
1	4979,26	1878,23	97,43	99,41			
2	4797,43	1883,94	97,91	99,91	99,68	0,25	0,006
3	5358,32	1863,13	97,73	99,73			
1	9608,71	3751,83	100,03	102,07			
2	9455,35	3785,92	100,53	102,59	101,76	1,02	0,005
3	9526,95	3777,25	98,61	100,62			
1	15139,00	5662,16	97,28	99,27			
2	15436,40	5649,75	97,67	99,66	99,12	0,62	0,002
3	16211,50	5668,95	96,47	98,44			
1	16005,80	7560,99	98,06	100,06			
2	16015,20	7604,60	97,99	99,99	100,00	0,06	0,003
3	18877,80	7555,48	97,94	99,94			
1	24550,30	9497,64	97,71	99,70			
2	22457,80	9481,91	97,33	99,32	99,67	0,34	0,001
3	22601,90	9469,83	97,99	99,99			
1	24761,00	11275,79	98,05	100,05			
2	25007,10	11293,17	98,72	100,74	100,22	0,45	0,001
3	25004,80	11267,34	97,89	99,89			
1	20683,90	13652,13	98,10	100,10			
2	21336,10	13538,88	97,95	99,95	100,02	0,08	0,019
3	21757,00	13159,65	98,02	100,02			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; P_{Pin} = pureza calculada do α -pineno; Exa = exatidão; M_{Exa} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.26. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 1,17 ppm.

Rep	$\delta = 1,17$		P_{Pin} (%)	Exa (%)	M_{Exa} (%)	DP (%)	CV (%)
	S/R	I_{Pin}					
1	917,62	630,68	98,67	100,68			
2	891,56	632,16	98,90	100,92	100,67	0,26	0,003
3	993,67	628,96	98,40	100,40			
1	1760,06	1259,53	98,52	100,53			
2	1735,85	1270,51	99,38	101,41	100,81	0,52	0,005
3	1744,86	1258,81	98,47	100,48			
1	2768,95	1876,52	97,86	99,85			
2	2822,79	1884,81	98,29	100,29	100,35	0,52	0,005
3	2991,97	1895,98	98,87	100,89			
1	2736,69	2517,75	98,47	100,48			
2	2831,56	2502,26	97,87	99,86	100,14	0,31	0,003
3	3426,26	2507,58	98,07	100,07			
1	4506,30	3135,05	98,09	100,09			
2	4070,90	3152,37	98,63	100,65	100,49	0,34	0,003
3	4138,48	3454,85	98,71	100,73			
1	4589,62	3758,56	98,00	100,00			
2	4636,38	3755,52	97,92	99,92	100,04	0,14	0,001
3	4633,44	3765,97	98,19	100,20			
1	3780,33	4519,86	101,01	103,08			
2	3943,22	4450,83	99,47	101,50	101,47	1,62	0,016
3	4005,17	4377,72	97,84	99,83			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; P_{Pin} = pureza calculada do α -pineno; Exa = exatidão; M_{Exa} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.27. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleo essencial usando o sinal em 0,85 ppm.

Rep	$\delta = 0,85$		P_{Pin} (%)	Exa (%)	M_{Exa} (%)	DP (%)	CV (%)
	S/R	I_{Pin}					
1	5183,38	1880,96	98,09	100,09			
2	5021,77	1887,40	98,42	100,43	99,89	0,67	0,007
3	5599,97	1863,13	97,16	99,14			
1	10001,00	3797,10	99,01	101,03			
2	9843,53	3841,35	100,16	102,20	100,98	1,25	0,012
3	9949,80	3747,46	97,71	99,70			
1	15728,20	5630,46	97,87	99,87			
2	16032,90	5649,25	98,20	100,20	99,81	0,43	0,004
3	16901,50	5601,20	97,36	99,35			
1	15494,50	7628,65	99,45	101,48			
2	16001,20	7562,83	98,60	100,61	100,45	1,11	0,011
3	19456,10	7462,26	97,29	99,27			
1	25554,80	9354,62	97,56	99,56			
2	24979,60	9351,21	97,53	99,52	99,64	0,17	0,002
3	23389,60	9380,82	97,84	99,83			
1	25081,20	11112,03	96,58	98,55			
2	26030,42	11238,80	97,68	99,67	99,35	0,70	0,007
3	26027,90	11255,95	97,83	99,83			
1	21372,60	13254,16	98,74	100,75			
2	22249,40	13218,94	98,48	100,49	100,44	0,35	0,003
3	22660,10	13163,82	98,07	100,07			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; P_{Pin} = pureza calculada do α -pineno; Exa = exatidão; M_{Exa} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.28. Avaliação da estabilidade do analito α -pineno e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano em clorofórmio deuterado usando o sinal em 5,17-5,23 ppm obtido no espectro de RMN de ^1H do α -pineno.

Intervalo de tempo	Rep	$\delta = 5,17-5,23$			m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
		S/R	I_{Pin}						
Inicial (0 h)	1	1680,95	2507,22	19,72					
	2	1250,30	2509,29	19,75	19,73	0,01	0,24	NA	
	3	2128,74	2507,27	19,73					
Após 6 h	1	1451,31	2554,23	20,12					
	2	1118,82	2543,62	20,17	20,17	0,05	0,26	2,21	
	3	2189,95	2536,03	20,22					
Após 12 h	1	1648,65	2554,23	20,10					
	2	1068,73	2536,93	20,11	20,12	0,03	0,13	1,55	
	3	2190,71	2544,10	20,15					
Após 18 h	1	1667,38	2554,23	20,09					
	2	1108,75	2549,81	20,20	20,12	0,07	0,36	1,27	
	3	2156,49	2535,36	20,06					
Após 24 h	1	1079,23	2554,23	20,10					
	2	1357,09	2540,65	20,15	20,11	0,04	0,21	1,08	
	3	2075,51	2554,39	20,07					
M1 (%)				20,05					
DP1 (%)				0,18					
CV1 (%)				0,90					

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = não aplicável; D - diferença em porcentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H NMR nos diferentes intervalos de tempo analisados; M_1 = média das massas encontradas em todos os intervalos de tempos analisados; DP_1 = desvio padrão das massas de α -pineno encontrada em todos os intervalos de tempo analisados; CV_1 = coeficiente de variação em todos os intervalos de tempo analisados.

Tabela S1.29. Avaliação da estabilidade do analito α -pineno e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano em clorofórmio deuterado usando o sinal em 2,35 ppm obtido no espectro de RMN de ^1H do α -pineno.

Intervalo de tempo	Rep	$\delta = 2,35$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
		S/R	I_{Pin}					
Inicial (0 h)	1	1532,60	2561,49	20,15				
	2	1130,73	2567,68	20,20	20,16	0,03	0,16	NA
	3	1800,57	2560,12	20,14				
Após 6 h	1	1313,11	2595,88	20,42				
	2	1012,64	2542,94	20,01	20,17	0,22	1,09	0,85
	3	1843,75	2553,82	20,09				
Após 12 h	1	1501,91	2617,75	20,59				
	2	961,816	2549,00	20,05	20,09	0,30	1,49	0,85
	3	1844,4	2554,15	20,09				
Após 18 h	1	1506,72	2609,23	20,53				
	2	996,966	2578,87	20,29	20,30	0,22	1,07	0,56
	3	1822,16	2554,26	20,09				
Após 24 h	1	972,646	2609,21	20,53				
	2	1226,15	2540,46	19,99	20,14	0,34	1,67	0,78
	3	1757,78	2530,47	19,91				
				M1 (%)	20,17			
				DP1 (%)	0,08			
				CV1 (%)	0,39			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = não aplicável; D - diferença em porcentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H NMR nos diferentes intervalos de tempo analisados; M_1 = média das massas encontradas em todos os intervalos de tempos analisados; DP_1 = desvio padrão das massas de α -pineno encontrada em todos os intervalos de tempo analisados; CV_1 = coeficiente de variação em todos os intervalos de tempo analisados.

Tabela S1.30. Avaliação da estabilidade do analito α -pineno e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano em clorofórmio deuterado usando o sinal em 2,21 ppm obtido no espectro de RMN de ^1H do α -pineno.

Intervalo de tempo	Rep	$\delta = 2,21$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
		S/R	I_{Pin}					
Inicial (0 h)	1	1548,97	5077,89	19,97				
	2	1178,76	5159,37	20,29	20,14	0,16	0,80	NA
	3	1896,36	5119,95	20,14				
Após 6 h	1	1344,40	5293,08	20,82				
	2	1046,83	5273,63	20,74	20,72	0,11	0,55	2,91
	3	1962,75	5236,28	20,60				
Após 12 h	1	1533,84	5334,21	20,98				
	2	995,951	5313,87	20,90	20,83	0,21	0,99	2,72
	3	1955,46	5235,44	20,59				
Após 18 h	1	1554,69	5313,73	20,90				
	2	1038,59	5286,16	20,79	20,78	0,13	0,63	2,11
	3	1933,89	5247,34	20,64				
Após 24 h	1	1007,03	5367,84	21,11				
	2	1253,92	5287,45	20,80	20,84	0,26	1,24	2,00
	3	1868,24	5237,99	20,60				
M1 (%)				20,66				
DP1 (%)				0,30				
CV1 (%)				1,43				

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = não aplicável; D - diferença em percentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H NMR nos diferentes intervalos de tempo analisados; M_1 = média das massas encontradas em todos os intervalos de tempos analisados; DP_1 = desvio padrão das massas de α -pineno encontrada em todos os intervalos de tempo analisados; CV_1 = coeficiente de variação em todos os intervalos de tempo analisados.

Tabela S1.31. Avaliação da estabilidade do analito α -pineno e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano em clorofórmio deuterado usando o sinal em 2,04-2,12 ppm obtido no espectro de RMN de ^1H do α -pineno.

Intervalo de tempo	Rep	$\delta = 2,04-2,12$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
		S/R	I_{Pin}					
Inicial (0 h)	1	1099,08	2461,24	19,36				
	2	817,41	2513,66	19,78	19,61	0,22	1,12	NA
	3	1421,68	2504,69	19,70				
Após 6 h	1	946,89	2667,96	20,99				
	2	728,87	2669,02	21,00	21,00	0,01	0,04	7,06
	3	1455,57	2670,01	21,01				
Após 12 h	1	1081,53	2614,22	20,57				
	2	693,15	2667,18	20,98	20,85	0,24	1,17	6,28
	3	1455,99	2668,22	20,99				
Após 18 h	1	1090,62	2650,26	20,85				
	2	720,69	2662,31	20,94	20,93	0,08	0,36	6,72
	3	1438,88	2669,26	21,00				
Após 24 h	1	700,85	2609,85	20,53				
	2	883,75	2600,21	20,46	20,64	0,25	1,24	5,23
	3	1388,34	2660,53	20,93				
				M1 (%)	20,61			
				DP1 (%)	0,57			
				CV1 (%)	2,78			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = não aplicável; D - diferença em porcentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H NMR nos diferentes intervalos de tempo analisados; M = média das massas encontradas em todos os intervalos de tempos analisados; DP₁ = desvio padrão das massas de α -pineno encontrada em todos os intervalos de tempo analisados; CV₁ = coeficiente de variação em todos os intervalos de tempo analisados.

Tabela S1.32. Avaliação da estabilidade do analito α -pineno e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano em clorofórmio deuterado usando o sinal em 1,94 ppm obtido no espectro de RMN de ^1H do α -pineno.

Intervalo de tempo	Rep	$\delta = 1,94$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
		S/R	I_{Pin}					
Inicial (0 h)	1	1752,22	2461,24	19,36				
	2	1323,43	2513,66	19,78	19,61	0,22	1,12	NA
	3	2236,34	2504,69	19,70				
Após 6 h	1	1517,53	2590,68	20,38				
	2	1176,89	2564,37	20,17	20,24	0,12	0,62	3,19
	3	2287,34	2562,25	20,16				
Após 12 h	1	1732,62	2578,55	20,29				
	2	1119,04	2558,95	20,13	20,23	0,08	0,41	2,46
	3	2287,46	2575,88	20,26				
Após 18 h	1	1753,78	2568,07	20,20				
	2	1165,58	2563,26	20,17	20,17	0,03	0,16	1,87
	3	2260,92	2559,72	20,14				
Após 24 h	1	1131,61	2576,84	20,27				
	2	1415,27	2555,79	20,11	20,20	0,08	0,41	1,69
	3	2181,83	2568,56	20,21				
				M1 (%)	20,09			
				DP1 (%)	0,27			
				CV1 (%)	1,34			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = não aplicável; D - diferença em porcentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H NMR nos diferentes intervalos de tempo analisados; M_1 = média das massas encontradas em todos os intervalos de tempos analisados; DP_1 = desvio padrão das massas de α -pineno encontrada em todos os intervalos de tempo analisados; CV_1 = coeficiente de variação em todos os intervalos de tempo analisados.

Tabela S1.33. Avaliação da estabilidade do analito α -pineno e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano em clorofórmio deuterado usando o sinal em 1,67 ppm obtido no espectro de RMN de ^1H do α -pineno.

Intervalo de tempo	$\delta = 1,67$			m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
	Rep	S/R	I_{Pin}					
Inicial (0 h)	1	8059,63	7513,38	19,68				
	2	6084,49	7554,24	19,79	19,72	0,06	0,29	NA
	3	9545,71	7518,89	19,70				
Após 6 h	1	6981,20	7589,09	19,90				
	2	5403,22	7659,75	20,09	20,03	0,11	0,55	1,55
	3	9821,73	7663,99	20,10				
Após 12 h	1	7974,49	7560,09	19,83				
	2	5134,50	7547,71	19,79	19,90	0,17	0,83	0,74
	3	9780,64	7662,54	20,09				
Após 18 h	1	8077,67	7661,67	19,83				
	2	5355,20	7660,28	20,09	19,93	0,14	0,68	0,72
	3	9659,68	7583,76	19,89				
Após 24 h	1	5193,22	7662,79	20,09				
	2	6507,67	7664,98	20,10	20,09	0,02	0,10	1,05
	3	9325,21	7650,80	20,06				
M1 (%)				19,93				
DP1 (%)				0,14				
CV1 (%)				0,71				

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = não aplicável; D - diferença em percentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H NMR nos diferentes intervalos de tempo analisados; M_1 = média das massas encontradas em todos os intervalos de tempos analisados; DP_1 = desvio padrão das massas de α -pineno encontrada em todos os intervalos de tempo analisados; CV_1 = coeficiente de variação em todos os intervalos de tempo analisados.

Tabela S1.34. Avaliação da estabilidade do analito α -pineno e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano em clorofórmio deuterado usando o sinal em 1,28 ppm obtido no espectro de RMN de ^1H do α -pineno.

Intervalo de tempo	Rep	$\delta = 1,28$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
		S/R	I_{Pin}					
Inicial (0 h)	1	15518,40	7513,38	19,68				
	2	11477,74	7554,24	19,67	19,67	0,01	0,06	NA
	3	18336,70	7518,89	19,66				
Após 6 h	1	1334,97	7589,09	19,76				
	2	10260,70	7659,75	20,32	20,08	0,28	1,41	2,05
	3	18859,50	7663,99	20,14				
Após 12 h	1	15247,90	7721,91	20,25				
	2	9760,26	7605,13	19,94	20,09	0,15	0,77	1,69
	3	1883,79	7651,82	20,07				
Após 18 h	1	15384,50	7717,16	20,24				
	2	10135,90	7742,40	20,30	20,26	0,04	0,18	1,99
	3	18617,20	7719,79	20,24				
Após 24 h	1	9867,88	7761,17	20,35				
	2	12470,70	7659,07	20,08	20,17	0,16	0,79	1,44
	3	17968,90	7652,84	20,07				
				M1 (%)	20,05			
				DP1 (%)	0,23			
				CV1 (%)	1,13			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = não aplicável; D - diferença em porcentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H NMR nos diferentes intervalos de tempo analisados; M_1 = média das massas encontradas em todos os intervalos de tempos analisados; DP_1 = desvio padrão das massas de α -pineno encontrada em todos os intervalos de tempo analisados; CV_1 = coeficiente de variação em todos os intervalos de tempo analisados.

Tabela S1.35. Avaliação da estabilidade do analito α -pineno e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano em clorofórmio deuterado usando o sinal em 1,17 ppm obtido no espectro de RMN de ^1H do α -pineno.

Intervalo de tempo	Rep	$\delta = 1,17$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
		S/R	I_{Pin}					
Inicial (0 h)	1	2834,92	2559,33	20,13				
	2	2095,49	2566,10	20,19	20,14	0,05	0,23	NA
	3	3314,78	2554,22	20,09				
Após 6 h	1	2449,12	2599,93	20,45				
	2	1867,64	2563,50	20,17	20,28	0,15	0,75	0,77
	3	3419,04	2570,34	20,22				
Após 12 h	1	2799,07	2587,74	20,36				
	2	1775,05	2556,13	20,11	20,20	0,13	0,66	0,47
	3	3412,70	2561,00	20,15				
Após 18 h	1	2829,33	2583,67	20,33				
	2	1847,37	2567,21	20,20	20,19	0,13	0,66	0,26
	3	3371,04	2549,70	20,06				
Após 24 h	1	1795,16	2576,30	20,27				
	2	2283,32	2561,19	20,15	20,16	0,10	0,50	0,19
	3	3253,12	2550,66	20,07				
				M1 (%)	20,19			
				DP1 (%)	0,05			
				CV1 (%)	0,27			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = não aplicável; D - diferença em porcentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H NMR nos diferentes intervalos de tempo analisados; M_1 = média das massas encontradas em todos os intervalos de tempos analisados; DP_1 = desvio padrão das massas de α -pineno encontrada em todos os intervalos de tempo analisados; CV_1 = coeficiente de variação em todos os intervalos de tempo analisados.

Tabela S1.36. Avaliação da estabilidade do analito α -pineno e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano em clorofórmio deuterado usando o sinal em 0,85 ppm obtido no espectro de RMN de ^1H do α -pineno.

Intervalo de tempo	$\delta = 0,85$							
	Rep	S/R	I_{Pin}	mPin (mg)	M_{mPin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
Inicial (0 h)	1	16163,10	7587,47	19,88				
	2	11914,70	7565,22	19,71	19,77	0,09	0,48	NA
	3	18811,50	7574,24	19,73				
Após 6 h	1	13929,60	7600,14	19,93				
	2	10660,20	7566,27	19,84	19,88	0,04	0,23	0,54
	3	19407,40	7578,64	19,87				
Após 12 h	1	15908,20	7539,02	19,77				
	2	10151,90	7588,27	19,90	19,85	0,07	0,36	0,65
	3	19366,60	7582,46	19,88				
Após 18 h	1	16025,00	7545,00	19,79				
	2	10519,60	7578,89	19,87	19,85	0,06	0,28	0,47
	3	19120,20	7583,76	19,89				
Após 24 h	1	10260,30	7585,07	19,89				
	2	13001,90	7567,36	19,84	19,89	0,05	0,23	0,33
	3	18446,00	7602,01	19,94				
M1 (%)					19,85			
DP1					0,05			
CV1					0,24			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse do α -pineno no espectro de RMN de ^1H ; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; M_{mPin} = média da quantidade de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = não aplicável; D - diferença em percentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H NMR nos diferentes intervalos de tempo analisados; M_1 = média das massas encontradas em todos os intervalos de tempos analisados; DP_1 = desvio padrão das massas de α -pineno encontrada em todos os intervalos de tempo analisados; CV_1 = coeficiente de variação em todos os intervalos de tempo analisados.

Tabela S1.37. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleos essenciais usando o sinal em 5,17-5,23 ppm.

Parâmetro	m (mg)	Rep	$\delta = 5,17-5,23$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
			S/R	I_{Pin}					
nt = 8; temperatura controlada 25 °C	4,92	1	340,75	629,50	4,95				
		2	401,34	632,28	4,97	4,97	0,01	0,23	0,76
		3	431,33	631,60	4,97				
	19,67	1	1543,67	2498,70	19,66				
		2	1191,34	2510,53	19,75	19,70	0,05	0,24	0,20
		3	1221,36	2503,29	19,69				
	34,43	1	1585,76	4450,75	35,01				
		2	1017,45	4429,58	34,85	34,87	0,14	0,40	0,41
		3	1599,54	4415,33	34,74				
nt = 16; sem controle de temperatura	4,92	1	646,95	632,52	4,98				
		2	640,52	632,39	4,98	4,98	0,00	0,03	0,53
		3	640,96	632,76	4,98				
	19,67	1	496,52	2483,36	19,54				
		2	1251,75	2506,59	19,72	19,65	0,10	0,49	0,43
		3	1634,74	2502,21	19,69				
	34,43	1	2230,23	4383,76	34,49				
		2	1198,65	4394,63	34,57	34,50	0,07	0,20	0,65
		3	2537,41	4377,69	34,44				

m = quantidade de α -pineno pesada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse no espectro de RMN de ^1H do α -pineno; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada ; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; D = diferença em percentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H nas diferentes condições.

Tabela S1.38. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleos essenciais usando o sinal em 2,35 ppm.

Parâmetro	m (mg)	Rep	$\delta = 2,35$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)	
			S/R	I_{Pin}						
nt = 8; temperatura controlada 25 °C	4,92	1	223,38	639,64	5,03					
		2	372,14	634,80	4,99	5,02	0,02	0,43	0,28	
		3	403,92	639,46	5,03					
	19,67	1	1440,69	2582,65	20,32					
		2	1085,60	2564,64	20,18	20,26	0,08	0,38	0,57	
		3	1122,62	2579,98	20,30					
	34,43	1	1468,48	4469,28	35,16					
		2	938,96	4481,70	35,26	35,24	0,07	0,19	0,54	
		3	1505,16	4486,01	35,29					
	nt = 16; sem controle de temperatura	4,92	1	610,04	637,50	5,02				
			2	599,19	636,17	5,00	5,03	0,03	0,63	0,46
			3	590,01	643,66	5,06				
19,67		1	510,71	2575,39	20,26					
		2	1169,44	2574,22	20,25	20,28	0,04	0,19	0,57	
		3	1553,45	2583,34	20,32					
34,43		1	2091,69	4486,01	35,29					
		2	1131,38	4454,85	35,05	35,16	0,12	0,35	0,31	
		3	2386,29	4467,31	35,14					

m = quantidade de α -pineno pesada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse no espectro de RMN de ^1H do α -pineno; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada ; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; D = diferença em percentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H nas diferentes condições.

Tabela S1.39. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleos essenciais usando o sinal em 2,21 ppm.

Parâmetro	m (mg)	Rep	$\delta = 2,21$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)	
			S/R	I_{Pin}						
nt = 8; temperatura controlada 25 °C	4,92	1	323,74	1290,94	5,08	5,07	0,03	0,57	1,63	
		2	373,62	1293,55	5,09					
		3	398,39	1279,80	5,03					
	19,67	1	1438,56	5102,03	20,07	20,22	0,13	0,65	0,53	
		2	1100,41	5148,96	20,25					
		3	1111,68	5166,93	20,32					
	34,43	1	1451,69	9084,18	35,73	35,61	0,48	1,36	1,52	
		2	944,93	8917,30	35,08					
		3	1474,84	9156,70	36,02					
	nt = 16; sem controle de temperatura	4,92	1	606,61	1302,92	5,13	5,09	0,06	1,15	0,51
			2	588,90	1277,08	5,02				
			3	594,84	1302,78	5,12				
19,67		1	501,74	5042,27	19,83	20,16	0,28	1,39	0,57	
		2	1155,86	5166,40	20,32					
		3	1501,16	5164,02	20,31					
34,43		1	2049,28	9039,56	35,56	35,24	0,42	1,19	0,57	
		2	1088,61	8838,75	34,77					
		3	2334,90	8999,17	35,40					

m = quantidade de α -pineno pesada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse no espectro de RMN de ^1H do α -pineno; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada ; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; D = diferença em percentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H nas diferentes condições.

Tabela S1.40. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleos essenciais usando o sinal em 2,04-2,12 ppm.

Parâmetro	m (mg)	Rep	$\delta = 2,04-2,12$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)	
			S/R	I_{Pin}						
nt = 8; temperatura controlada 25 °C	4,92	1	242,01	660,94	5,20	5,13	0,06	1,25	0,43	
		2	267,32	644,66	5,07					
		3	282,13	651,40	5,12					
	19,67	1	1021,26	2477,49	19,49	19,70	0,28	1,41	0,81	
		2	784,01	2544,71	20,02					
		3	792,33	2491,57	19,60					
	34,43	1	1032,93	4400,99	34,62	34,67	0,46	1,33	1,15	
		2	663,14	4352,31	34,24					
		3	1047,95	4468,72	35,16					
	nt = 16; sem controle de temperatura	4,92	1	419,79	656,33	5,16	5,14	0,05	1,01	0,21
			2	416,92	645,90	5,08				
			3	417,90	658,11	5,18				
19,67		1	324,26	2429,70	19,11	19,60	0,45	2,28	0,80	
		2	810,27	2541,18	19,99					
		3	1063,16	2504,03	19,70					
34,43		1	1454,30	4417,12	34,75	34,42	0,36	1,04	0,47	
		2	760,78	4326,71	34,04					
		3	1647,20	4382,88	34,48					

m = quantidade de α -pineno pesada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse no espectro de RMN de ^1H do α -pineno; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada ; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; D = diferença em percentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H nas diferentes condições.

Tabela S1.41. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleos essenciais usando o sinal em 1,94 ppm.

Parâmetro	m (mg)	Rep	$\delta = 1,9$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)	
			S/R	I_{Pin}						
nt = 8; temperatura controlada 25 °C	4,92	1	310,44	631,45	4,97					
		2	431,54	618,89	4,87	4,92	0,05	1,00	0,72	
		3	454,67	624,94	4,92					
	19,67	1	1668,72	2453,41	19,30					
		2	1291,31	2494,73	19,63	19,58	0,26	1,35	0,56	
		3	1341,52	2519,72	19,82					
	34,43	1	1687,14	4414,84	34,73					
		2	1098,79	4297,45	33,81	34,43	0,54	1,57	0,44	
		3	1716,69	4417,97	34,76					
	nt = 16; sem controle de temperatura	4,92	1	684,38	637,51	5,02				
			2	675,19	626,04	4,93	4,97	0,05	0,92	0,25
			3	681,082	630,11	4,96				
19,67		1	536,27	2415,70	19,00					
		2	1340,35	2509,18	19,75	19,49	0,42	2,16	0,71	
		3	1726,47	2507,18	19,72					
34,43		1	2361,50	4423,11	34,80					
		2	1260,30	4335,51	34,11	34,59	0,42	1,22	0,91	
		3	2696,57	4432,80	34,87					

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse no espectro de RMN de ^1H do α -pineno; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; D = diferença em porcentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H nas diferentes condições.

Tabela S1.42. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleos essenciais usando o sinal em 1,67 ppm.

Parâmetro	m (mg)	Rep	$\delta = 1,67$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)	
			S/R	I_{Pin}						
nt = 8; temperatura controlada 25 °C	4,92	1	1299,55	1870,53	4,90					
		2	1901,57	1901,20	4,98	4,95	0,04	0,87	0,40	
		3	2093,77	1896,20	4,97					
	19,67	1	7536,88	7555,26	19,79					
		2	5706,63	7614,83	19,95	19,78	0,17	0,87	0,61	
		3	6223,32	7483,11	19,60					
	34,43	1	7603,05	13219,19	34,63					
		2	4919,90	13285,84	34,80	34,69	0,10	0,29	0,55	
		3	7744,65	13217,66	34,63					
	nt = 16; sem controle de temperatura	4,92	1	3184,36	1889,91	4,95				
			2	3083,73	1905,96	4,99	4,98	0,02	0,44	0,71
			3	3091,65	1902,38	4,98				
19,67		1	2684,24	7582,03	19,86					
		2	6051,17	7607,19	19,93	19,91	0,04	0,21	0,95	
		3	7923,17	7611,62	19,94					
34,43		1	10748,3	13254,76	34,72					
		2	5999,07	13270,14	34,76	34,65	0,16	0,45	0,46	
		3	12221,50	13160,45	34,48					

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse no espectro de RMN de ^1H do α -pineno; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada ; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; D = diferença em percentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H nas diferentes condições.

Tabela S1.43. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleos essenciais usando o sinal em 1,28 ppm.

Parâmetro	m (mg)	Rep	$\delta = 1,28$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)	
			S/R	I_{Pin}						
nt = 8; temperatura controlada 25 °C	4,92	1	1763,42	1855,75	4,86					
		2	3800,46	1875,14	4,91	4,91	0,04	0,91	0,51	
		3	4149,54	1889,58	4,95					
	19,67	1	15015,0	7451,23	19,52					
		2	11242,40	7506,26	19,66	19,67	0,15	0,74	0,54	
		3	12275,30	7562,54	10,81					
	34,43	1	15257,30	13144,85	34,44					
		2	9905,36	13138,74	34,42	34,44	0,03	0,07	0,07	
		3	15457,50	13157,66	34,47					
	nt = 16; sem controle de temperatura	4,92	1	6253,76	1876,54	4,92				
			2	6191,18	1890,72	4,95	4,94	0,02	0,38	0,68
			3	6124,57	1885,04	4,94				
19,67		1	5284,86	7500,12	19,65					
		2	12247,00	7544,36	19,76	19,78	0,14	0,71	0,67	
		3	16024,30	7606,25	19,93					
34,43		1	21575,80	13149,25	34,45					
		2	11652,90	13213,12	34,61	34,51	0,09	0,26	0,26	
		3	24343,40	13161,64	34,48					

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse no espectro de RMN de ^1H do α -pineno; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada ; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; D = diferença em porcentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H nas diferentes condições.

Tabela S1.44. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleos essenciais usando o sinal em 1,17 ppm.

Parâmetro	m (mg)	Rep	$\delta = 1,17$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)	
			S/R	I_{Pin}						
nt = 8; temperatura controlada 25 °C	4,92	1	315,83	636,56	5,01					
		2	700,49	640,11	5,04	5,04	0,03	0,69	0,58	
		3	767,80	645,32	5,08					
	19,67	1	2761,73	2568,90	20,21					
		2	2059,63	2580,48	20,30	20,20	0,11	0,54	0,33	
		3	2288,87	2553,09	20,09					
	34,43	1	2839,65	4503,10	35,43					
		2	1826,84	4492,91	35,35	35,37	0,05	0,13	0,50	
		3	2876,30	4393,48	35,35					
	nt = 16; sem controle de temperatura	4,92	1	1159,21	631,07	4,96				
			2	1136,02	638,24	5,02	5,02	0,06	1,11	0,61
			3	1134,69	645,26	5,08				
19,67		1	950,44	2583,12	20,32					
		2	2246,88	2577,36	20,28	20,29	0,02	0,12	0,77	
		3	2960,02	2577,99	20,28					
34,43		1	4026,94	4468,94	35,16					
		2	2162,48	4482,21	35,26	35,11	0,18	0,52	0,36	
		3	4545,08	4437,18	34,91					

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse no espectro de RMN de ^1H do α -pineno; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada ; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; D = diferença em percentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H nas diferentes condições.

Tabela S1.45. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H para determinação de α -pineno em óleos essenciais usando o sinal em 0,85 ppm.

Parâmetro	m (mg)	Rep	$\delta = 0,85$		m_{Pin} (mg)	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
			S/R	I_{Pin}					
nt = 8; temperatura controlada 25 °C	4,92	1	1768,22	1875,78	4,91				
		2	3959,75	1871,02	4,90	4,91	0,01	0,29	0,22
		3	4312,20	1881,70	4,93				
	19,67	1	15632,40	7587,47	19,88				
		2	11697,30	7562,22	19,81	19,84	0,03	0,17	0,37
		3	12852,90	7574,24	19,84				
	34,43	1	15924,00	13185,64	34,54				
		2	10332,60	13191,25	34,56	34,59	0,07	0,21	0,53
		3	16129,10	13236,08	34,67				
nt = 16; sem controle de temperatura	4,92	1	6538,34	1875,11	4,91				
		2	6448,00	1891,87	4,96	4,94	0,02	0,47	0,48
		3	6391,71	1888,14	4,95				
	19,67	1	5501,57	7543,12	19,76				
		2	12758,40	7584,97	19,87	19,77	0,10	0,49	0,56
		3	16696,40	7511,44	19,68				
	34,43	1	22481,30	13041,31	34,16				
		2	12220,90	13181,93	34,53	34,32	0,19	0,56	0,50
		3	25331,40	13074,35	34,25				

m = quantidade de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse no espectro de RMN de ^1H do α -pineno; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; D = diferença em percentagem entre as massas obtidas nos espectros de RMN de ^1H nas diferentes condições.

Tabela S1.46. Avaliação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) usando o sinal em 5,23-5,17 ppm no espectro de RMN de ^1H NMR do α -pineno.

$\delta = 5,17 - 5,23$								
m (mg)	Rep	I_{Pin}	m_{Pin} (mg)	S/R	Mm_{Pin} (mg)	DP (%)	Erro (%)	CV (%)
0,51	1	40,88	0,32	47,427				
	2	40,90	0,32	46,852	0,32	0,00	37,25	0,00
	3	40,92	0,32	45,030				
1,02	1	95,89	0,75	91,626				
	2	97,96	0,77	97,393	0,76	0,01	25,49	1,32
	3	98,86	0,76	93,079				
2,56	1	269,24	2,12	256,61				
	2	264,54	2,08	252,04	2,11	0,03	17,45	1,45
	3	271,56	2,14	246,06				
5,12	1	637,61	5,02	481,01				
	2	637,68	5,02	472,15	5,02	0,01	2,02	0,12
	3	636,85	5,01	440,64				

m = massa de α -pineno utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal de interesse no espectro de RMN de ^1H do α -pineno; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Mm_{Pin} = média da quantidade de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; Erro = erro relativo; CV = coeficiente de variação.

Tabela S1.47. Quantificação de α -pineno em diversas amostras usando o sinal em 5,23-5,17 ppm no espectro de RMN de ^1H do óleo essencial.

Amostra	m (mg)	m _{PI} (mg)	S/R	I _{Pin}	m _{Pin} (mg)	Pin (%)	M _{Pin} (%)	DP (%)
EPN ₁	39,12	0,7200	268,65	1378,56	10,94	27,96		
EPN ₂	22,24	0,7200	240,66	776,72	6,160	27,47	27,43	0,44
EPN ₃	33,28	0,7000	258,09	1167,95	9,010	27,08		
EPN ₄	33,71	0,7000	269,25	1188,92	9,170	27,21		
CTL ₁	24,54	0,7200	377,16	2156,34	17,11	69,73		
CTL ₂	25,19	0,7200	353,90	2168,75	17,21	68,31	68,81	0,71
CTL ₃	26,41	0,7000	389,71	2365,60	18,25	69,11		
CTL ₄	27,55	0,7000	376,45	2431,09	18,76	68,08		
CMC ₁	25,39	0,7200	697,89	1955,49	15,52	61,13		
CMC ₂	33,28	0,7200	799,65	2533,44	20,11	60,42	60,40	0,56
CMC ₃	32,15	0,7000	552,60	2500,92	19,30	60,01		
CMC ₄	35,90	0,7000	688,53	2792,61	21,55	60,02		
SOC ₁	34,19	0,7000	2018,91	4192,50	32,35	94,62		
SOC ₂	33,00	0,7000	1574,24	4049,92	31,25	94,69	95,11	0,52
SOC ₃	35,07	0,7000	2095,45	4343,39	33,51	95,55		
SOC ₄	34,46	0,7000	2016,25	4268,32	32,93	95,56		
UxG ₁	40,81	0,7068	830,07	1821,40	14,19	34,77		
UxG ₂	46,02	0,6572	1205,06	2186,88	15,84	34,42	34,44	0,32
UxG ₃	43,98	0,6572	1224,52	2071,59	15,01	34,12		
EPE ₁	43,69	0,7000	508,36	2688,34	20,74	47,47		
EPE ₂	42,02	0,7000	432,82	2575,82	19,87	47,29	46,87	0,90
EPE ₃	46,09	0,7000	465,56	2737,84	21,12	45,83		
ET ₁	43,98	0,7068	378,16	653,28	5,090	11,57		
ET ₂	43,67	0,6572	374,45	715,45	5,180	11,87	11,74	0,15
ET ₃	41,84	0,6572	369,03	680,55	4,930	11,78		
ES ₁	40,81	0,7068	943,94	1627,27	12,68	31,06		
ES ₂	46,43	0,6572	709,24	2006,08	14,53	31,30	31,21	0,13
ES ₃	41,02	0,6572	935,31	1770,70	12,83	31,27		
PR ₁	43,37	0,6572	344,47	678,43	4,910	11,33		
PR ₂	44,28	0,6572	454,17	681,87	4,940	11,15	11,27	0,10
PR ₃	44,79	0,6572	449,47	700,09	5,070	11,32		

m = massa de amostra; m_{PI} = massa de padrão interno; S/R = razão sinal/ruído; I_{Pin} = integral do sinal em 5,23-5,17 ppm do α -pineno no espectro de RMN de ^1H do óleo essencial; m_{Pin} = quantidade de α -pineno encontrada; Pin = percentagem de α -pineno encontrada; M_{Pin} = média da percentagem de α -pineno encontrada; DP = desvio padrão; ES = *E. saligna*; UxG = híbrido *E. urophylla* x *E. grandis*; ET = *E. tereticornis*; EPN = *E. punctate*; CTL = *C. torelliana*; CMC = *C. maculate*; EPE = *E. phoenicea*, SOC = α -pineno comercializado pela Socer Brasil Indústria e Comércio Ltda; PR = pimenta rosa (*Schinus sp.*).

Tabela S1.48. Quantificação de α -pineno nos óleos essenciais utilizando quatro métodos diferentes.

Amostra	RMN de ^1H (%)	CG-PI (%)	CG-PE (%)	CG-N (%)
ES	31,21 \pm 0,13	33,89 \pm 1,01	33,78 \pm 0,55	34,81 \pm 1,31
UxG	34,44 \pm 0,32	33,14 \pm 1,79	37,60 \pm 1,22	36,80 \pm 1,11
ET	11,74 \pm 0,15	10,87 \pm 1,11	13,46 \pm 0,70	11,40 \pm 0,75
EPN	27,43 \pm 0,44	28,41 \pm 1,37	25,53 \pm 1,03	27,24 \pm 0,51
CTL	68,81 \pm 0,71	68,72 \pm 1,10	70,13 \pm 1,32	69,55 \pm 3,26
CMC	60,40 \pm 0,56	58,59 \pm 1,48	68,71 \pm 2,18	68,07 \pm 1,61
EPE	46,87 \pm 0,90	48,75 \pm 1,19	47,91 \pm 3,70	44,57 \pm 1,75
SOC	95,11 \pm 0,52	95,51 \pm 1,13	96,95 \pm 1,26	93,59 \pm 0,03
PR	11,27 \pm 0,10	11,80 \pm 0,25	15,34 \pm 0,67	11,47 \pm 0,68

RMN de ^1H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio; CG-PI = cromatografia gasosa utilizando padronização interna; CG-PE = cromatografia gasosa utilizando padronização externa; CG-N = cromatografia gasosa utilizando normalização; ES = *E. saligna*; UxG = híbrido *E. urophylla* x *E. grandis*; ET = *E. tereticornis*; EPN = *E. punctata*; CTL = *C. torelliana*; CMC = *C. maculata*; EPE = *E. phoenicea*; SOC = α -pineno comercializado pela Socer Brasil Indústria e Comércio Ltda; PR = pimenta rosa (*Schinus* sp).

Tabela S1.49. Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais utilizando CG-EM e CG-DIC, respectivamente.

Componentes	IA _C	IA _T	CTL (%)	CMC (%)	EPN (%)	SOC (%)
Triciclano	917	921	-	-	-	0,30 ± 0,00
α-Thujeno	924	924	-	-	0,47 ± 0,01	-
α-pineno	932	932	69,55 ± 3,26	68,07 ± 1,61	27,24 ± 0,51	93,59 ± 0,03
Canfeno	944	946	-	-	-	1,58 ± 0,02
Thuja-2,4(10)-dieno	950	953	-	-	-	0,10 ± 0,01
β-Pineno	973	974	1,68 ± 0,20	0,57 ± 0,01	0,50 ± 0,01	3,33 ± 0,016
β-Mirceno	991	988	-	-	0,93 ± 0,04	-
α-Felandreno	1003	1002	-	-	6,76 ± 0,56	-
α-Terpineno	1014	1014	-	-	0,52 ± 0,02	-
o-Cimeno	1023	1022	-	-	2,97 ± 0,34	-
Limoneno	1025	1024	1,10 ± 0,05	-	-	-
β-Felandreno	1024	1025	-	-	-	0,67 ± 0,02
γ-Terpineno	1058	1054	-	-	1,04 ± 0,05	-
1,8-cineol	1029	1026	-	3,55 ± 0,23	55,63 ± 1,41	-
Terpinen-4-ol	1175	1174	-	-	0,70 ± 0,04	-
α-terpineol	1189	1186	-	-	1,01 ± 0,06	-
α-Gurjuneno	1408	1409	-	0,59 ± 0,05	-	-
E-Cariofileno	1418	1417	7,42 ± 1,38	-	-	-
Aromadendreno	1438	1440	3,16 ± 0,83	3,01 ± 0,20	-	-
α-Humuleno	1453	1452	0,77 ± 0,13	-	-	-
allo-Aromadendreno	1460	1458	0,74 ± 0,12	0,74 ± 0,04	-	-
Viridifloreno (ledeno)	1495	1496	-	1,16 ± 0,04	-	-
α-Selineno	1496	1498	1,42 ± 0,15	-	-	-
Germacrene-B	1560	1559	-	0,39 ± 0,03	-	-
Guaiol	1601	1600	2,13 ± 0,26	8,77 ± 0,44	-	-
Espatulenol	1581	1577	0,77 ± 0,05	-	-	-
Globulol	1589	1590	2,26 ± 0,21	-	-	-
Viridiflorol	1593	1592	-	0,71 ± 0,04	-	-
Ledol	1605	1602	-	0,44 ± 0,02	-	-
10-epi-α-Eudesmol	1624	1622	-	0,90 ± 0,07	-	-
α-Eudesmol	1655	1662	-	0,68 ± 0,20	-	-
Selin-11-en-4-α-ol	1656	1658	1,72 ± 0,40	-	-	-
7-epi-α-Eudesmol	1660	1662	-	0,45 ± 0,02	-	-
Bulnesol	1670	1670	-	2,91 ± 0,12	-	-
Identificados (%)			92,72	92,94	97,77	99,57

IA_C = Índice aritmético calculado; IA_T = Índice aritmético tabelado; CTL = *C. torelliana*; CMC = *C. maculata*; EPN = *E. punctata*; SOC = α-pineno comercializado pela Socer Brasil Indústria e Comércio Ltda.

Tabela S1.50. Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais contendo α -pineno utilizando CG-EM e CG-DIC, respectivamente.

Componentes	IA _C	IA _T	ET (%)	ESC (%)	UxG (%)	EPE (%)	PR (%)
α -Tujeno	924	924	0,77 \pm 0,07	-	-	-	-
α -Pineno	932	932	11,40 \pm 0,75	34,81 \pm 1,31	36,80 \pm 1,11	44,57 \pm 1,75	11,47 \pm 0,68
Tuja-2,4(10)-dieno	949	953	-	0,50 \pm 0,37	0,02 \pm 0,00	-	-
β -Pineno	973	974	20,41 \pm 0,82	-	0,23 \pm 0,01	31,23 \pm 1,50	5,71 \pm 0,23
β -Miraceno	991	988	0,57 \pm 0,02	-	-	0,99 \pm 0,02	4,02 \pm 0,20
α -Felandreno	1002	1002	4,30 \pm 0,10	-	-	0,96 \pm 0,031	0,80 \pm 0,00
δ -3-Careno	1008	1008	-	-	0,60 \pm 0,01	-	57,64 \pm 2,58
α -Terpineno	1014	1014	0,12 \pm 0,00	-	-	-	-
<i>p</i> -Cimeno	1024	1020	14,76 \pm 0,46	-	-	1,26 \pm 0,17	1,64 \pm 0,06
α -Cimeno	1023	1022	-	-	-	-	1,72 \pm 0,02
Limoneno	1025	1024	-	2,40 \pm 0,11	-	-	3,12 \pm 0,11
γ -Terpineno	1058	1054	4,88 \pm 0,02	-	-	-	-
Terpinoleno	1086	1086	0,44 \pm 0,00	-	-	-	0,93 \pm 0,03
Isoamil isobutirato	1014	1007	-	1,20 \pm 0,04	0,10 \pm 0,02	-	-
1,8-cineol	1029	1026	17,34 \pm 0,26	2,28 \pm 0,08	33,69 \pm 0,73	7,34 \pm 0,20	-
Tetrahidro linalool	1098	1098	-	5,84 \pm 0,23	-	-	-
Óxido de α -Pineno	1093	1099	-	0,68 \pm 0,04	0,19 \pm 0,00	-	-
<i>endo</i> -Fenchol	1112	1114	0,11 \pm 0,01	-	0,40 \pm 0,00	-	-
α -Canfolenal	1125	1122	-	4,23 \pm 0,09	0,26 \pm 0,00	-	-
Acetato de <i>E</i> -pinocarvil	1137	11135	-	0,90 \pm 0,06	0,24 \pm 0,03	-	-
<i>E</i> -Pinocarveol	1137	1135	0,41 \pm 0,07	2,67 \pm 0,09	0,61 \pm 0,03	-	-
<i>Z</i> -Verbenol	1146	1137	-	5,78 \pm 0,04	-	-	-
<i>E</i> -Verbenol	1145	1140	-	-	0,39 \pm 0,03	-	-
Pinocarvona	1161	1160	-	1,38 \pm 0,03	-	-	-
Borneol	1165	1165	0,20 \pm 0,03	-	0,93 \pm 0,08	-	-
Terpinen-4-ol	1175	1174	1,53 \pm 0,07	-	0,53 \pm 0,03	-	-
α -Terpineol	1189	1186	2,19 \pm 0,11	1,54 \pm 0,01	3,55 \pm 0,25	1,27 \pm 0,16	-
Mirtenol	1194	1194	0,34 \pm 0,02	-	-	-	-
Mirtenal	1195	1195	-	2,26 \pm 0,04	-	-	-
<i>E</i> -carveol	1221	1215	-	6,58 \pm 0,07	-	-	-
Formiato de geranila	1309	1298	-	10,31 \pm 0,83	-	-	-
<i>Z</i> -2,3-Pinanodiol	1320	1318	-	1,73 \pm 0,21	-	-	-
<i>E</i> -Patchenol	1326	1328	-	5,88 \pm 0,32	-	-	-
α -Acetato de terpinila	1352	1346	-	-	4,84 \pm 0,55	-	-
Acetato de geranila	1386	1379	-	-	0,23 \pm 0,03	-	-
α -Gurjuneno	1408	1409	1,61 \pm 0,09	-	0,15 \pm 0,02	-	-
<i>E</i> -Cariofileno	1418	1417	0,06 \pm 0,00	-	1,35 \pm 0,18	2,07 \pm 0,29	0,44 \pm 0,05
β -Gurjuneno	1431	1431	1,33 \pm 0,11	-	-	-	-
<i>E</i> - α -Bergamoteno	1432	1432	-	-	-	-	0,15 \pm 0,02
Aromadendreno	1438	1440	4,13 \pm 0,31	-	0,31 \pm 0,05	0,77 \pm 0,11	-
Allo-aromadendreno	1460	1458	1,77 \pm 0,14	-	-	-	-
Viridifloreno	1495	1496	0,95 \pm 0,08	-	0,43 \pm 0,08	-	-
α -Muuroloeno	1500	1500	-	-	0,10 \pm 0,02	-	0,22 \pm 0,04
<i>E,E</i> - α -farneseno	1515	1505	-	1,68 \pm 0,06	-	1,61 \pm 0,21	-
δ -cadineno	1524	1522	0,23 \pm 0,02	-	0,78 \pm 0,14	-	0,54 \pm 0,09
Elemol	1551	1548	-	-	-	-	1,52 \pm 0,29
Palustrol	1568	1567	-	-	0,21 \pm 0,05	-	-
Espatuleno	1581	1577	1,16 \pm 0,14	2,34 \pm 0,16	1,25 \pm 0,30	-	-
Guaiol	1601	1600	-	-	0,39 \pm 0,10	-	0,22 \pm 0,05
Óxido de cariofileno	1585	1582	-	-	-	1,87 \pm 0,20	0,35 \pm 0,07
Globulol	1589	1590	2,32 \pm 0,24	1,01 \pm 0,06	1,17 \pm 0,27	-	-
Viridiflorol	1593	1592	0,53 \pm 0,06	-	0,77 \pm 0,18	-	-
Ledol	1605	1602	0,44 \pm 0,02	-	-	-	-
γ -Eudesmol	1626	1630	-	-	-	-	1,55 \pm 0,35
β -Eudesmol	1652	1649	-	-	-	-	0,79 \pm 0,20
Identificados (%)			94,30	96,00	90,52	93,94	92,83

IA_C = Índice aritmético calculado; IA_T = Índice aritmético tabelado; ET = *E. tereticornis*; ES = *E. saligna*; UxG = híbrido *E. urophylla* x *E. grandis*; EPE = *E. phoenicea*; PR = pimenta rosa (*Schinus sp.*).

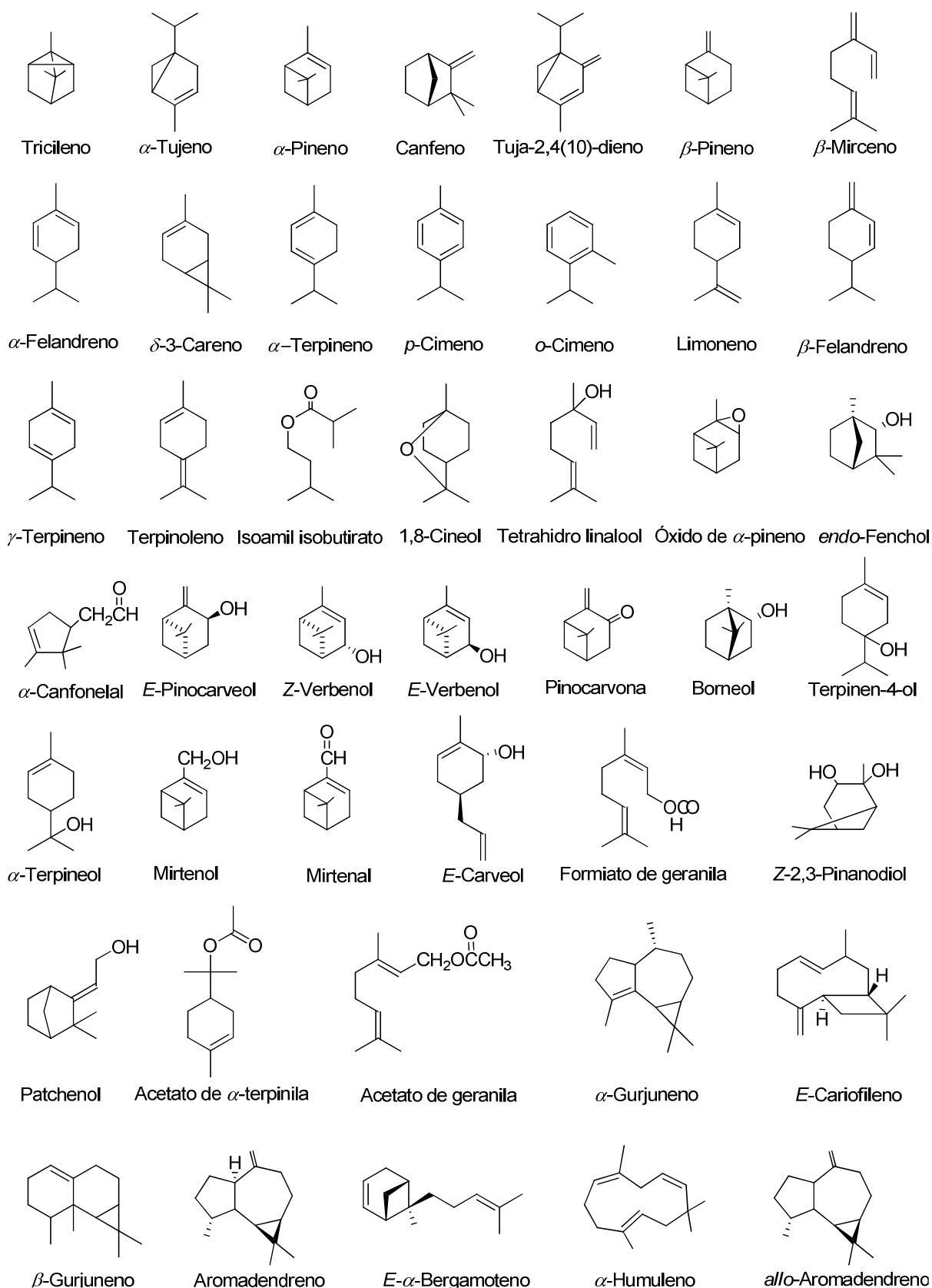


Figura S1.1. Estrutura dos constituintes dos óleos essenciais utilizados para quantificação de α -pineno.

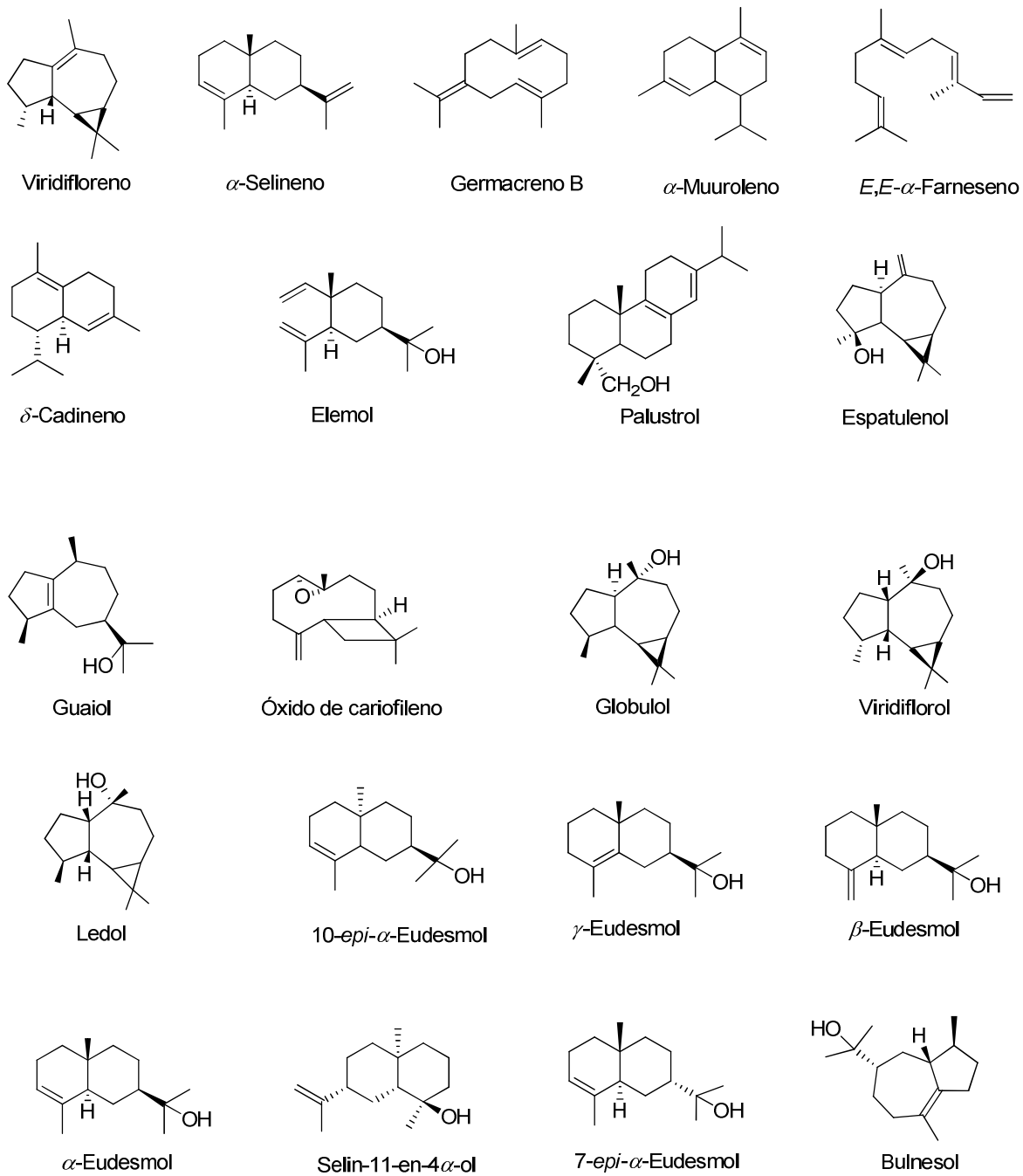


Figura S1.1. Cont.

DADOS SUPLEMENTARES 2 (S2)

VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE RMN DE ^1H PARA ANÁLISES DE α -BISABOLOL EM ÓLEOS ESSENCIAIS DE *EREMANTHUS ERYTHROPAPPUS*

Conteúdo:

1. Dados de validação do método de RMN de ^1H (linearidade Tabelas S2.1 a S2.3; repetibilidade Tabelas S2.4 a S2.6; exatidão/precisão Tabelas S2.7 a S2.9; estabilidade do analito e do padrão interno em clorofórmio deuterado Tabelas S2.10 a S2.12; robustez Tabelas S2.13 a S2.15; limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), Tabelas S2.16 a S2.18.
2. Dados da quantificação de α -bisabolol em amostras de óleos essenciais por RMN de ^1H e COSY, Tabelas S2.19 e S2.20, respectivamente. Comparação do conteúdo de α -bisabolol obtido nas amostras de óleo essencial por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), COSY, cromatografia gasosa usando padronização interna (CG-PI), padronização externa (CG-PE) e normalização (CG-N) Tabela S2.21.
3. Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais de *Eremanthus erythropappus* por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa-deteção de ionização de chama (CG-DIC), respectivamente (Tabelas S2.22 e S2.23).

Tabela S2.1. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -bisabolol em óleo essencial usando o sinal em 5,36 ppm.

m (mg)	Rep	S/R	I_{Bis}	m_{Bis} (mg)	Mm_{Bis} (mg)	DP (%)	CV (%)
5,25	1	213,156	481,220	5,28	5,26	0,02	0,33
	2	214,946	478,820	5,26			
	3	215,658	478,210	5,25			
10,51	1	430,365	952,830	10,46	10,49	0,04	0,35
	2	434,099	959,400	10,53			
	3	420,759	955,350	10,49			
15,76	1	535,913	1437,10	15,77	15,63	0,13	0,81
	2	499,286	1416,21	15,54			
	3	527,829	1418,26	15,57			
21,02	1	628,655	1917,70	21,05	20,99	0,09	0,43
	2	624,833	1916,74	21,04			
	3	588,417	1903,10	20,89			
26,27	1	643,72	2385,60	26,18	26,22	0,17	0,65
	2	735,926	2406,14	26,41			
	3	707,655	2375,50	26,07			
31,52	1	791,252	2859,67	31,39	32,26	0,12	0,38
	2	805,084	2844,97	31,22			
	3	691,927	2838,73	31,16			
36,78	1	800,451	3293,21	36,14	36,23	0,09	0,25
	2	726,040	3299,97	36,26			
	3	867,284	3309,88	36,33			

m = massa de α -bisabolol utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal em 5,36 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Mm_{Bis} = média da quantidade de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S2.2. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -bisabolol em óleo essencial usando o sinal em 5,13 ppm.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Bis}	m _{Bis} (mg)	Mm _{Bis} (mg)	DP (%)	CV (%)
5,25	1	223,710	487,920	5,360	5,250	0,11	2,04
	2	223,720	468,440	5,140			
	3	224,433	479,450	5,260			
10,51	1	454,260	949,300	10,42	10,43	0,06	0,60
	2	448,712	956,490	10,50			
	3	435,596	945,180	10,37			
15,76	1	551,395	1422,90	15,62	15,57	0,04	0,29
	2	507,769	1415,26	15,53			
	3	541,087	1416,68	15,55			
21,02	1	649,975	1894,09	20,79	20,82	0,07	0,33
	2	644,298	1903,64	20,89			
	3	597,255	1891,91	20,76			
26,27	1	673,897	2375,18	26,07	26,21	0,17	0,64
	2	763,963	2404,80	26,39			
	3	729,426	2383,27	26,16			
31,52	1	813,778	2803,86	30,77	30,88	0,11	0,36
	2	825,327	2813,85	30,88			
	3	716,002	2823,98	30,99			
36,78	1	835,791	3286,44	36,07	36,08	0,14	0,38
	2	742,598	3275,59	35,95			
	3	890,476	3300,72	36,23			

m = massa de α -bisabolol utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal em 5,13 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Mm_{Bis} = média da quantidade de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S2.3. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -bisabolol em óleo essencial usando o sinal em 1,10 ppm.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Bis}	m _{Bis} (mg)	Mm _{Bis} (mg)	DP (%)	CV (%)
5,25	1	2856,96	1443,37	5,280	5,26	0,02	0,43
	2	2828,31	1431,28	5,240			
	3	2847,07	1439,69	5,270			
10,51	1	5918,48	2834,97	10,37	10,43	0,07	0,65
	2	5645,57	2871,82	10,51			
	3	5381,08	2849,62	10,43			
15,76	1	6956,13	4294,23	15,71	15,59	0,10	0,66
	2	6137,85	4242,46	15,52			
	3	6696,02	4249,19	15,55			
21,02	1	8096,79	5612,42	20,53	20,55	0,06	0,30
	2	7994,63	5636,31	20,62			
	3	7146,31	5603,82	20,50			
26,27	1	8522,72	7337,28	26,84	26,61	0,20	0,77
	2	9630,07	7231,74	26,46			
	3	9017,68	7252,21	26,53			
31,52	1	10020,2	8311,59	30,41	30,46	0,19	0,62
	2	10177,5	8383,24	30,67			
	3	8836,67	8283,57	30,30			
36,78	1	10529,5	9968,83	36,47	36,15	0,56	1,54
	2	9071,34	9706,20	35,51			
	3	10859,2	9971,72	36,48			

m = massa de α -bisabolol utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal em 1,10 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Mm_{Bis} = média da quantidade de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S2.4. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -bisabolol em óleo essencial usando o sinal em 5,36 ppm.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Bis}	m _{Bis} (mg)	Mm _{Bis} (mg)	DP (%)	CV (%)
5,25	1	214,715	482,650	5,300	5,170	0,12	2,23
	2	218,290	462,230	5,070			
	3	217,549	468,240	5,140			
10,51	1	426,614	955,340	10,49	10,44	0,04	0,38
	2	440,343	948,300	10,41			
	3	430,549	950,100	10,43			
15,76	1	585,607	1432,21	15,72	15,61	0,11	0,72
	2	568,038	1411,67	15,49			
	3	500,394	1422,75	15,62			
21,02	1	649,847	1914,54	21,01	21,01	0,06	0,26
	2	642,467	1909,30	20,96			
	3	654,465	1919,32	21,07			
26,27	1	658,335	2432,86	26,70	26,11	0,53	2,02
	2	619,048	2361,69	25,92			
	3	614,057	2341,51	25,70			
31,52	1	706,568	2773,80	30,44	30,69	0,27	0,89
	2	712,033	2823,02	30,98			
	3	720,826	2792,68	30,65			
36,78	1	763,639	3298,70	36,20	36,39	0,30	0,83
	2	766,762	3300,49	36,22			
	3	724,531	3347,05	36,73			

m = massa de α -bisabolol utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal em 5,36 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Mm_{Bis} = média da quantidade de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S2.5. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -bisabolol em óleo essencial usando o sinal em 5,13 ppm.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Bis}	m _{Bis} (mg)	Mm _{Bis} (mg)	DP (%)	CV (%)
5,25	1	227,169	489,570	5,370	5,210	0,14	2,72
	2	231,938	466,990	5,130			
	3	234,821	467,360	5,130			
10,51	1	450,566	947,510	10,40	10,35	0,04	0,39
	2	466,453	940,580	10,32			
	3	452,997	941,800	10,34			
15,76	1	513,869	1425,21	15,64	15,51	0,14	0,93
	2	507,398	1399,05	15,36			
	3	528,257	1414,85	15,53			
21,02	1	684,202	1872,81	20,55	20,83	0,24	1,15
	2	670,944	1913,43	21,00			
	3	691,42	1907,30	20,93			
26,27	1	616,876	2410,80	26,46	25,88	0,52	2,00
	2	658,085	2343,16	25,72			
	3	651,643	2320,11	25,46			
31,52	1	756,779	2734,66	30,01	30,42	0,43	1,42
	2	759,489	2813,17	30,88			
	3	753,543	2766,75	30,37			
36,78	1	716,122	3274,00	35,93	36,02	0,16	0,44
	2	712,211	3274,13	35,93			
	3	739,648	3298,88	36,21			

m = massa de α -bisabolol utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal em 5,13 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Mm_{Bis} = média da quantidade de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S2.6. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de α -bisabolol em óleo essencial usando o sinal em 1,10 ppm.

m (mg)	Rep	S/R	I_{Bis}	m_{Bis} (mg)	Mm_{Bis} (mg)	DP (%)	CV (%)
5,25	1	2863,430	1449,58	5,300	5,180	0,11	2,06
	2	2938,940	1393,26	5,100			
	3	2012,220	1408,37	5,150			
10,51	1	5611,580	2823,74	10,33	10,30	0,06	0,61
	2	5870,770	2829,13	10,35			
	3	5629,100	2797,06	10,23			
15,76	1	6480,820	4202,80	15,38	15,33	0,04	0,28
	2	6605,040	4191,79	15,34			
	3	6397,020	4179,26	15,29			
21,02	1	8479,110	5591,13	20,45	20,53	0,07	0,33
	2	8009,840	5612,55	20,53			
	3	8566,280	5628,32	20,59			
26,27	1	10776,50	7234,89	26,47	25,59	0,85	3,31
	2	10667,16	6981,45	25,54			
	3	10542,45	6771,81	24,77			
31,52	1	10998,33	8202,80	30,01	30,22	0,18	0,61
	2	10976,82	8285,17	30,31			
	3	10281,54	8294,50	30,34			
36,78	1	10527,36	9750,40	36,67	35,85	0,24	0,67
	2	10478,09	9773,21	35,75			
	3	10544,89	9873,44	36,12			

m = massa de α -bisabolol utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal em 1,10 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Mm_{Bis} = média da quantidade de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S2.7. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de α -bisabolol em óleo essencial usando o sinal em 5,36 ppm.

Rep	S/R	I _{Bis}	P _{Bis} (%)	Exa (%)	M _{Exa} (%)	DP (%)	CV (%)
1	213,156	481,220	98,51	103,16			
2	214,946	478,820	98,02	102,64	102,77	0,34	0,33
3	215,658	478,210	97,90	102,51			
1	430,365	952,830	97,53	102,13			
2	434,099	959,400	98,20	102,83	102,45	0,36	0,35
3	420,759	955,350	97,79	102,40			
1	535,913	1437,10	98,07	102,69			
2	499,286	1416,21	96,64	101,19	101,74	0,82	0,81
3	527,829	1418,26	96,78	101,34			
1	628,655	1917,70	98,15	102,77			
2	624,833	1916,74	98,10	102,72	102,49	0,44	0,43
3	588,417	1903,10	97,40	101,99			
1	643,72	2385,60	97,67	102,28			
2	735,926	2406,14	98,52	103,16	102,43	0,67	0,35
3	707,655	2375,50	97,26	101,84			
1	791,252	2859,67	97,57	102,17			
2	805,084	2844,97	97,07	101,64	101,74	0,38	0,38
3	691,927	2838,73	96,86	101,42			
1	800,451	3293,21	96,31	100,85			
2	726,040	3299,97	96,51	101,06	101,09	0,26	0,25
3	867,284	3309,88	96,80	101,36			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal em 5,36 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; P_{Bis} = pureza calculada do α -bisabolol; Exa = Exatidão; M_{Exa} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S2.8. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de α -bisabolol em óleo essencial usando o sinal em 5,13 ppm.

Rep	S/R	I _{Bis}	P _{Bis} (%)	Exa (%)	M _{Exa} (%)	DP (%)	CV (%)
1	223,710	487,920	97,34	101,92			
2	223,720	468,440	93,45	97,85	99,98	2,04	2,04
3	224,433	479,450	95,65	100,15			
1	454,260	949,300	94,69	99,15			
2	448,712	956,490	95,41	99,90	99,26	0,60	0,60
3	435,596	945,180	94,28	98,72			
1	551,395	1422,90	94,62	99,08			
2	507,769	1415,26	94,11	98,55	98,76	0,28	0,29
3	541,087	1416,68	94,21	98,65			
1	649,975	1894,09	94,46	98,92			
2	644,298	1903,64	94,94	99,41	99,04	0,33	0,33
3	597,255	1891,91	94,36	98,80			
1	673,897	2375,18	94,77	99,23			
2	763,963	2404,80	95,95	100,47	99,76	0,64	0,64
3	729,426	2383,27	95,09	99,57			
1	813,778	2803,86	93,23	97,62			
2	825,327	2813,85	93,56	97,97	97,97	0,35	0,36
3	716,002	2823,98	93,89	98,32			
1	835,791	3286,44	93,66	98,07			
2	742,598	3275,59	93,35	97,75	98,11	0,38	0,38
3	890,476	3300,72	94,07	98,50			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis}= integral do sinal em 5,13 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; P_{Bis} = pureza calculada do α -bisabolol; Exa = Exatidão; M_{Exa} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S2.9. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de α -bisabolol em óleo essencial usando o sinal em 1,10 ppm.

Rep	S/R	I _{Bis}	P _{Bis} (%)	Exa (%)	M _{Exa} (%)	DP (%)	CV (%)
1	2856,96	1443,37	95,98	100,5			
2	2828,31	1431,28	95,18	99,66	100,1	0,43	0,43
3	2847,07	1439,69	95,74	100,2			
1	5918,48	2834,97	94,26	98,70			
2	5645,57	2871,82	95,49	99,98	99,30	0,65	0,65
3	5381,08	2849,62	94,75	99,21			
1	6956,13	4294,23	95,19	99,67			
2	6137,85	4242,46	94,04	98,47	98,92	0,65	0,66
3	6696,02	4249,19	94,19	98,63			
1	8096,79	5612,42	93,30	97,70			
2	7994,63	5636,31	93,70	98,12	97,79	0,29	0,30
3	7146,31	5603,82	93,16	97,55			
1	8522,72	7337,28	97,58	102,2			
2	9630,07	7231,74	96,18	100,7	101,3	0,78	0,76
3	9017,68	7252,21	96,45	101,00			
1	10020,2	8311,59	92,12	96,46			
2	10177,5	8383,24	92,91	97,29	96,63	0,60	0,62
3	8836,67	8283,57	91,81	96,13			
1	10529,5	9968,83	94,70	99,16			
2	9071,34	9706,20	92,21	96,55	98,30	1,52	1,53
3	10859,2	9971,72	94,73	99,19			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal em 1,10 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; P_{Bis} = pureza calculada do α -bisabolol; Exa = Exatidão; M_{Exa} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S2.10. Avaliação da estabilidade do analito α -bisabolol e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano no solvente clorofórmio deuterado usando o sinal em 5,36 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol.

Intervalo de tempo	Rep	S/R	I_{Bis}	m_{Bis} (mg)	Mm_{Bis} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
Inicial (0 h)	1	628,655	1917,70	21,05				
	2	624,833	1916,74	21,04	20,99	0,09	0,43	NA
	3	588,417	1903,10	20,89				
Após 6 h	1	628,655	1920,04	21,07				
	2	624,833	1905,04	20,92	20,99	0,08	0,38	0,55
	3	588,417	1910,52	20,97				
Após 12 h	1	541,994	1916,03	21,03				
	2	486,166	1907,17	20,93	20,95	0,07	0,32	0,36
	3	454,872	1904,53	20,90				
Após 18 h	1	477,281	1918,62	21,06				
	2	491,747	1911,62	20,98	21,00	0,05	0,22	0,43
	3	470,507	1911,10	20,97				
Após 24 h	1	445,224	1920,57	21,08				
	2	611,833	1907,32	20,93	20,98	0,09	0,43	0,45
	3	567,19	1905,58	20,91				
				M_1 (%)	20,98			
				DP_1 (%)	0,02			
				CV_1 (%)	0,09			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal em 5,36 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Mm_{Bis} = média da quantidade de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; M_1 = média das massas encontradas em todos os intervalos de tempo avaliados; DP_1 = desvio padrão das massas encontradas em todos os intervalos de tempo avaliados; CV_1 = coeficiente de variação entre as massas encontradas em todos os intervalos de tempo avaliados; NA = não aplicável; D = diferença em percentagem entre a quantidade de α -bisabolol nos espectros de RMN de ^1H adquiridos nos diferentes intervalos de tempo avaliados.

Tabela S2.11. Avaliação da estabilidade do analito α -bisabolol e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano no solvente clorofórmio deuterado usando o sinal em 5,13 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol.

Intervalo de tempo	Rep	S/R	I_{Bis}	m_{Bis} (mg)	$M_{m\text{Bis}}$ (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
Inicial (0 h)	1	649,975	1894,09	20,79	20,82	0,07	0,33	NA
	2	644,298	1903,64	20,89				
	3	597,255	1891,91	20,76				
Após 6 h	1	649,975	1900,46	20,86	20,82	0,03	0,15	0,38
	2	644,298	1894,86	20,80				
	3	597,255	1896,64	20,82				
Após 12 h	1	561,717	1901,29	20,87	20,74	0,14	0,69	0,37
	2	502,408	1892,35	20,77				
	3	465,335	1875,46	20,58				
Após 18 h	1	491,626	1891,95	20,76	20,73	0,07	0,35	0,41
	2	507,211	1893,32	20,78				
	3	478,209	1881,16	20,65				
Após 24 h	1	464,381	1911,85	20,98	20,93	0,05	0,24	0,54
	2	629,315	1905,47	20,91				
	3	578,14	1903,12	20,89				
M_1 (%)						20,81		
DP_1 (%)						0,08		
CV_1 (%)						0,39		

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal em 5,13 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; $M_{m\text{Bis}}$ = média da quantidade de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; M_1 = média das massas encontradas em todos os intervalos de tempo avaliados; DP_1 = desvio padrão das massas encontradas em todos os intervalos de tempo avaliados; CV_1 = coeficiente de variação entre as massas encontradas em todos os intervalos de tempo avaliados; NA = não aplicável; D = diferença em percentagem entre a quantidade de α -bisabolol nos espectros de RMN de ^1H adquiridos nos diferentes intervalos de tempo avaliados.

Tabela S2.12. Avaliação da estabilidade do analito α -bisabolol e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano no solvente clorofórmio deuterado usando o sinal em 1,10 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol.

Intervalo de tempo	Rep	S/R	I_{Bis}	m_{Bis} (mg)	Mm_{Bis} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
Inicial (0 h)	1	8096,79	5612,42	20,53				
	2	7994,63	5636,31	20,62	20,55	0,06	0,30	NA
	3	7146,31	5603,82	20,50				
Após 6 h	1	8096,79	5708,57	20,88				
	2	7994,63	5640,97	20,64	20,75	0,12	0,60	1,05
	3	7146,31	5666,16	20,73				
Após 12 h	1	6875,1	5703,73	20,87				
	2	6235,81	5635,39	20,62	20,79	0,15	0,71	1,28
	3	5604,51	5706,30	20,88				
Após 18 h	1	6125,86	5705,06	20,87				
	2	6289,64	5672,51	20,75	20,81	0,06	0,29	1,39
	3	5750,65	5688,06	20,81				
Após 24 h	1	5839,14	5663,25	20,72				
	2	7809,47	5651,76	20,68	20,65	0,02	0,07	1,09
	3	6925,53	5617,60	20,55				
M_1 (%)					20,71			
DP_1 (%)					0,11			
CV_1 (%)					0,52			

Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal em 1,10 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Mm_{Bis} = média da quantidade de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; M_1 = média das massas encontradas em todos os intervalos de tempo avaliados; DP_1 = desvio padrão das massas encontradas em todos os intervalos de tempo avaliados; CV_1 = coeficiente de variação entre as massas encontradas em todos os intervalos de tempo avaliados; NA = não aplicável; D = diferença em percentagem entre a quantidade de α -bisabolol nos espectros de RMN de ^1H adquiridos nos diferentes intervalos de tempo avaliados.

Tabela S2.13. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H para determinação de α -bisabolol em óleo essencial usando o sinal em 5,36 ppm.

Parâmetro	m (mg)	Rep	S/R	I _{Bis}	m _{Bis} (mg)	Mm _{Bis} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)	
nt = 8; temperatura controlada 25 °C	5,25	1	213,5	486,680	5,34					
	5,25	2	226,8	480,160	5,27	5,31	0,04	0,70	0,94	
	5,25	3	215,8	484,880	5,32					
	21,02	1	636,8	1919,16	21,03					
	21,02	2	564,3	1919,62	21,07	20,97	0,14	0,65	0,19	
	21,02	3	604,9	1896,63	20,82					
	36,78	1	830,9	3303,73	36,26					
	36,78	2	797,3	3296,78	36,18	36,25	0,07	0,19	0,14	
	36,78	3	863,1	3309,33	36,32					
	nt = 16; sem controle de temperatura	5,25	1	160,6	480,480	5,27				
		5,25	2	157,5	481,130	5,28	5,26	0,03	0,60	0,38
		5,25	3	157,3	475,820	5,22				
21,02		1	541,9	1914,18	21,01					
21,02		2	486,1	1923,83	21,11	21,06	0,05	0,25	0,46	
21,02		3	454,8	1919,14	21,06					
36,78		1	942,2	3280,53	36,00					
36,78		2	1027,	3291,61	36,13	36,07	0,06	0,17	0,45	
36,78		3	733,9	3283,42	36,07					

m = massa de α -bisabolol utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis}= integral do sinal em 5,36 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Mm_{Bis} = média da quantidade de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; D = diferença em percentagem entre a quantidade de α -bisabolol encontrada nos espectros de RMN de ^1H nas diferentes condições avaliadas.

Tabela S2.14. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H para determinação de α -bisabolol em óleo essencial usando o sinal em 5,13 ppm.

Parâmetro	m (mg)	Rep	S/R	I_{Bis}	m_{Bis} (mg)	Mm_{Bis} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
nt = 8; temperatura controlada 25 °C	5,25	1	221,855	479,600	5,260				
	5,25	2	236,168	477,190	5,240	5,26	0,02	0,38	1,29
	5,25	3	225,686	480,790	5,280				
	21,02	1	659,618	1905,44	20,91				
	21,02	2	591,104	1903,36	20,89	20,82	0,15	0,71	0,40
	21,02	3	629,953	1881,12	20,65				
	36,78	1	862,099	3281,85	36,02				
	36,78	2	824,151	3269,75	35,89	36,00	0,10	0,28	0,24
	36,78	3	892,028	3287,42	36,08				
	5,25	1	165,907	479,360	5,260				
	5,25	2	163,551	476,590	5,230	5,250	0,02	0,29	1,24
	5,25	3	164,243	478,370	5,250				
nt = 16; sem controle de temperatura	21,02	1	561,717	1908,64	20,95				
	21,02	2	502,408	1910,15	20,96	20,97	0,02	0,11	0,74
	21,02	3	465,335	1912,92	20,99				
	36,78	1	981,496	3268,13	35,87				
	36,78	2	1074,33	3281,00	36,01	35,91	0,08	0,24	0,58
	36,78	3	752,732	3267,14	35,86				

m = massa de α -bisabolol utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal em 5,13 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Mm_{Bis} = média da quantidade de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; D = diferença em percentagem entre a quantidade de α -bisabolol encontrada nos espectros de RMN de ^1H nas diferentes condições avaliadas.

Tabela S2.15. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H para determinação de α -bisabolol em óleo essencial usando o sinal em 1,10 ppm.

Parâmetro	m (mg)	Rep	S/R	I_{Bis}	m_{Bis} (mg)	Mm_{Bis} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
nt = 8; temperatura controlada 25 °C	5,25	1	2771,08	1437,52	5,26				
	5,25	2	2999,24	1435,61	5,25	5,25	0,01	0,26	0,45
	5,25	3	2866,62	1430,30	5,23				
	21,0	1	8102,64	5747,52	21,03				
	21,0	2	7479,76	5615,04	20,54	20,63	0,36	1,75	1,22
	21,0	3	7806,43	5554,39	20,32				
	36,7	1	10729,7	9805,33	35,87				
	36,7	2	9996,44	9709,77	35,52	35,95	0,47	1,30	0,59
	36,7	3	10996,9	9962,84	36,45				
	5,25	1	2115,44	1438,81	5,26				
	5,25	2	2059,05	1418,77	5,19	5,22	0,04	0,72	0,74
	5,25	3	2071,62	1424,97	5,21				
nt = 16; sem controle de temperatura	21,0	1	6875,1	5661,55	20,71				
	21,0	2	6235,81	5657,34	20,70	20,72	0,03	0,16	0,84
	21,0	3	5604,51	5674,28	20,76				
	36,7	1	12139,3	9810,15	35,89				
	36,7	2	13505,5	9854,74	36,05	35,92	0,11	0,32	1,63
	36,7	3	9164,41	9794,20	35,83				

m = massa de α -bisabolol utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal em 1,10 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Mm_{Bis} = média da quantidade de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; D = diferença em percentagem entre a quantidade de α -bisabolol encontrada nos espectros de RMN de ^1H nas diferentes condições avaliadas.

Tabela S2.16. Avaliação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método de RMN de ^1H para quantificação de α -bisabolol em óleo essencial, usando o sinal em 5,36 ppm no espectro α -bisabolol.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Bis}	m _{Bis} (mg)	Mm _{Bis} (mg)	DP (%)	CV (%)	E (%)
0,104	1	5,5983	9,380	0,118	0,107	0,011	10,8	8,16
	2	5,9351	8,430	0,106				
	3	4,4293	7,560	0,095				
0,259	1	11,957	20,350	0,256	0,255	0,003	1,03	1,78
	2	12,423	20,330	0,256				
	3	8,6163	19,980	0,252				
0,519	1	24,208	40,120	0,505	0,503	0,012	2,39	2,97
	2	22,011	38,920	0,490				
	3	23,798	40,810	0,514				
1,04	1	48,287	81,450	1,03	1,02	0,01	0,661	1,84
	2	47,082	80,530	1,01				
	3	47,431	80,520	1,01				
2,59	1	138,12	237,79	2,79	2,79	0,01	0,487	7,57
	2	134,55	221,87	2,77				
	3	138,63	220,21	2,80				
5,19	1	217,93	222,23	5,00	5,02	0,01	0,211	3,28
	2	224,41	398,94	5,02				
	3	220,69	398,39	5,01				

m = massa de α -bisabolol utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal em 5,36 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Mm_{Bis} = média da quantidade de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; E = erro relativo.

Tabela S2.17. Avaliação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método de RMN de ^1H para quantificação de α -bisabolol em óleo essencial, usando o sinal em 5,13 ppm no espectro α -bisabolol.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Bis}	m _{Bis} (mg)	Mm _{Bis} (mg)	DP (%)	CV (%)	E (%)
0,104	1	6,1225	10,020	0,126				
	2	5,3470	9,0300	0,114	0,112	0,015	13,2	12,73
	3	4,2882	7,6700	0,097				
0,259	1	12,377	20,330	0,256				
	2	11,180	20,320	0,256	0,254	0,003	1,27	1,99
	3	8,0045	19,880	0,250				
0,519	1	23,978	40,970	0,516				
	2	21,960	39,670	0,500	0,511	0,010	1,93	1,45
	3	24,037	41,080	0,517				
1,04	1	49,504	80,400	1,01				
	2	47,661	81,550	1,03	1,02	0,01	0,84	1,92
	3	46,336	80,350	1,01				
2,59	1	143,67	222,25	2,80				
	2	132,79	223,01	2,81	2,80	0,01	0,24	7,87
	3	142,25	221,98	2,80				
5,19	1	227,04	397,97	5,01				
	2	236,39	403,44	5,08	5,06	0,04	0,76	2,49
	3	229,12	403,00	5,08				

m = massa de α -bisabolol utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis}= integral do sinal em 5,13 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Mm_{Bis} = média da quantidade de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; E = erro relativo.

Tabela S2.18. Avaliação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método de RMN de ^1H para quantificação de α -bisabolol em óleo essencial, usando o sinal em 1,10 ppm no espectro α -bisabolol.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Bis}	m _{Bis} (mg)	Mm _{Bis} (mg)	DP (%)	CV (%)	E (%)
0,104	1	61,0854	25,0500	0,105				
	2	50,0953	21,2400	0,089	0,0960	0,0080	8,60	8,38
	3	40,7396	22,3000	0,094				
0,259	1	137,376	60,4000	0,254				
	2	138,614	61,0300	0,256	0,257	0,004	1,59	1,42
	3	136,562	62,3100	0,262				
0,519	1	266,709	125,250	0,526				
	2	248,810	122,030	0,516	0,521	0,008	1,49	1,33
	3	276,759	125,230	0,526				
1,04	1	581,104	230,040	0,970				
	2	579,192	237,160	1,00	0,98	0,02	1,63	5,75
	3	514,071	231,320	0,970				
2,59	1	1759,98	667,860	2,80				
	2	1413,62	665,820	2,80	2,80	0,01	0,24	8,42
	3	1721,86	668,980	2,80				
5,19	1	2785,30	1231,08	5,17				
	2	2908,98	1242,46	5,22	5,19	0,03	0,49	0,36
	3	2791,01	1233,26	5,18				

m = massa de α -bisabolol utilizada; Rep = replicatas; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal em 1,10 ppm no espectro de RMN de ^1H do α -bisabolol; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Mm_{Bis} = média da quantidade de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; E = erro relativo.

Tabela S2.19. Quantificação de α -bisabolol em todas as amostras de óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* usando o sinal em $\delta = 5,13$ do α -bisabolol no espectro de RMN de ^1H dos óleos essenciais.

Óleo	Rep	m (mg)	m _{PI} (mg)	S/R	I _{Bis}	m _{Bis} (mg)	Bis (%)	M _{Bis} (%)	DP (%)
E1	1	33,95	0,90	552,8	1835,76	29,84	87,91	87,86	0,59
	2	34,93	0,90	503,7	1874,63	30,48	87,25		
	3	34,32	0,90	629,5	1866,80	30,35	88,43		
E2	1	37,95	0,90	593,5	2100,53	34,15	89,99	89,66	0,29
	2	37,68	0,90	656,8	2075,86	33,75	89,57		
	3	37,00	0,90	605,4	2035,12	33,09	89,42		
E3	1	34,56	0,90	675,3	1869,89	30,40	87,96	88,25	0,46
	2	36,32	0,90	592,0	1965,96	31,96	88,00		
	3	37,39	0,90	623,1	2041,68	33,19	88,77		
E4	1	37,43	0,90	707,4	1989,49	32,34	86,41	86,27	0,20
	2	38,59	0,90	583,2	2042,23	33,20	86,04		
	3	35,96	0,90	635,3	1910,13	31,05	86,36		
E5	1	40,59	0,90	788,9	2391,09	38,87	95,77	95,63	0,42
	2	40,89	0,90	656,3	2413,57	39,24	95,96		
	3	40,12	0,90	681,6	2348,21	38,18	95,15		
E6	1	41,86	0,75	664,5	2622,90	35,58	85,00	84,51	1,51
	2	41,83	0,75	535,6	2553,59	34,64	82,82		
	3	41,33	0,75	623,5	2611,70	35,43	85,73		
E7	1	43,55	0,75	772,5	3102,24	42,08	96,64	96,74	0,09
	2	45,55	0,75	819,2	3250,49	44,10	96,81		
	3	47,34	0,75	755,4	3377,02	45,81	96,77		
E8	1	43,26	0,75	644,9	2767,59	37,55	86,79	86,35	0,40
	2	43,60	0,75	685,8	2771,83	37,60	86,24		
	3	43,36	0,75	718,6	2749,04	37,29	86,01		
E9	1	39,25	0,75	573,6	2605,60	35,35	90,06	89,93	0,14
	2	42,55	0,75	692,0	2815,97	38,20	89,78		
	3	41,59	0,75	601,8	2758,11	37,42	89,96		
E10	1	37,90	0,53	904,1	3918,50	37,36	98,59	98,44	0,14
	2	32,65	0,53	794,5	3369,83	32,13	98,42		
	3	38,13	0,72	856,5	2893,99	37,49	98,32		
E11	1	35,69	0,53	932,0	3673,08	35,02	98,14	98,27	0,32
	2	33,61	0,72	812,0	2543,56	32,95	98,03		
	3	31,4	0,72	784,2	2390,76	30,97	98,63		

m = massa de amostra; m_{PI} = massa do padrão interno octametilciclotetrasiloxano; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = integral do sinal $\delta = 5,13$ do α -bisabolol no espectro de RMN de ^1H do óleo essencial; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Bis = percentagem de α -bisabolol encontrada; M_{Bis} = média da percentagem de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10 e E11 = amostras de óleo essencial de *Eremanthus erythropappus*.

Tabela S2.20. Quantificação de α -bisabolol em todas as amostras de óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* usando o método do COSY.

Óleo	Rep	m (mg)	m _{PI} (mg)	I _{Bis}	M _{Bis} (mg)	Bis (%)	M _{Bis} (%)	DP (%)
E1	1	38,76	0,90	343,76	33,87	87,38	87,38	0,00
	2	38,76	0,90	343,76	33,87	87,38		
E2	1	39,45	0,90	358,68	35,34	89,59	89,82	0,33
	2	43,10	0,90	393,81	38,81	90,05		
E3	1	40,99	0,90	357,80	35,25	86,01	86,15	0,21
	2	58,89	0,90	515,40	50,82	86,30		
E4	1	57,60	0,90	504,41	49,75	86,35	86,56	0,30
	2	34,62	0,90	305,01	30,04	86,77		
E5	1	43,98	0,90	429,89	42,38	96,35	96,44	0,12
	2	36,60	0,90	358,54	35,33	96,52		
E6	1	33,41	0,90	270,65	26,65	79,75	79,87	0,17
	2	34,25	0,90	278,25	27,40	79,99		
E7	1	37,15	0,90	364,13	35,88	96,58	96,60	0,03
	2	39,32	0,90	385,51	37,99	96,62		
E8	1	38,38	0,90	321,44	31,66	82,50	82,44	0,08
	2	37,50	0,90	313,68	30,90	82,39		
E9	1	44,50	0,90	357,74	35,25	79,21	79,31	0,14
	2	45,36	0,90	365,54	36,02	79,41		
E10	1	37,25	0,90	372,36	36,69	98,50	98,54	0,05
	2	48,45	0,90	484,37	47,76	98,57		
E11	1	37,80	0,90	376,42	37,09	98,13	98,18	0,06
	2	36,72	0,90	366,03	36,07	98,22		

m = massa de amostra; m_{PI} = massa do padrão interno octametilciclotetrasiloxano; S/R = razão sinal/ruído; I_{Bis} = área do pico de correlação em 5,13 x 2,06 ppm do α -bisabolol no mapa de contorno do COSY dos óleos essenciais; m_{Bis} = quantidade de α -bisabolol encontrada; Bis = percentagem de α -bisabolol encontrada; M_{Bis} = média da percentagem de α -bisabolol encontrada; DP = desvio padrão; E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10 e E11 = amostras de óleo essencial de *Eremanthus erythropappus*.

Tabela S2.21. Quantificação de α -bisabolol nos óleos essenciais usando diferentes métodos.

Amostra	RMN de ^1H (%)	COSY (%)	CG-N (%)	CG-PI (%)	CG-PE (%)
E1	87,86 \pm 0,59	87,38 \pm 0,00	87,86 \pm 0,48	-	-
E2	89,66 \pm 0,29	89,82 \pm 0,33	89,69 \pm 0,11	-	-
E3	88,25 \pm 0,46	86,15 \pm 0,21	87,09 \pm 0,11	-	-
E4	86,27 \pm 0,20	86,56 \pm 0,30	86,55 \pm 0,20	-	-
E5	95,63 \pm 0,42	96,44 \pm 0,12	95,25 \pm 0,23	-	-
E6	84,51 \pm 1,51	79,87 \pm 0,17	79,23 \pm 0,21	-	-
E7	96,74 \pm 0,09	96,60 \pm 0,03	96,44 \pm 0,30	-	-
E8	86,35 \pm 0,40	82,44 \pm 0,08	82,26 \pm 0,32	-	-
E9	89,93 \pm 0,14	79,31 \pm 0,14	79,38 \pm 0,80	-	-
E10	98,44 \pm 0,14	98,54 \pm 0,05	98,08 \pm 0,12	97,13 \pm 0,45	98,62 \pm 0,65
E11	98,27 \pm 0,32	98,18 \pm 0,06	97,38 \pm 0,17	97,10 \pm 0,66	97,67 \pm 1,18

RMN de ^1H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio; COSY = “homonuclear correlation spectroscopy” com gradient de campo; CG-PI = cromatografia gasosa usando padronização interna; CG-PE = cromatografia gasosa usando padronização externa; CG-N = cromatografia gasosa usando normalização de áreas.

Tabela S2.22. Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais de *E. erythropappus* (E1, E2, E3, E4, E5, e E6) usando cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa-detector por ionização em chamas (CG-DIC), respectivamente.

Componentes	IA _C	IA _T	E1 (%)	E2 (%)	E3 (%)	E4 (%)	E5 (%)	E6 (%)
β -elemeno	1387	1389	0,17 \pm 0,01	-	0,17 \pm 0,03	0,56 \pm 0,02	-	-
Eugenol metil éter	1405	1401	-	-	0,37 \pm 0,03	-	-	-
<i>E</i> - α -Bergamoteno	1430	1432	-	-	-	-	-	0,27 \pm 0,02
<i>allo</i> -Aromadendreno	1453	1458	-	-	-	-	-	-
<i>ar</i> -Curcumeno	1478	1479	-	-	-	-	-	0,99 \pm 0,00
γ -Curcumeno	1474	1481	-	-	-	-	-	-
Eremofileno	1479	1786	0,15 \pm 0,01	-	-	-	-	-
β -Selineno	1479	1489	-	-	0,46 \pm 0,03	0,68 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01	-
α -Selineno	1488	1498	-	-	0,31 \pm 0,02	-	-	-
β -Himachaleno	1497	1500	-	-	-	-	-	0,92 \pm 0,01
<i>Z</i> - α -Bisaboleno	1497	1504	-	-	-	-	-	2,63 \pm 0,03
β -Bisaboleno	1503	1505	-	-	-	-	-	0,90 \pm 0,00
β -Curcumeno	1509	1514	-	-	-	-	-	-
Não identificado	1526	-	-	-	-	-	-	0,99 \pm 0,00
<i>E</i> - α -Bisaboleno	1538	1549	-	-	-	-	-	2,50 \pm 0,01
Não identificado	1606	-	-	-	0,64 \pm 0,02	-	-	-
Óxido de α -bisabolol B	1649	1656	2,64 \pm 0,02	2,50 \pm 0,03	2,05 \pm 0,03	2,41 \pm 0,07	0,96 \pm 0,05	2,68 \pm 0,02
Não identificado	1663	-	-	-	-	-	-	1,78 \pm 0,01
Não identificado	1667	-	-	-	0,35 \pm 0,01	-	-	-
α -Bisabolol	1687	1685	87,86 \pm 0,48	89,69 \pm 0,11	87,09 \pm 0,11	86,55 \pm 0,20	95,25 \pm 0,23	79,23 \pm 0,21
Não identificado	1688	-	-	-	0,39 \pm 0,02	-	-	-
Não identificado	1762	-	-	-	0,31 \pm 0,01	-	-	-
Não identificado	1768	-	-	-	0,41 \pm 0,01	-	-	-
Óxido de α -bisabolol A	1751	1748	-	-	-	-	-	-
Costunolida	1987	-	1,19 \pm 0,16	0,64 \pm 0,05	1,16 \pm 0,06	0,67 \pm 0,02	0,66 \pm 0,01	0,77 \pm 0,00
Eremantim	1989	1981	3,77 \pm 0,09	3,57 \pm 0,10	3,71 \pm 0,27	4,25 \pm 0,13	0,67 \pm 0,02	0,57 \pm 0,01
Identificados (%)			95,78	96,40	95,33	95,64	97,69	91,45
Não identificados (%)			-	-	2,10	-	-	2,78
Total (%)			95,78	96,40	97,43	95,64	97,69	94,23

IA_C = Índice aritmético calculado; IA_T = Índice aritmético tabelado.

Tabela S2.23. Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais de *E. erythropappus* (E7, E8, E9, E10 e E11) usando cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa-detector por ionização em chamas (CG-DIC), respectivamente.

Componentes	IA _C	IA _T	E7 (%)	E8 (%)	E9 (%)	E10 (%)	E11 (%)
β -elemeno	1387	1389	-	-	-	0,56 \pm 0,02	-
Eugenol metil éter	1405	1401	-	-	-	-	-
<i>E</i> - α -Bergamoteno	1430	1432	-	-	0,29 \pm 0,03	-	-
<i>allo</i> -Aromadendreno	1453	1458	-	-	1,06 \pm 0,05	-	-
<i>ar</i> -Curcumeno	1478	1479	-	-	-	-	-
γ -Curcumeno	1474	1481	-	0,87 \pm 0,01	-	-	-
Eremofileno	1479	1786	-	-	-	-	-
β -Selineno	1479	1489	-	-	-	0,68 \pm 0,02	-
α -Selineno	1488	1498	-	-	-	-	-
β -Himachaleno	1497	1500	-	-	-	-	-
<i>Z</i> - α -Bisaboleno	1497	1504	0,13 \pm 0,00	0,74 \pm 0,00	1,06 \pm 0,05	-	-
β -Bisaboleno	1503	1505	-	1,76 \pm 0,01	2,73 \pm 0,13	-	-
β -Curcumeno	1509	1514	-	0,89 \pm 0,00	1,36 \pm 0,05	-	-
Não identificado	1526	-	-	0,98 \pm 0,00	1,44 \pm 0,07	-	-
<i>E</i> - α -Bisaboleno	1538	1549	-	1,90 \pm 0,00	3,08 \pm 0,12	-	-
Não identificado	1606	-	-	0,51 \pm 0,01	0,51 \pm 0,03	-	-
Óxido de α -Bisabolol B	1649	1656	0,66 \pm 0,01	1,92 \pm 0,01	2,16 \pm 0,01	2,41 \pm 0,07	1,82 \pm 0,05
Não identificado	1663	-	1,80 \pm 0,02	1,64 \pm 0,01	-	-	-
Não identificado	1667	-	-	-	-	-	0,80 \pm 0,12
α -Bisabolol	1687	1685	96,44 \pm 0,30	82,26 \pm 0,32	79,38 \pm 0,80	86,55 \pm 0,20	97,38 \pm 0,17
Óxido de α -Bisabolol A	1751	1748	-	0,42 \pm 0,03	-	-	-
Costunolida	1987	-	-	0,71 \pm 0,00	0,72 \pm 0,06	0,67 \pm 0,02	-
Eremantim	1989	1981	0,41 \pm 0,23	0,74 \pm 0,01	0,34 \pm 0,04	4,25 \pm 0,13	-
Identificados (%)			97,65	92,22	92,18	99,15	99,20
Não identificados (%)			1,80	3,12	1,95	0,78	0,80
Total (%)			99,45	95,34	94,13	99,92	100,0

IA_C = Índice aritmético calculado; IA_T = Índice aritmético tabelado.

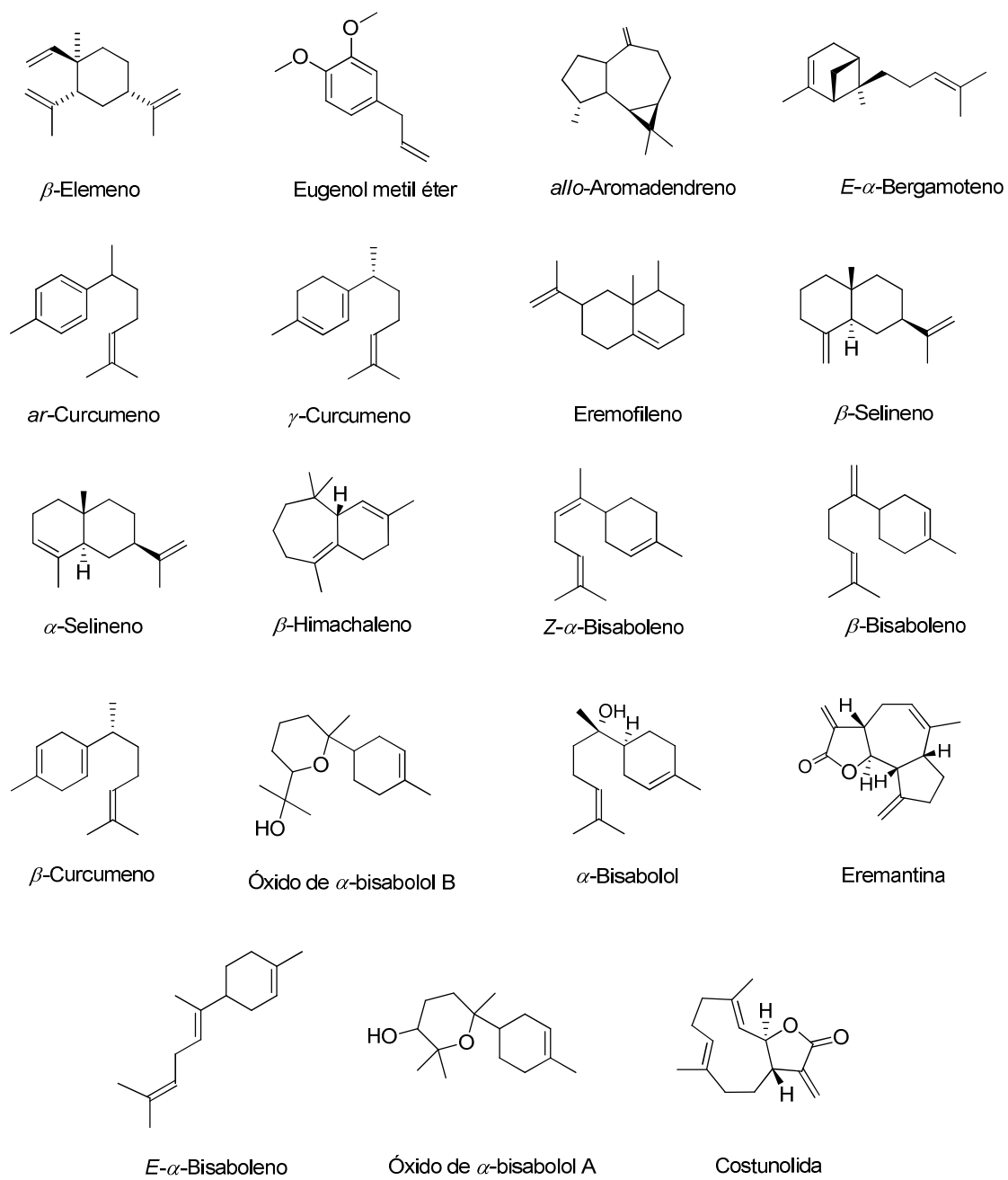


Figura S2.1. Estruturas dos constituintes dos óleos essenciais utilizados para quantificação de *α*-bisabolol.

DADOS SUPLEMENTARES 3 (S3)

UM MÉTODO DE RMN DE ^1H QUANTITATIVO PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE CITRONELAL, DE CITRONELOL E DE GERANIOL EM ÓLEOS ESSENCIAIS COMERCIAIS DE *Cymbopogon ssp.*

Tabela S3.1. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de citronelal em óleos essenciais usando o sinal $\delta = 9,75$.

m (mg)	Rep	S/R	I_{Cit1}	m_{Cit1} (mg)	Mm_{Cit1} (mg)	DP (%)	CV (%)
4,93	1	334,33	290,98	4,94	4,95	0,06	1,15
	2	335,67	288,62	4,90			
	3	329,13	295,22	5,01			
9,86	1	340,03	581,40	9,87	9,96	0,16	1,60
	2	398,07	581,42	9,87			
	3	499,17	597,66	10,14			
14,78	1	466,93	870,73	14,78	14,85	0,11	0,77
	2	471,57	871,81	14,80			
	3	437,99	882,81	14,94			
19,71	1	469,07	1165,93	19,79	19,65	0,12	0,60
	2	469,59	1155,10	19,61			
	3	472,66	1152,88	19,57			
24,64	1	441,25	1438,05	24,41	24,43	0,28	1,14
	2	515,35	1423,12	24,16			
	3	529,85	1455,89	24,71			
29,57	1	670,71	1699,13	28,84	29,02	0,16	0,54
	2	644,26	1717,09	29,15			
	3	747,10	1712,40	29,07			
34,50	1	810,12	2110,90	35,83	34,81	0,88	2,53
	2	800,95	2019,98	34,29			
	3	815,25	2022,01	34,32			

m = massa de citronelal utilizada; Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Cit1} = integral do sinal $\delta = 9,75$ do citronelal no espectro de RMN de ^1H ; m_{Cit1} = quantidade de citronelal encontrada; Mm_{Cit1} = média da quantidade de citronelal encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S3.2. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de geraniol em óleos essenciais usando o sinal $\delta = 5,42-5,36$.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Ger1}	m _{Ger1} (mg)	M _{mGer1} (mg)	DP (%)	CV (%)
5,40	1	182,28	314,84	5,34	5,34	0,00	0,07
	2	185,69	314,65	5,34			
	3	187,37	314,42	5,34			
10,81	1	194,38	633,67	10,76	10,61	0,32	2,99
	2	210,51	603,48	10,24			
	3	283,88	637,64	10,82			
16,21	1	247,18	971,80	16,49	16,47	0,05	0,32
	2	261,28	972,90	16,51			
	3	249,54	967,11	16,42			
21,61	1	271,75	1282,42	21,77	21,53	0,22	1,01
	2	273,58	1257,53	21,34			
	3	270,92	1264,71	21,47			
27,02	1	280,91	1619,10	27,48	27,46	0,15	0,56
	2	290,42	1608,29	27,30			
	3	300,83	1626,23	27,60			
32,42	1	362,71	1898,98	32,23	32,62	0,34	1,04
	2	357,39	1934,99	32,84			
	3	396,93	1931,63	32,79			
37,82	1	427,12	2215,01	37,60	37,43	0,15	0,40
	2	420,76	2198,72	37,32			
	3	425,75	2201,03	37,36			

m = massa de geraniol utilizada; Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Ger1} = integral do sinal $\delta = 5,42-5,36$ do geraniol no espectro de RMN de ^1H ; m_{Ger1} = quantidade de geraniol encontrada; M_{mGer1} = média da quantidade de geraniol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S3.3. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de geraniol em óleos essenciais usando o sinal $\delta = 4,13$.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Ger2}	m _{Ger2} (mg)	M _{mGer2} (mg)	DP (%)	CV (%)
5,40	1	506,77	641,03	5,44	5,41	0,05	0,90
	2	518,95	631,07	5,36			
	3	515,83	641,04	5,44			
10,81	1	538,18	1266,57	10,75	10,84	0,18	1,65
	2	611,85	1300,99	11,04			
	3	782,35	1262,87	10,72			
16,21	1	697,20	1926,10	16,35	16,40	0,07	0,43
	2	743,23	1928,27	16,36			
	3	688,25	1941,57	16,48			
21,61	1	746,74	2575,06	21,85	21,77	0,09	0,43
	2	753,60	2565,44	21,77			
	3	752,63	2553,23	21,67			
27,02	1	729,64	3201,35	27,17	27,35	0,29	1,06
	2	821,03	3203,48	27,19			
	3	834,97	3261,47	27,68			
32,42	1	1002,0	3802,89	32,27	32,54	0,26	0,81
	2	1003,3	3836,23	32,56			
	3	1147,9	3864,58	32,80			
37,82	1	1275,3	4396,00	37,31	37,33	0,02	0,05
	2	1281,2	4400,10	37,34			
	3	1285,6	4397,99	37,32			

m = massa de geraniol utilizada; Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Ger2} = integral do sinal $\delta = 4,13$ do geraniol no espectro de RMN de ^1H ; m_{Ger2} = quantidade de geraniol encontrada; M_{mGer2} = média da quantidade de geraniol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S3.4. Avaliação da linearidade do método de RMN de ^1H para determinação de citrônol em óleos essenciais usando o sinal $\delta = 3,61\text{-}3,74$.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Cit2}	m _{Cit2} (mg)	M _{mCit2} (mg)	DP (%)	CV (%)
5,450	1	275,43	645,05	5,55	5,56	0,02	0,40
	2	279,37	644,53	5,54			
	3	274,96	649,21	5,58			
10,90	1	291,16	1352,12	11,63	11,11	0,51	4,58
	2	327,37	1233,76	10,61			
	3	415,26	1290,04	11,09			
16,35	1	376,25	1930,88	16,60	16,67	0,06	0,38
	2	393,02	1938,88	16,67			
	3	367,73	1945,59	16,73			
21,80	1	408,81	2616,83	22,50	22,14	0,32	1,46
	2	396,71	2562,26	22,03			
	3	403,25	2545,03	21,88			
27,25	1	399,12	3212,41	27,62	27,79	0,25	0,89
	2	440,44	3218,39	27,67			
	3	448,41	3265,22	28,07			
32,70	1	574,26	3820,24	32,85	33,22	0,34	1,03
	2	535,42	3898,97	32,52			
	3	630,31	3870,39	33,28			
38,15	1	642,25	4412,36	37,94	38,07	0,34	0,89
	2	651,37	4472,52	38,45			
	3	645,22	438,87	37,82			

m = massa de citrônol utilizada; Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Cit2} = integral do sinal $\delta = 3,61\text{-}3,74$ do citrônol no espectro de RMN de ^1H ; m_{Cit2} = quantidade de citrônol encontrada; M_{mCit2} = média da quantidade de citrônol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S3.5. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de citronelal em óleos essenciais usando o sinal $\delta = 9,75$.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Cit1}	m _{Cit1} (mg)	Mm _{Cit1} (mg)	DP (%)	CV (%)
5,20	1	376,55	293,07	5,16	5,24	0,11	2,05
	2	340,73	304,82	5,36			
	3	372,71	295,99	5,21			
10,40	1	437,34	591,85	10,42	10,56	0,27	2,57
	2	426,08	617,66	10,87			
	3	436,47	590,10	10,38			
15,60	1	535,63	911,08	16,03	15,81	0,20	1,24
	2	434,60	892,32	15,70			
	3	482,36	891,36	15,69			
20,80	1	530,61	1174,75	20,67	20,69	0,03	0,12
	2	594,09	1177,29	20,72			
	3	630,66	1174,77	20,67			
26,00	1	631,62	1450,06	25,52	25,31	0,19	0,74
	2	529,04	1430,87	25,18			
	3	637,68	1432,80	25,21			
31,20	1	619,03	1740,06	30,62	30,70	0,09	0,30
	2	519,06	1742,84	30,67			
	3	759,08	1750,12	30,80			
36,40	1	815,26	2032,14	35,76	35,61	0,14	0,38
	2	826,19	2035,29	35,57			
	3	800,92	2037,13	35,50			

m = massa de citronelal utilizada; Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Cit1} = integral do sinal $\delta = 9,75$ do citronelal no espectro de RMN de ^1H ; m_{Cit1} = quantidade de citronelal encontrada; Mm_{Cit1} = média da quantidade de citronelal encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S3.6. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de geraniol em óleos essenciais usando o sinal $\delta = 5,42-5,36$.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Ger1}	m _{Ger1} (mg)	Mm _{Ger1} (mg)	DP (%)	CV (%)
5,39	1	198,79	306,28	5,39	5,31	0,08	1,55
	2	186,23	296,93	5,23			
	3	194,89	301,77	5,31			
10,78	1	228,53	602,23	10,60	10,68	0,38	3,59
	2	227,50	630,92	11,10			
	3	222,91	588,12	10,35			
16,18	1	285,55	910,72	16,03	16,33	0,27	1,64
	2	244,41	939,00	16,52			
	3	265,19	934,73	16,45			
21,57	1	293,10	1244,48	21,90	21,86	0,12	0,55
	2	317,30	1247,79	21,96			
	3	341,85	1234,76	21,73			
26,96	1	376,88	1554,06	27,35	27,28	0,12	0,44
	2	315,75	1542,24	27,14			
	3	356,09	1554,16	27,35			
32,35	1	351,29	1863,17	32,79	33,00	0,34	1,02
	2	353,17	1897,14	33,39			
	3	342,11	1864,98	32,82			
37,74	1	400,23	2159,30	38,00	38,00	0,10	0,25
	2	425,62	2153,60	37,90			
	3	400,65	2164,40	38,09			

m = massa de geraniol utilizada; Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Ger1} = integral do sinal $\delta = 5,42-5,36$ do geraniol no espectro de RMN de ^1H ; m_{Ger1} = quantidade de geraniol encontrada; Mm_{Ger1} = média da quantidade de geraniol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S3.7. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de geraniol em óleos essenciais usando o sinal $\delta = 4,13$.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Ger2}	m _{Ger2} (mg)	Mm _{Ger2} (mg)	DP (%)	CV (%)
5,39	1	564,89	609,32	5,36	5,37	0,03	0,51
	2	524,61	607,37	5,34			
	3	564,66	613,42	5,40			
10,78	1	665,08	1210,88	10,65	10,70	0,42	3,96
	2	655,41	1266,80	11,15			
	3	663,57	1170,96	10,30			
16,18	1	749,98	1873,48	16,48	16,57	0,09	0,54
	2	772,46	1883,23	16,57			
	3	746,91	1893,81	16,66			
21,57	1	924,88	2507,82	22,07	22,13	0,09	0,40
	2	924,92	2526,17	22,23			
	3	985,70	2510,18	22,09			
26,96	1	1040,59	3120,00	27,45	27,17	0,24	0,89
	2	1006,69	3070,89	27,02			
	3	1006,27	3074,25	27,05			
32,35	1	1069,14	3776,27	33,23	33,04	0,28	0,85
	2	1039,76	3718,46	32,72			
	3	1175,36	3771,22	33,18			
37,74	1	1256,27	4318,75	38,00	38,07	0,21	0,55
	2	1269,42	4352,85	38,30			
	3	1265,21	4307,39	37,90			

m = massa de geraniol utilizada; Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Ger2} = integral do sinal $\delta = 4,13$ do geraniol no espectro de RMN de ^1H ; m_{Ger2} = quantidade de geraniol encontrada; M_{mGer2} = média da quantidade de geraniol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S3.8. Avaliação da repetibilidade do método de RMN de ^1H para determinação de citrônol em óleos essenciais usando o sinal $\delta = 3,61\text{-}3,74$.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Cit2}	m _{Cit2} (mg)	M _{mCit2} (mg)	DP (%)	CV (%)
5,57	1	304,91	641,42	5,72	5,66	0,11	1,97
	2	286,89	619,99	5,53			
	3	306,84	641,80	5,72			
11,15	1	365,23	1224,49	10,92	10,99	0,50	4,56
	2	360,42	1292,95	11,53			
	3	360,19	1181,40	10,53			
16,72	1	446,06	1880,70	16,76	16,76	0,10	0,62
	2	369,98	1891,69	16,86			
	3	408,42	1868,36	16,85			
22,29	1	444,05	2585,12	23,04	22,45	0,54	2,42
	2	497,89	2465,87	21,98			
	3	533,23	2503,75	22,32			
27,87	1	557,69	3088,28	27,53	27,72	0,22	0,79
	2	452,36	3136,67	27,96			
	3	543,18	3105,26	27,68			
33,44	1	526,02	3812,75	33,99	33,84	0,24	0,70
	2	540,58	3765,87	33,57			
	3	543,18	3810,62	33,97			
39,01	1	633,85	4459,25	39,75	39,73	0,02	0,05
	2	635,26	4458,10	39,75			
	3	642,25	4454,86	39,71			

m = massa de citrônol utilizada; Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Cit2} = integral do sinal $\delta = 3,61\text{-}3,74$ do citrônol no espectro de RMN de ^1H ; m_{Cit2} = quantidade de citrônol encontrada; M_{mCit2} = média da quantidade de citrônol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S3.9. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de citronelal em óleos essenciais usando o sinal $\delta = 9,75$.

Rep	S/R	I _{Cit1}	P _{Cit1} (%)	Ex (%)	M _{Ex} (%)	DP (%)	CV (%)
1	376,55	290,98	96,21	100,22			
2	340,73	288,62	95,43	99,41	100,44	1,15	1,15
3	372,71	295,22	97,62	101,68			
1	437,34	581,40	96,12	100,13			
2	426,08	581,42	96,12	100,13	101,06	1,62	1,60
3	436,47	597,66	96,81	102,93			
1	535,63	870,73	95,97	99,97			
2	434,60	871,81	96,08	100,08	100,47	0,77	0,77
3	482,36	882,81	97,30	101,36			
1	530,61	1165,93	96,38	100,40			
2	594,09	1155,10	95,48	99,46	99,71	0,60	0,60
3	630,66	1152,88	95,30	99,27			
1	631,62	1438,05	95,10	99,06			
2	529,04	1423,12	94,11	98,03	99,13	1,13	1,14
3	637,68	1455,89	96,28	100,29			
1	619,03	1699,13	93,64	97,54			
2	519,06	1717,09	94,63	98,57	98,14	0,53	0,54
3	759,08	1712,40	94,37	98,30			
1	815,26	2110,90	99,71	103,87			
2	826,19	2019,98	95,42	99,39	100,92	2,55	2,53
3	800,92	2022,01	95,51	99,49			

Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Cit1} = integral do sinal do citronelal no espectro de RMN de ^1H ; P_{Cit1} = pureza calculada do citronelal; Ex = exatidão; M_{Ex} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S3.10. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de geraniol em óleos essenciais usando o sinal $\delta = 5,42-5,36$.

Rep	S/R	I _{Ger1}	P _{Ger1} (%)	Ex (%)	M _{Ex} (%)	DP (%)	CV (%)
1	182,28	314,84	95,93	98,90			
2	185,69	314,65	95,88	98,84	98,84	0,07	0,07
3	187,37	314,42	95,81	98,77			
1	194,38	633,67	96,54	99,53			
2	210,51	603,48	91,94	94,79	98,16	2,93	2,99
3	283,88	637,64	97,15	100,15			
1	247,18	971,80	98,71	101,76			
2	261,28	972,90	98,82	101,87	101,63	0,32	0,32
3	249,54	967,11	98,23	101,27			
1	271,75	1282,42	97,69	100,71			
2	273,58	1257,53	95,69	98,76	99,60	1,01	1,01
3	270,92	1264,71	96,34	99,32			
1	280,91	1619,10	98,67	101,72			
2	290,42	1608,29	98,01	101,04	101,65	0,57	0,56
3	300,83	1626,23	99,11	102,17			
1	362,71	1898,98	96,44	99,42			
2	357,39	1934,99	98,27	101,31	100,62	1,04	1,04
3	396,93	1931,63	98,10	101,13			
1	427,12	2215,01	96,42	99,40			
2	420,76	2198,72	95,71	98,67	98,95	0,40	0,40
3	425,75	2201,03	95,81	98,77			

Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Ger1} = integral do sinal do geraniol no espectro de RMN de ^1H ; P_{Ger1} = pureza calculada do geraniol; Ex = exatidão; M_{Ex} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S3.11. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de geraniol em óleos essenciais usando o sinal $\delta = 4,13$.

Rep	S/R	I _{Ger2}	P _{Ger2} (%)	Ex (%)	M _{Ex} (%)	DP (%)	CV (%)
1	506,77	641,03	97,66	100,68			
2	518,95	631,07	96,15	99,12	100,16	0,90	0,90
3	515,83	641,04	97,67	100,69			
1	538,18	1266,57	96,48	99,47			
2	611,85	1300,99	99,11	102,17	100,27	1,65	1,65
3	782,35	1262,87	96,20	99,18			
1	697,20	1926,10	97,82	100,84			
2	743,23	1928,27	97,93	100,96	101,15	0,44	0,43
3	688,25	1941,57	98,60	101,65			
1	746,74	2575,06	98,08	101,11			
2	753,60	2565,44	97,71	100,74	100,70	0,43	0,43
3	752,63	2553,23	97,25	100,26			
1	729,64	3201,35	97,55	100,57			
2	821,03	3203,48	97,61	100,63	101,22	1,07	1,06
3	834,97	3261,47	99,38	102,45			
1	1002,0	3802,89	96,56	99,55			
2	1003,3	3836,23	97,41	100,42	100,38	0,81	0,81
3	1147,9	3864,58	98,13	101,17			
1	1275,3	4396,00	95,68	98,64			
2	1281,2	4400,10	95,77	98,73	98,68	0,05	0,05
3	1285,6	4397,99	95,72	98,68			

Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Ger2} = integral do sinal do geraniol no espectro de RMN de ^1H ; P_{Ger2} = pureza calculada do geraniol; Ex = exatidão; M_{Ex} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S3.12. Avaliação da exatidão do método de RMN de ^1H para determinação de citrônol em óleos essenciais usando o sinal $\delta = 3,61\text{-}3,74$.

Rep	S/R	I _{Cit2}	P _{Cit2} (%)	Ex (%)	M _{Ex} (%)	DP (%)	CV (%)
1	275,43	645,05	96,67	101,76			
2	279,37	644,53	96,59	101,68	101,95	0,40	0,40
3	274,96	649,21	97,30	102,42			
1	291,16	1352,12	101,32	106,65			
2	327,37	1233,76	92,45	97,32	101,91	4,67	4,58
3	415,26	1290,04	96,67	101,76			
1	376,25	1930,88	96,46	101,54			
2	393,02	1938,88	96,86	101,96	101,93	0,39	0,38
3	367,73	1945,59	97,19	102,31			
1	408,81	2616,83	98,05	103,21			
2	396,71	2562,26	96,00	101,05	101,54	1,48	1,46
3	403,25	2545,03	95,35	100,37			
1	399,12	3212,41	96,29	101,36			
2	440,44	3218,39	96,47	101,54	101,97	0,91	0,89
3	448,41	3265,22	97,87	103,02			
1	574,26	3820,24	95,42	100,44			
2	535,42	3898,97	97,39	102,51	101,57	1,05	1,03
3	630,31	3870,39	96,67	101,76			
1	642,25	4412,36	94,47	99,44			
2	651,37	4472,52	95,76	100,80	99,79	0,88	0,89
3	645,22	438,87	94,18	99,14			

Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Cit2} = integral do sinal do citrônol no espectro de RMN de ^1H ; P_{Cit2} = pureza calculada do citrônol; Ex = exatidão; M_{Ex} = média da exatidão; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela S3.13. Avaliação da estabilidade do analito citronelal e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano em clorofórmio deuterado usando o sinal $\delta = 9,75$ obtido no espectro de RMN de ^1H do citronelal.

Tempo	Rep	S/R	I_{Cit1}	m_{Cit1} (mg)	Mm_{Cit1} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
Inicial (0 h)	1	469,07	870,73	14,78				
	2	469,59	871,71	14,80	14,85	0,11	0,75	NA
	3	472,66	882,81	14,98				
Após 6 h	1	462,84	916,14	15,55				
	2	462,42	904,29	15,35	15,28	0,30	1,98	0,55
	3	439,37	881,04	14,95				
Após 12 h	1	466,38	900,81	15,29				
	2	447,60	903,20	15,33	15,31	0,02	0,14	0,36
	3	427,26	902,51	15,32				
Após 18 h	1	462,42	914,46	15,52				
	2	462,84	886,87	15,09	15,25	0,24	1,58	0,43
	3	519,97	894,76	15,19				
Após 24 h	1	447,60	910,93	15,46				
	2	466,38	889,63	15,10	15,20	0,23	1,54	0,45
	3	523,68	885,20	15,03				
Média (%)					15,18			
DP ₁ (%)					0,19			
CV ₁ (%)					1,25			

Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Cit1} = integral do sinal do citronelal no espectro de RMN de ^1H ; m_{Cit1} = quantidade de citronelal encontrada; Mm_{Cit1} = média da quantidade de citronelal encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = Não aplicável; D = diferença em percentagem entre a quantidade de citronelal encontrada usando os espectros de RMN de ^1H nos diferentes intervalos de tempo analisados; Média = média da massa de citronelal encontrada em todos os intervalos de tempo analisados; SD1 = desvio padrão em todos os intervalos de tempo analisados; CV1 = coeficiente de variação em todos os intervalos de tempo analisados.

Tabela S3.14. Avaliação da estabilidade do analito geraniol e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano em clorofórmio deuterado usando o sinal $\delta = 5,42-5,36$ obtido no espectro de RMN de ^1H do geraniol.

Tempo	Rep	S/R	I _{Ger1}	m _{Ger1} (mg)	Mm _{Ger1} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
Inicial (0 h)	1	271,7	971,80	16,49				
	2	273,5	972,90	16,51	16,47	0,0	0,32	NA
	3	270,9	967,11	16,42				
Após 6 h	1	260,9	963,49	16,35				
	2	263,1	955,49	16,22	16,01	0,4	3,00	0,55
	3	251,3	911,01	15,46				
Após 12 h	1	265,5	946,3	16,06				
	2	255,1	953,49	16,18	16,27	0,2	1,64	0,36
	3	246,1	976,4	16,57				
Após 18 h	1	263,1	954,35	16,20				
	2	260,9	934,88	15,87	16,13	0,2	1,42	0,43
	3	289,7	960,84	16,31				
Após 24 h	1	255,1	981,12	16,65				
	2	265,5	948,38	16,10	16,07	0,6	3,75	0,45
	3	292,0	910,13	15,45				
Média (%)					15,18			
DP ₁ (%)					0,19			
CV ₁ (%)					1,25			

Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Ger1} = integral do sinal do geraniol no espectro de RMN de ^1H ; m_{Ger1} = quantidade de geraniol encontrada; Mm_{Ger1} = média da quantidade de geraniol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = Não aplicável; D = diferença em percentagem entre a quantidade de geraniol encontrada usando os espectros de RMN de ^1H nos diferentes intervalos de tempo analisados; Média = média da massa de geraniol encontrada em todos os intervalos de tempo analisados; SD1 = desvio padrão em todos os intervalos de tempo analisados; CV1 = coeficiente de variação em todos os intervalos de tempo analisados.

Tabela S3.15. Avaliação da estabilidade do analito geraniol e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano em clorofórmio deuterado usando o sinal $\delta = 4,13$ obtido no espectro de RMN de ^1H do geraniol.

Tempo	Rep	S/R	$I_{\text{Ger}2}$	$m_{\text{Ger}2}$ (mg)	$Mm_{\text{Ger}2}$ (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
Inicial (0 h)	1	746,74	1926,10	16,35				
	2	753,60	1928,27	16,36	16,40	0,07	0,43	NA
	3	752,63	1941,57	16,48				
Após 6 h	1	726,52	1932,00	16,40				
	2	726,42	1892,22	16,06	16,06	0,34	2,14	0,55
	3	694,00	1851,16	15,71				
Após 12 h	1	736,71	1912,07	16,23				
	2	707,12	1886,93	16,01	16,20	0,18	1,11	0,36
	3	684,04	1928,87	16,37				
Após 18 h	1	726,41	1889,77	16,04				
	2	726,52	1879,24	15,95	16,06	0,12	0,74	0,43
	3	810,59	1906,94	16,18				
Após 24 h	1	707,12	1952,43	16,57				
	2	736,71	1913,68	16,24	16,19	0,41	2,55	0,45
	3	826,76	1855,64	15,75				
Média (%)					16,18			
DP ₁ (%)					0,14			
CV ₁ (%)					0,86			

Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; $I_{\text{Ger}2}$ = integral do sinal do geraniol no espectro de RMN de ^1H ; $m_{\text{Ger}2}$ = quantidade de geraniol encontrada; $Mm_{\text{Ger}2}$ = média da quantidade de geraniol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = Não aplicável; D = diferença em percentagem entre a quantidade de geraniol encontrada usando os espectros de RMN de ^1H nos diferentes intervalos de tempo analisados; Média = média da massa de geraniol encontrada em todos os intervalos de tempo analisados; SD1 = desvio padrão em todos os intervalos de tempo analisados; CV1 = coeficiente de variação em todos os intervalos de tempo analisados.

Tabela S3.16. Avaliação da estabilidade do analito citronelol e do padrão interno octametilciclotetrasiloxano em clorofórmio deuterado usando o sinal $\delta = 3,61-3,74$ obtido no espectro de RMN de ^1H do citronelol.

Tempo	Rep	S/R	I _{Cit2}	m _{Cit2} (mg)	Mm _{Cit2} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
Inicial (0 h)	1	408,81	1930,88	16,60				
	2	396,71	1938,88	16,67	16,67	0,06	0,38	NA
	3	403,25	1945,59	16,73				
Após 6 h	1	390,50	1921,64	16,52				
	2	393,21	1890,84	16,26	16,23	0,31	1,92	0,55
	3	379,75	1849,46	15,90				
Após 12 h	1	396,34	1935,71	16,64				
	2	378,01	1920,04	16,51	16,74	0,30	1,78	0,36
	3	370,04	1986,48	17,08				
Após 18 h	1	393,21	1889,78	16,25				
	2	390,50	1891,31	16,26	16,40	0,25	1,50	0,43
	3	443,20	1940,00	16,68				
Após 24 h	1	378,01	1940,93	16,69				
	2	396,39	1931,34	16,61	16,42	0,40	2,45	0,45
	3	450,55	1855,43	15,95				
Média (%)					16,49			
DP ₁ (%)					0,21			
CV ₁ (%)					1,28			

Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Cit2} = integral do sinal do citronelol no espectro de RMN de ^1H ; m_{Cit2} = quantidade de citronelol encontrada; Mm_{Cit2} = média da quantidade de citronelol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = Não aplicável; D = diferença em percentagem entre a quantidade de citronelol encontrada usando os espectros de RMN de ^1H nos diferentes intervalos de tempo analisados; Média = média da massa de citronelol encontrada em todos os intervalos de tempo analisados; SD1 = desvio padrão em todos os intervalos de tempo analisados; CV1 = coeficiente de variação em todos os intervalos de tempo analisados.

Tabela S3.17. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H usando o sinal $\delta = 9,75$ para determinação de citronelal em óleo essencial.

Parâmetro	m (mg)	Rep	S/R	I_{Ger1}	m_{Ger1} (mg)	$M_{m\text{Ger1}}$ (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
nt = 16; temp. de 25 °C	14,78	1	469,0	870,73	14,78	14,85	0,11	0,77	NA
		2	469,5	871,71	14,80				
		3	472,6	882,81	14,98				
nt = 8; sem controle de temp.	14,78	1	465,7	921,40	15,64	15,22	0,42	2,75	2,47
		2	469,8	896,29	15,64				
		3	472,1	872,04	15,21				

nt = número de transientes; temp. = temperatura; m = massa de citronelal utilizada, Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Cit1} = Integral do sinal do citronelal no espectro de RMN de ^1H ; m_{Cit1} = quantidade de citronelal encontrada; $M_{m\text{Cit1}}$ = média da quantidade de citronelal encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = não aplicável; D = diferença em porcentagem entre a quantidade de citronelal encontrada pelos espectros de RMN de ^1H adquiridos usando diferentes números de transientes.

Tabela S3.18. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H usando o sinal $\delta = 5,42\text{-}5,36$ para determinação de geraniol em óleo essencial.

Parâmetro	m (mg)	Rep	S/R	I_{Ger1}	m_{Ger1} (mg)	$M_{m_{\text{Ger1}}}$ (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
nt = 16; temp. de 25 °C	16,21	1	271,75	971,80	16,49	16,47	0,05	0,32	NA
		2	273,58	972,90	16,51				
		3	270,90	967,11	16,42				
nt = 8; sem controle de temp.	16,21	1	211,62	964,49	16,37	16,25	0,16	1,01	1,36
		2	272,98	946,40	16,06				
		3	270,65	961,17	16,31				

nt = número de transientes; temp. = temperatura; m = massa de geraniol utilizada, Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Ger1} = Integral do sinal do geraniol no espectro de RMN de ^1H ; m_{Ger1} = quantidade de geraniol encontrada; $M_{m_{\text{Ger1}}}$ = média da quantidade de geraniol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = não aplicável; D = diferença em porcentagem entre a quantidade de geraniol encontrada pelos espectros de RMN de ^1H adquiridos usando diferentes números de transientes.

Tabela S3.19. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H usando o sinal $\delta = 4,13$ para determinação de geraniol em óleo essencial.

Parâmetro	m (mg)	Rep	S/R	$I_{\text{Ger}2}$	$m_{\text{Ger}2}$ (mg)	$Mm_{\text{Ger}2}$ (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
nt = 16; temp. de 25 °C.	16,21	1	746,74	1926,10	16,35	16,40	0,07	0,43	NA
		2	753,60	1928,27	16,36				
		3	752,63	1941,57	16,48				
nt = 8; sem controle de temp.	16,21	1	746,62	1959,33	16,63	16,35	0,24	1,49	0,29
		2	754,12	1907,48	16,19				
		3	752,25	1912,17	16,23				

nt = número de transientes; temp. = temperatura; m = massa de geraniol utilizada, Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; $I_{\text{Ger}2}$ = Integral do sinal do geraniol no espectro de RMN de ^1H ; $m_{\text{Ger}2}$ = quantidade de geraniol encontrada; $Mm_{\text{Ger}2}$ = média da quantidade de geraniol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = não aplicável; D = diferença em porcentagem entre a quantidade de geraniol encontrada pelos espectros de RMN de ^1H adquiridos usando diferentes números de transientes.

Tabela S3.20. Avaliação da robustez do método de RMN de ^1H usando o sinal $\delta = 3,61\text{-}3,74$ para determinação de citrônol em óleo essencial.

Parâmetro	m (mg)	Rep	S/R	I_{Cit2}	m_{Cit2} (mg)	Mm_{Cit2} (mg)	DP (%)	CV (%)	D (%)
nt = 16; sem controle de temp.	16,35	1	408,81	1930,88	16,60	16,67	0,06	0,38	NA
		2	396,71	1938,88	16,67				
		3	403,25	1945,59	16,73				
nt = 8; sem controle de temp.	16,35	1	408,26	1946,42	16,74	16,77	0,27	1,61	0,62
		2	396,25	1921,39	16,52				
		3	403,15	1983,78	17,06				

nt = número de transientes; temp. = temperatura; m = massa de citrônol utilizada, Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Cit2} = Integral do sinal do citrônol no espectro de RMN de ^1H ; m_{Cit2} = quantidade de citrônol encontrada; Mm_{Cit2} = média da quantidade de citrônol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NA = não aplicável; D = diferença em porcentagem entre a quantidade de citrônol encontrada pelos espectros de RMN de ^1H adquiridos usando diferentes números de transientes.

Tabela S3.21. Avaliação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) usando o sinal $\delta = 9,75$ no espectro de RMN de ^1H do citrônalo.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Cit1}	m _{Cit1} (mg)	Mm _{Cit1} (mg)	DP (%)	CV (%)	Erro (%)
0,10	1	10,152	6,1900	0,09				
	2	9,3348	6,1200	0,09	0,08	0,01	1,62	3,66
	3	10,152	5,2800	0,08				
0,49	1	49,000	33,270	0,48				
	2	50,077	33,320	0,48	0,48	0,01	1,35	1,80
	3	52,995	34,080	0,49				
0,98	1	92,638	62,840	0,90				
	2	87,632	60,890	0,87	0,89	0,01	1,61	9,64
	3	85,713	61,530	0,88				
2,45	1	212,92	168,09	2,41				
	2	197,10	168,94	2,42	2,42	0,01	0,48	1,14
	3	204,56	169,72	2,44				
4,90	1	296,88	331,20	4,75				
	2	309,18	323,17	4,78	4,77	0,02	0,35	2,68
	3	327,35	333,29	4,78				

m = massa de citrônalo utilizada; Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Cit1} = Integral do sinal do citrônalo no espectro de RMN de ^1H ; m_{Cit1} = quantidade de citrônalo encontrada; Mm_{Cit1} = média da quantidade de citrônalo encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; Erro = erro relativo.

Tabela S3.22. Avaliação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) usando o sinal $\delta = 5,42-5,36$ no espectro de RMN de ^1H do geraniol.

m	Rep	S/R	I _{Ger1}	m _{Ger1} (mg)	Mm _{Ger1} (mg)	DP (%)	CV (%)	Erro (%)
	1	14,406	6,190	0,09				
0,10	2	13,727	5,890	0,08	0,08	0,01	1,62	11,40
	3	13,378	4,950	0,07				
	1	70,055	32,72	0,47				
0,51	2	72,029	36,47	0,52	0,49	0,03	1,35	5,62
	3	76,974	33,80	0,49				
	1	138,66	62,77	0,90				
1,02	2	129,51	60,25	0,86	0,90	0,03	1,61	3,60
	3	128,49	64,75	0,93				
	1	322,81	164,80	2,37				
2,55	2	297,35	168,53	2,42	2,36	0,06	0,48	2,33
	3	315,08	160,83	2,31				
	1	457,47	342,33	4,91				
5,09	2	469,13	335,79	4,82	4,93	0,12	0,35	2,46
	3	499,60	352,56	5,06				

m = massa de geraniol utilizada; Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Ger1} = Integral do sinal do geraniol no espectro de RMN de ^1H ; m_{Ger1} = quantidade de geraniol encontrada; Mm_{Ger1} = média da quantidade de geraniol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; Erro = erro relativo.

Tabela S3.23. Avaliação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) usando o sinal $\delta = 4,13$ no espectro de RMN de ^1H do geraniol.

m	Rep	S/R	$I_{\text{Ger}2}$	$m_{\text{Ger}2}$ (mg)	$Mm_{\text{Ger}2}$	DP (%)	CV (%)	Erro (%)
0,10	1	65,500	12,65	0,09				
	2	69,000	11,85	0,09	0,08	0,01	9,02	17,66
	3	67,589	10,56	0,08				
0,51	1	73,362	69,70	0,50				
	2	74,285	72,38	0,52	0,51	0,01	2,44	2,10
	3	78,447	69,17	0,50				
1,02	1	85,157	129,49	0,93				
	2	81,232	127,24	0,91	0,93	0,01	1,28	9,07
	3	79,372	130,46	0,94				
2,55	1	189,67	338,18	2,43				
	2	176,68	338,74	2,43	2,42	0,02	0,73	5,01
	3	185,17	334,20	2,40				
5,09	1	265,59	704,25	5,05				
	2	275,31	713,00	5,12	5,09	0,03	0,62	0,41
	3	292,67	709,68	5,09				

m = massa de geraniol utilizada; Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; $I_{\text{Ger}2}$ = Integral do sinal do geraniol no espectro de RMN de ^1H ; $m_{\text{Ger}2}$ = quantidade de geraniol encontrada; $Mm_{\text{Ger}2}$ = média da quantidade de geraniol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; Erro = erro relativo.

Tabela S3.24. Avaliação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) usando o sinal $\delta = 3,61-3,74$ no espectro de RMN de ^1H do citrônolol.

m (mg)	Rep	S/R	I _{Cit2}	m _{Cit2} (mg)	Mm _{Cit2} (mg)	DP (%)	CV (%)	Erro (%)
0,10	1	5,9772	58,15	0,42				
	2	5,4788	57,12	0,42	0,41	0,02	4,28	294,8
	3	6,3772	53,56	0,49				
0,52	1	28,591	113,19	0,82				
	2	29,569	122,00	0,89	0,84	0,04	4,60	22,41
	3	30,333	112,41	0,82				
1,04	1	54,232	171,99	1,25				
	2	50,359	164,57	1,20	1,27	0,08	6,51	6,48
	3	50,167	186,87	1,36				
2,59	1	121,62	388,24	2,82				
	2	113,69	391,11	2,84	2,84	0,01	0,46	9,53
	3	116,71	391,54	2,85				
5,18	1	173,89	748,45	5,44				
	2	179,56	748,02	5,44	5,52	0,13	2,42	6,48
	3	189,11	780,10	5,67				

m = massa de citrônolol utilizada; Rep = replicatas; S/R = relação sinal/ruído; I_{Cit2} = Integral do sinal do citrônolol no espectro de RMN de ^1H ; m_{Cit2} = quantidade de citrônolol encontrada; Mm_{Cit2} = média da quantidade de citrônolol encontrada; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; Erro = erro relativo.

Tabela S3.25. Quantificação de citronelal nas amostras de óleo essencial de citronela usando o sinal $\delta = 9,75$ no espectro de RMN de ^1H NMR dos óleos essenciais.

Amostra	Rep	m (mg)	m _{PI} (mg)	S/R	I _{Cit1}	m _{Cit1} (mg)	Cit1 (%)	M _{Cit1} (%)	DP (%)
C1	1	59,86	1,00	597,73	1535,90	19,17	32,02		
	2	54,59	1,00	597,63	1404,88	17,53	32,12	32,12	0,10
	3	61,33	1,00	686,20	1583,83	19,77	32,23		
C2	1	56,77	1,00	611,44	1611,91	20,12	35,44		
	2	55,22	1,00	606,03	1561,91	20,74	35,30	35,59	0,39
	3	56,45	1,00	653,55	1629,63	20,34	36,03		
C3	1	56,96	1,00	540,84	1465,36	19,29	32,11		
	2	54,91	1,00	570,96	1433,23	18,34	32,58	32,44	0,29
	3	56,00	1,00	544,80	1464,20	18,57	32,63		
C4	1	54,11	1,00	563,37	1355,02	16,91	31,25		
	2	55,94	1,00	494,35	1441,02	17,98	31,15	31,20	0,07
	3	56,43	1,00	550,11	1426,73	17,81	31,55		
C5	1	55,32	1,00	478,53	1438,31	17,95	32,45		
	2	56,00	1,00	554,79	1465,00	18,28	32,65	32,55	0,14
	3	56,18	1,00	586,81	1483,18	18,51	32,95		
C6	1	54,72	1,00	468,25	1136,68	14,19	25,93		
	2	55,20	1,00	465,80	1124,48	14,03	25,42	25,42	0,50
	3	55,24	1,00	519,46	1103,20	13,77	24,93		
C7	1	57,11	1,00	518,93	1434,67	17,93	31,35		
	2	57,35	1,00	389,39	1439,43	18,22	31,33	31,48	0,25
	3	57,35	1,00	457,62	1459,57	18,34	31,76		
C8	1	58,04	1,00	327,19	1141,21	14,24	24,54		
	2	56,60	1,00	312,10	1086,12	13,56	23,95	24,35	0,35
	3	58,29	1,00	315,86	1146,93	14,31	24,56		

m = massa de amostra utilizada; m_{PI} = massa do padrão interno OMCTS utilizada; S/R = relação sinal/ruído; I_{Cit1} = Integral do sinal $\delta = 9,75$ referente ao citronelal no espectro de RMN do óleo essencial (amostra); m_{Cit1} = massa de citronelal encontrada; Cit1 = porcentagem de citronelal encontrada; M_{Cit1} = média da porcentagem de citronelal encontrada; DP = desvio padrão; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8 = amostras de óleo essencial de citronela.

Tabela S3.26. Quantificação de geraniol nas amostras de óleo essencial de citronela usando o sinal $\delta = 5,42-5,36$ no espectro de RMN de ^1H NMR dos óleos essenciais.

Amostra	Rep	m (mg)	m _{PI} (mg)	S/R	I _{Ger1}	m _{Ger1} (mg)	Ger1 (%)	M _{Ger1} (%)	DP (%)
C1	1	59,86	1,00	215,06	1200,88	11,58	19,35		
	2	54,59	1,00	204,85	1197,76	14,95	27,38	24,52	4,49
	3	61,33	1,00	222,24	1317,78	16,45	26,82		
C2	1	56,77	1,00	170,59	996,46	12,44	21,91		
	2	55,22	1,00	156,43	1030,13	12,86	23,28	22,57	0,69
	3	56,45	1,00	158,95	1018,79	12,72	22,52		
C3	1	56,96	1,00	245,12	1514,81	18,91	33,19		
	2	54,91	1,00	258,95	1415,92	17,67	32,18	32,31	0,83
	3	56,00	1,00	240,75	1415,35	17,66	31,54		
C4	1	54,11	1,00	194,34	1089,85	13,60	25,14		
	2	55,94	1,00	184,79	1196,30	14,93	26,69	25,91	1,10
	3	56,43	1,00	194,51	1172,49	14,63	25,93		
C5	1	55,32	1,00	225,61	1410,91	17,61	31,83		
	2	56,00	1,00	254,22	1458,91	18,21	32,51	32,17	0,48
	3	56,18	1,00	254,64	1461,28	18,24	32,46		
C6	1	54,72	1,00	244,99	1175,41	14,67	26,81		
	2	55,20	1,00	221,77	1183,91	14,78	26,77	26,49	0,51
	3	55,24	1,00	246,03	1146,43	14,31	25,90		
C7	1	57,11	1,00	280,55	1693,57	21,14	37,01		
	2	57,35	1,00	220,53	1673,30	20,88	36,41	36,55	0,41
	3	57,35	1,00	255,46	1665,08	20,78	36,24		
C8	1	58,04	1,00	232,70	1660,76	20,73	35,71		
	2	56,60	1,00	234,84	1618,77	20,20	35,69	35,96	0,45
	3	58,29	1,00	232,77	1703,57	21,26	36,48		

m = massa de amostra utilizada; m_{PI} = massa do padrão interno OMCTS utilizada; S/R = relação sinal/ruído; I_{Ger1} = Integral do sinal $\delta = 5,42-5,36$ referente ao geraniol no espectro de RMN do óleo essencial (amostra); m_{Ger1} = massa de geraniol encontrada; Ger1 = porcentagem de geraniol encontrada; M_{Ger1} = média da porcentagem de geraniol encontrada; DP = desvio padrão; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8 = amostras de óleo essencial de citronela.

Tabela S3.27. Quantificação de geraniol nas amostras de óleo essencial de citronela usando o sinal $\delta = 4,13$ no espectro de RMN de ^1H NMR dos óleos essenciais.

Amostra	Rep	m (mg)	m _{PI} (mg)	S/R	I _{Ger2}	m _{Ger2} (mg)	Ger ₂ (%)	m _{Ger2} (%)	DP (%)
C1	1	59,86	1,00	558,20	1855,84	11,58	19,35		
	2	54,59	1,00	548,81	1806,54	11,27	20,65	20,11	0,68
	3	61,33	1,00	629,10	1998,68	12,47	20,34		
C2	1	56,77	1,00	421,50	1445,82	9,02	15,89		
	2	55,22	1,00	400,47	1530,58	9,55	17,30	16,70	0,72
	3	56,45	1,00	420,94	1528,91	9,54	16,90		
C3	1	56,96	1,00	659,72	2572,09	16,05	28,18		
	2	54,91	1,00	695,98	2420,48	15,10	27,51	27,51	0,66
	3	56,00	1,00	662,26	2410,02	15,04	26,86		
C4	1	54,11	1,00	512,99	1697,52	10,59	19,58		
	2	55,94	1,00	466,57	1794,28	11,20	20,02	19,64	0,35
	3	56,43	1,00	508,53	1747,94	10,91	19,33		
C5	1	55,32	1,00	604,58	2536,14	15,89	28,61		
	2	56,00	1,00	701,84	2564,70	16,16	28,58	28,66	0,12
	3	56,18	1,00	713,55	2592,76	16,32	28,80		
C6	1	54,72	1,00	662,40	2132,40	13,31	24,32		
	2	55,20	1,00	631,50	2121,70	13,24	23,99	23,99	0,33
	3	55,24	1,00	695,77	2094,88	13,07	23,67		
C7	1	57,11	1,00	766,81	3038,98	18,96	33,21		
	2	57,35	1,00	585,39	3012,33	18,80	32,78	33,27	0,53
	3	57,35	1,00	681,10	3109,56	19,40	33,84		
C8	1	58,04	1,00	644,96	2934,28	18,31	31,55		
	2	56,60	1,00	626,94	2873,33	17,93	31,68	31,42	0,34
	3	58,29	1,00	630,16	2899,75	18,10	31,04		

m = massa de amostra utilizada; m_{PI} = massa do padrão interno OMCTS utilizada; S/R = relação sinal/ruído; I_{Ger2} = Integral do sinal $\delta = 4,13$ referente ao geraniol no espectro de RMN do óleo essencial (amostra); m_{Ger2} = massa de geraniol encontrada; Ger₂ = porcentagem de geraniol encontrada; M_{Ger2} = média da porcentagem de geraniol encontrada; DP = desvio padrão; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8 = amostras de óleo essencial de citronela.

Tabela S3.28. Quantificação de citronelol nas amostras de óleo essencial de citronela usando o sinal $\delta = 3,61-3,74$ no espectro de RMN de ^1H NMR dos óleos essenciais.

Amostra	Rep	m (mg)	m _{PI} (mg)	S/R	I _{Cit2}	m _{Cit2} (mg)	Cit2 (%)	Mm _{Cit2} (%)	DP (%)
C1	1	59,86	1,00	225,65	1418,27	8,97	14,98		
	2	54,59	1,00	225,46	1508,15	9,53	17,47	16,47	1,32
	3	61,33	1,00	235,96	1645,67	10,40	16,96		
C2	1	56,77	1,00	271,53	1811,21	11,45	20,17		
	2	55,22	1,00	267,67	1965,84	12,43	22,51	21,34	1,17
	3	56,45	1,00	282,10	1906,95	12,06	21,36		
C3	1	56,96	1,00	120,00	1004,82	6,35	11,15		
	2	54,91	1,00	128,09	942,68	5,96	10,85	11,01	0,15
	3	56,00	1,00	121,42	945,51	5,98	11,03		
C4	1	54,11	1,00	206,73	1371,81	8,67	16,03		
	2	55,94	1,00	183,00	1517,18	9,59	17,15	16,59	0,79
	3	56,43	1,00	203,94	1527,13	9,65	17,11		
C5	1	55,32	1,00	120,17	987,40	6,24	11,28		
	2	56,00	1,00	142,07	1078,59	6,82	12,18	11,73	0,63
	3	56,18	1,00	147,19	1100,04	6,95	12,38		
C6	1	54,72	1,00	160,36	1054,70	6,67	12,19		
	2	55,20	1,00	150,68	1067,58	6,75	12,23	12,00	0,35
	3	55,24	1,00	168,12	1013,11	6,40	11,59		
C7	1	57,11	1,00	125,17	1054,16	6,41	11,23		
	2	57,35	1,00	116,68	1018,74	6,55	11,43	11,27	0,14
	3	57,35	1,00	112,47	1073,09	6,39	11,15		
C8	1	58,04	1,00	105,33	1014,13	6,66	11,48		
	2	56,60	1,00	109,78	1036,44	6,44	11,38	11,50	0,13
	3	58,29	1,00	109,76	1011,35	6,78	11,64		

m = massa de amostra utilizada; m_{PI} = massa do padrão interno OMCTS utilizada; S/R = relação sinal/ruído; I_{Cit2} = Integral do sinal $\delta = 9,75$ referente ao citronelol no espectro de RMN do óleo essencial (amostra); m_{Cit1} = massa de citronelol encontrada; Cit2 = porcentagem de citronelol encontrada; MCit2 = média da porcentagem de citronelol encontrada; DP = desvio padrão; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8 = amostras de óleo essencial de citronela.

Tabela S3.29. Quantificação de citronelal em óleo essencial de citronela comercial utilizando os métodos de RMN de ^1H e de cromatografia gasosa usando padronização interna (CG-PI) e normalização de áreas (CG-N).

Óleo essencial	RMN de ^1H (%)	CG-PI (%)	CG-N (%)
C1	32,12 ± 0,11	32,61 ± 0,56	32,11 ± 0,47
C2	35,59 ± 0,39	35,48 ± 0,04	34,53 ± 0,38
C3	32,44 ± 0,29	31,70 ± 0,44	31,91 ± 0,65
C4	31,20 ± 0,07	31,91 ± 0,59	30,58 ± 0,09
C5	32,55 ± 0,14	30,50 ± 0,47	32,58 ± 0,42
C6	25,42 ± 0,50	24,92 ± 0,39	24,68 ± 0,81
C7	31,48 ± 0,24	30,26 ± 0,43	29,20 ± 0,14
C8	24,35 ± 0,35	24,31 ± 0,06	24,37 ± 0,54

C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8 = Óleo essencial comercial de citronela

Tabela S3.30. Quantificação de citronelol em óleo essencial de citronela comercial utilizando os métodos de RMN de ^1H e de cromatografia gasosa usando padronização interna (CG-PI) e normalização de áreas (CG-N).

Óleo Essencial	RMN de ^1H (%)	CG-PI (%)	CG-N (%)
C1	16,47 ± 1,32	16,65 ± 0,29	16,06 ± 0,23
C2	21,34 ± 1,14	22,84 ± 0,06	21,92 ± 0,23
C3	11,01 ± 0,15	11,18 ± 0,09	11,48 ± 0,30
C4	16,59 ± 0,79	16,35 ± 0,18	15,80 ± 0,05
C5	11,73 ± 0,63	11,92 ± 0,17	11,89 ± 0,33
C6	12,00 ± 0,36	12,70 ± 0,09	11,88 ± 0,18
C7	11,27 ± 0,14	11,68 ± 0,14	12,04 ± 0,07
C8	11,50 ± 0,13	11,86 ± 0,04	11,78 ± 0,09

C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 and C8 = Óleo essencial comercial de citronela

Table S3.31. Quantificação de geraniol em óleo essencial de citronela comercial utilizando os métodos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) usando os sinais $\delta = 5,42-5,36$ e $\delta = 4,13$ e de cromatografia gasosa usando padronização interna (CG-PI) e normalização de áreas (CG-N).

Óleo essencial	RMN de ^1H $\delta = 5,42-5,36$ (%)	RMN de ^1H $\delta = 4,13$ (%)	CG-PI (%)	CG-N (%)
C1	26,41 \pm 1,22	20,11 \pm 0,68	20,48 \pm 0,40	19,48 \pm 0,08
C2	22,57 \pm 0,69	16,70 \pm 0,73	16,39 \pm 0,16	16,26 \pm 0,10
C3	32,30 \pm 0,83	27,51 \pm 0,66	28,11 \pm 0,31	25,22 \pm 1,02
C4	25,92 \pm 0,78	19,64 \pm 0,35	20,33 \pm 0,28	19,05 \pm 0,10
C5	32,53 \pm 0,38	28,66 \pm 0,12	27,62 \pm 0,29	27,97 \pm 0,43
C6	26,49 \pm 0,51	23,99 \pm 0,33	24,59 \pm 0,34	22,92 \pm 0,44
C7	36,55 \pm 0,40	31,42 \pm 0,34	31,97 \pm 0,33	31,09 \pm 0,18
C8	35,96 \pm 0,45	33,27 \pm 0,53	33,59 \pm 0,06	33,15 \pm 0,09

C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8 = Óleo essencial comercial de citronela

Tabela S3.32. Composição química dos óleos essenciais de citronela (C1, C2, C3 e C4) determinadapor CG-EM.

Componentes	IAC	IAT	C1 (%)	C2 (%)	C3 (%)	C4 (%)
Limoneno	1023	1024	4,26 ± 0,41	3,88 ± 0,24	3,33 ± 0,39	3,67 ± 0,03
Z-β-Ocimeno	1034	1032	-	-	0,16 ± 0,02	0,90 ± 0,03
E-β-Ocimeno	1044	1044	-	-	-	-
Linalol	1097	1095	1,07 ± 0,12	0,75 ± 0,05	0,85 ± 0,10	-
Isopulegol	1140	1145	1,80 ± 0,23	0,92 ± 0,05	1,16 ± 0,13	1,58 ± 0,02
Citronelal	1155	1148	32,11 ± 0,47	34,53 ± 0,38	31,91 ± 0,65	30,58 ± 0,09
Neoisopulegol	1162	1167	-	-	-	-
Decanal	1202	1201	-	-	0,35 ± 0,05	-
Citronelol	1230	1223	16,06 ± 0,23	21,92 ± 0,23	11,48 ± 0,30	15,80 ± 0,05
Neral	1238	1235	0,45 ± 0,26	0,78 ± 0,34	3,06 ± 0,02	0,42 ± 0,01
Geraniol	1260	1249	17,65 ± 0,61	16,26 ± 0,10	25,22 ± 1,02	19,05 ± 0,10
Geranial	1269	1264	0,76 ± 0,44	0,88 ± 0,17	4,85 ± 1,10	0,49 ± 0,01
Acetato de citronelil	1352	1350	3,79 ± 0,23	4,12 ± 0,04	3,04 ± 0,14	3,87 ± 0,05
Eugenol	1354	1356	0,67 ± 0,01	-	-	0,78 ± 0,05
α-Copaeno	1367	1374	-	-	-	0,21 ± 0,03
Acetato de geranil	1383	1379	2,95 ± 0,25	2,72 ± 0,20	4,37 ± 0,23	3,03 ± 0,04
β-Elemeno	1387	1389	2,51 ± 0,16	1,56 ± 0,04	1,59 ± 0,06	2,50 ± 0,04
Z-Cariofileno	1409	1408	0,15 ± 0,01	0,08 ± 0,01	-	0,15 ± 0,01
E- Cariofileno	1413	1417	-	0,11 ± 0,01	1,54 ± 0,05	-
α-Guaieno	1430	1437	-	-	-	-
α-Humuleno	1446	1452	0,14 ± 0,03	-	0,24 ± 0,02	0,15 ± 0,00
γ-Muuroleno	1474	1478	2,97 ± 0,26	2,53 ± 0,06	0,89 ± 0,05	2,58 ± 0,03
Germacreno-D	1475	1484	-	-	-	-
δ-Selineno	1493	1496	0,84 ± 0,05	0,64 ± 0,01	0,38 ± 0,02	-
α-Muuroleno	1495	1500	0,64 ± 0,06	0,92 ± 0,01	0,38 ± 0,03	0,44 ± 0,39
Germacreno-A	1498	1508	0,77 ± 0,06	0,58 ± 0,01	1,07 ± 0,06	0,79 ± 0,14
α-Bulneseno	1505	1509	-	-	-	0,70 ± 0,14
γ-Cadineno	1508	1513	-	2,56 ± 0,01	-	2,96 ± 0,03
δ-Cadineno	1518	1522	2,90 ± 0,23	-	1,40 ± 0,06	0,19 ± 0,00
α-Cadineno	1542	1537	0,23 ± 0,06	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,03	3,11 ± 0,03
Elemol	1546	1548	2,90 ± 0,32	1,49 ± 0,11	1,47 ± 0,14	-
Germacreno D-4-ol	1570	1574	0,41 ± 0,06	0,27 ± 0,02	0,26 ± 0,00	0,58 ± 0,55
γ-Eudesmol	1626	1630	0,26 ± 0,04	0,24 ± 0,02	-	0,36 ± 0,03
Epi-α-Cadinol	1636	1638	0,61 ± 0,02	0,54 ± 0,01	-	0,86 ± 0,02
β-Eudesmol	1644	1649	0,36 ± 0,09	0,30 ± 0,03	-	0,38 ± 0,02
α-Cadinol	1649	1652	0,92 ± 0,08	1,04 ± 0,18	-	1,29 ± 0,05
Bulnesol	1663	1670	0,47 ± 0,14	0,22 ± 0,03	-	0,39 ± 0,03
Total (%)			99,76	99,54	99,43	98,86

IAC = Índice aritmético calculado; IAT = índice aritmético tabelado; C1, C2, C3 e C4 = óleos essenciais de citronela.

Tabela S3.33. Composição química dos óleos essenciais de citronela (C5, C6, C7 e C8) determinada por CG-EM.

Componentes	IAc	IAt	C5 (%)	C6 (%)	C7 (%)	C8 (%)
Limoneno	1023	1024	2,47 ± 0,29	1,25 ± 0,03	2,57 ± 0,20	2,24 ± 0,30
Z-β-Ocimeno	1034	1032	-	0,40 ± 0,01	0,25 ± 0,03	0,27 ± 0,04
E-β-Ocimeno	1044	1044	-	-	0,13 ± 0,02	0,16 ± 0,02
Linalol	1097	1095	0,55 ± 0,06	-	0,80 ± 0,06	0,90 ± 0,10
Isopulegol	1140	1145	1,09 ± 0,31	0,89 ± 0,04	1,54 ± 0,10	0,58 ± 0,14
Citronelal	1155	1148	30,43 ± 0,33	24,68 ± 0,81	29,20 ± 0,14	23,74 ± 0,29
Neoisopulegol	1162	1167	-	-	0,18 ± 0,02	-
Decanal	1202	1201	0,14 ± 0,05	-	-	0,65 ± 0,05
Citronelol	1230	1223	11,89 ± 0,33	11,88 ± 0,18	12,04 ± 0,07	11,78 ± 0,09
Neral	1238	1235	1,14 ± 0,05	0,75 ± 0,07	3,93 ± 0,04	5,58 ± 0,02
Geraniol	1260	1249	27,43 ± 2,21	21,92 ± 1,00	30,75 ± 0,43	34,38 ± 1,72
Geranial	1269	1264	1,85 ± 0,14	1,25 ± 0,36	5,29 ± 0,16	7,79 ± 0,56
Acetato de citronelil	1352	1350	3,98 ± 0,61	1,07 ± 0,03	1,65 ± 0,02	1,84 ± 0,01
Eugenol	1354	1356	-	0,30 ± 0,10	-	-
α-Copaeno	1367	1374	-	-	-	-
Acetato de geraniol	1383	1379	5,49 ± 0,07	0,97 ± 0,04	2,68 ± 0,04	3,87 ± 0,33
β-Elemeno	1387	1389	1,38 ± 0,10	0,73 ± 0,01	0,42 ± 0,01	-
Z-Cariofileno	1409	1408	-	-	1,87 ± 0,02	-
E-Cariofileno	1413	1417	0,44 ± 0,03	-	-	2,57 ± 0,25
α-Guaieno	1430	1437	-	-	0,10 ± 0,00	-
α-Humuleno	1446	1452	-	-	0,27 ± 0,00	0,30 ± 0,06
γ-Muuroleno	1474	1478	-	0,83 ± 0,03	0,68 ± 0,01	0,80 ± 0,46
Germacreno-D	1475	1484	0,88 ± 0,09	-	-	-
δ-Selineno	1493	1496	-	0,19 ± 0,01	-	-
α-Muuroleno	1495	1500	0,31 ± 0,05	0,64 ± 0,02	0,11 ± 0,00	-
Germacreno-A	1498	1508	0,60 ± 0,11	0,11 ± 0,01	0,38 ± 0,00	-
α-Bulneseno	1505	1509	-	-	1,03 ± 0,02	-
γ-Cadineno	1508	1513	0,41 ± 0,01	-	-	0,74 ± 0,05
δ-Cadineno	1518	1522	1,27 ± 0,12	1,17 ± 0,00	0,69 ± 0,02	0,30 ± 0,06
α-Cadineno	1542	1537	-	-	-	-
Elemol	1546	1548	3,14 ± 0,25	7,82 ± 0,30	0,62 ± 0,02	-
Germacreno-D-4-ol	1570	1574	1,26 ± 0,29	1,60 ± 0,09	0,44 ± 0,01	-
γ-Eudesmol	1626	1630	0,35 ± 0,09	2,43 ± 0,71	-	-
Epi-α-Cadinol	1636	1638	0,67 ± 0,09	9,93 ± 0,09	0,81 ± 0,05	-
β-Eudesmol	1644	1649	0,45 ± 0,16	-	-	-
α-Cadinol	1649	1652	1,05 ± 0,21	6,31 ± 0,54	0,81 ± 0,05	-
Bulnesol	1663	1670	0,73 ± 0,04	4,33 ± 0,08	0,21 ± 0,01	-
Total (%)			99,41	97,66	99,72	98,94

IAc = Índice aritmético calculado; IAt = índice aritmético tabelado; C5, C6, C7 e C8 = óleos essenciais de citronela.

Tabela S3.34. Composição química dos óleos essenciais de citronela formulados (C9, C10 e C11) determinada por CG-EM.

Componentes	IA _c	IA _t	C9 (%)	C10 (%)	C11 (%)
Limoneno	1023	1024	-	0,64 ± 0,03	-
Dipropileno glicol			79,63 ± 0,19	60,23 ± 0,16	90,30 ± 0,14
Linalol	1097	1095	0,89 ± 0,14	0,80 ± 0,06	-
Isopulegol	1140	1145	1,80 ± 0,03	1,78 ± 0,02	2,10 ± 0,03
Citronelal	1155	1148	3,82 ± 0,04	10,43 ± 0,09	2,37 ± 0,02
Citronelol	1230	1223	2,89 ± 0,01	16,51 ± 0,08	3,84 ± 0,00
Neral	1238	1235	0,38 ± 0,03	-	-
Geraniol	1260	1249	7,79 ± 0,06	4,91 ± 0,07	1,00 ± 0,15
Geranial	1269	1264	0,85 ± 0,05	-	-
Acetato de citronelil	1352	1350	0,34 ± 0,02	0,82 ± 0,01	-
Acetato de geranil	1383	1379	0,43 ± 0,06	1,13 ± 0,06	-
β -Elemeno	1387	1389	-	0,09 ± 0,04	0,11 ± 0,00
<i>E</i> -Cariofileno	1413	1417	0,87 ± 0,01	-	-
Germacreno-D	1475	1484	0,22 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,09 ± 0,01
α -Muuroleno	1495	1500	-	0,18 ± 0,01	-
γ -Cadineno	1508	1513	-	0,18 ± 0,01	-
δ -Cadineno	1518	1522	0,09 ± 0,01	0,65 ± 0,02	0,09 ± 0,01
Elemol	1546	1548		0,89 ± 0,03	0,11 ± 0,01
Total (%)			100,00	99,36	100,00

IA_c = Índice aritmético calculado; IA_t = índice aritmético tabelado; C9, C10 e C11 = óleos essenciais comerciais de citronela formulados.

Tabela S3.35. Rotação óptica dos óleos essenciais comerciais de citronela.

Amostra	m (mg)	α (°)	Conc (g.cm ⁻³)	Temp (°C)	$[\alpha]$ (°)
C1	11,82	-0,01	0,00591	23,8	-1,69
C2	10,32	0,00	0,00516	23,6	0,00
C3	13,52	0,00	0,00676	23,8	0,00
C4	14,14	-0,01	0,00707	23,3	-1,41
C5	11,45	0,00	0,00572	23,9	0,00
C6	12,29	+0,01	0,00614	23,3	+1,63
C7	13,54	0,00	0,00677	23,3	0,00
C8	10,77	0,00	0,00538	22,9	0,00
C9	11,12	0,00	0,00556	23,4	0,00
C10	12,11	0,00	0,00605	23,5	0,00
C11	11,35	0,00	0,00567	23,5	0,00

m = massa de óleo essencial; α = rotação fornecida pelo polarógrafo; Conc = concentração da solução do óleo essencial; Temp = temperatura; $[\alpha]$ = rotação óptica do óleo essencial; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10 e C11 = amostras de óleo essencial comercial de citronela.

Solvente: acetato de etila; volume da solução de óleo essencial: 2,0 mL; comprimento da cubeta de amostragem: 1,00 dm.

Tabela S3.36. Índice de refração (IR) das amostras de óleo essencial comercial de citronela.

Amostras	IR
C1	1,466
C2	1,462
C3	1,466
C4	1,467
C5	1,466
C6	1,474
C7	1,466
C8	1,469
C9	1,420
C10	1,429
C11	1,425

C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10 e C11 = amostras de óleo essencial comercial de citronela.

Tabela S3.37. Densidade relativa das amostras de óleo essencial comercial de citronela.

	Água	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
m ₁ (g)	0,0973	0,0857	0,0859	0,0862	0,0857	0,0863	0,0872	0,0858	0,0857	0,0905	0,0910	0,0956
m ₂ (g)	0,0966	0,0871	0,0864	0,0854	0,0858	0,0865	0,0877	0,0862	0,0868	0,0912	0,0915	0,0927
m ₃ (g)	0,0971	0,0863	0,0864	0,0861	0,0863	0,0863	0,0878	0,0863	0,0859	0,0891	0,0900	0,0954
m ₄ (g)	0,0986	0,0863	0,0857	0,0859	0,0864	0,0856	0,0872	0,0856	0,0865	0,0907	0,0918	0,0956
m ₅ (g)	0,0978	0,0861	0,0862	0,0861	0,0864	0,0862	0,0873	0,0862	0,0854	0,0901	0,0910	0,0956
m ₆ (g)	0,0981	0,0865	0,0857	0,0886	0,0865	0,0862	0,0872	0,0858	0,0861	0,0907	0,0917	0,0939
m ₇ (g)	0,0971	0,0865	0,0859	0,0861	0,0865	0,0867	0,0873	0,0859	0,0861	0,0902	0,0910	0,0937
m ₈ (g)	0,0985	0,0865	0,0858	0,0857	0,0865	0,0886	0,0873	0,0858	0,0859	0,0899	0,0912	0,0954
m ₉ (g)	0,0973	0,0864	0,0866	0,0858	0,0864	0,0857	0,0877	0,0859	0,0864	0,0895	0,0908	0,0953
m ₁₀ (g)	0,0977	0,0861	0,0857	0,0862	0,0857	0,0864	0,0873	0,0862	0,0864	0,0902	0,0910	0,0957
Mm (g)	0,0976	0,0864	0,0860	0,0860	0,0862	0,0862	0,0874	0,0860	0,0861	0,0902	0,0911	0,0949
D (g.mL ⁻¹)	0,9761	0,8635	0,8603	0,8595	0,8622	0,8619	0,8740	0,8597	0,8612	0,9021	0,9110	0,9489
DR	--	0,850	0,8810	0,8810	0,8830	0,8830	0,8950	0,8810	0,8820	0,9240	0,9330	0,9720

m₁, m₂, m₃, m₄, m₅, m₆, m₇, m₈, m₉, m₁₀ = massa obtida pela pesagem de 100 µL do óleo essencial; Mm = media das massas obtidas pela pesagem de 100 µL do óleo essencial; D = densidade; DR = densidade relativa; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10 e C11 = amostra de óleo essencial comercial de citronela.

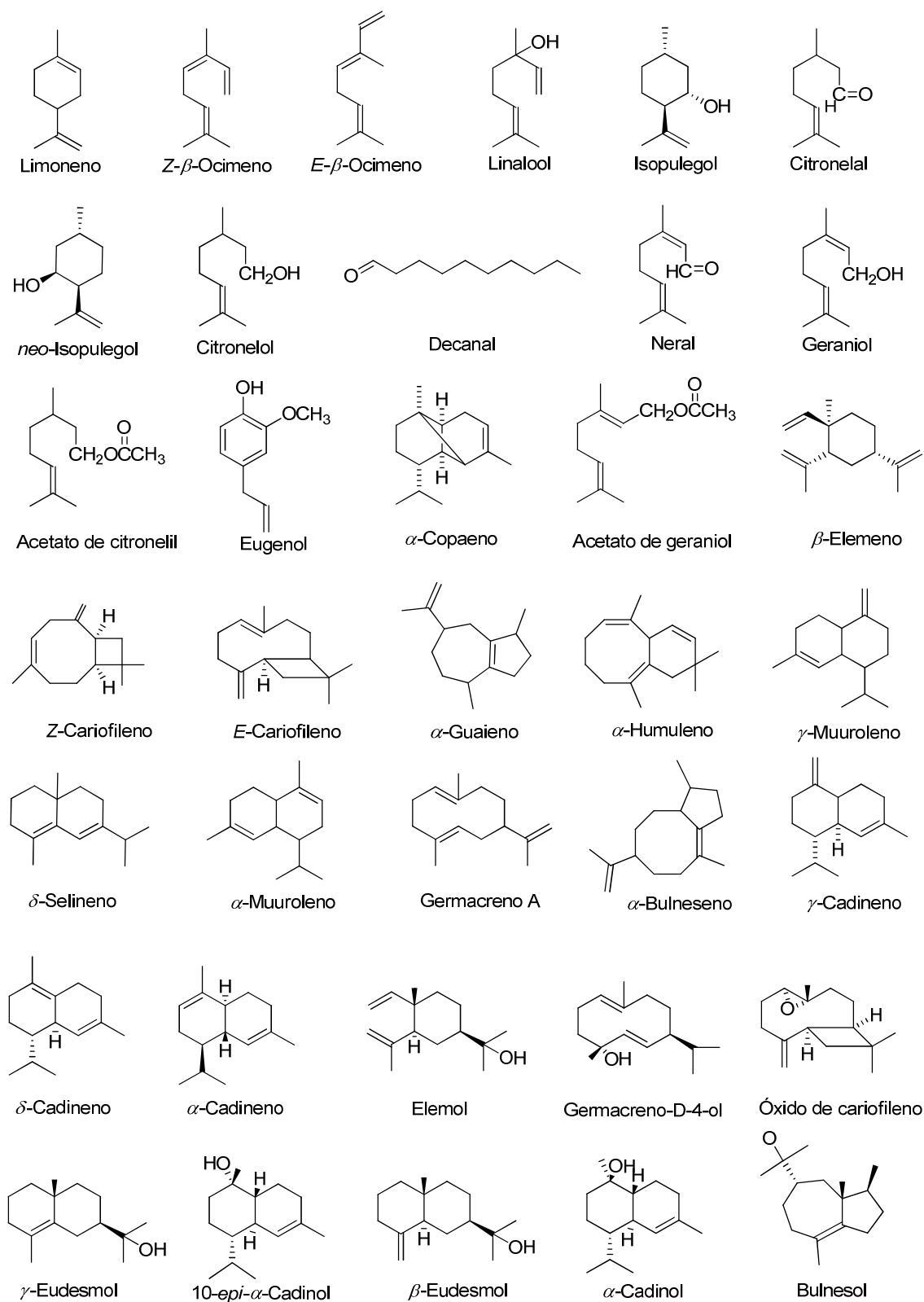


Figura S3.1. Estrutura química dos constituintes dos óleos essenciais comerciais puros de *C. nardus* e de *C. winterianus*.

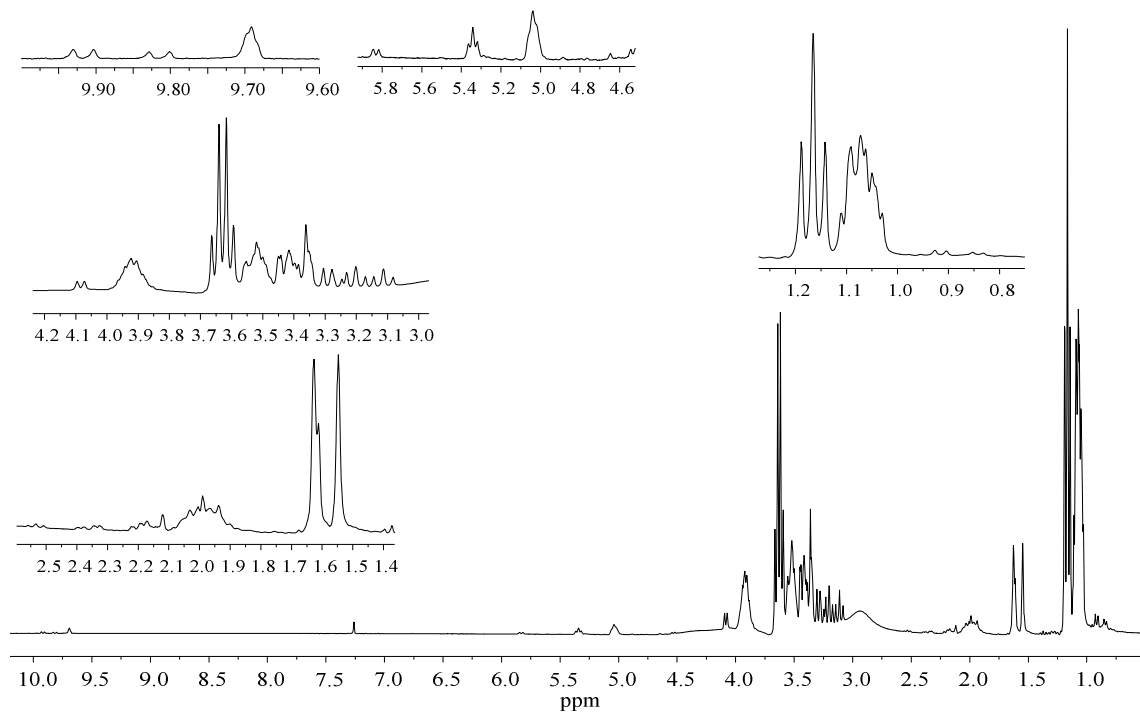


Figura S3.2. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de citronela formulado C9 (300 MHz, em CDCl_3)

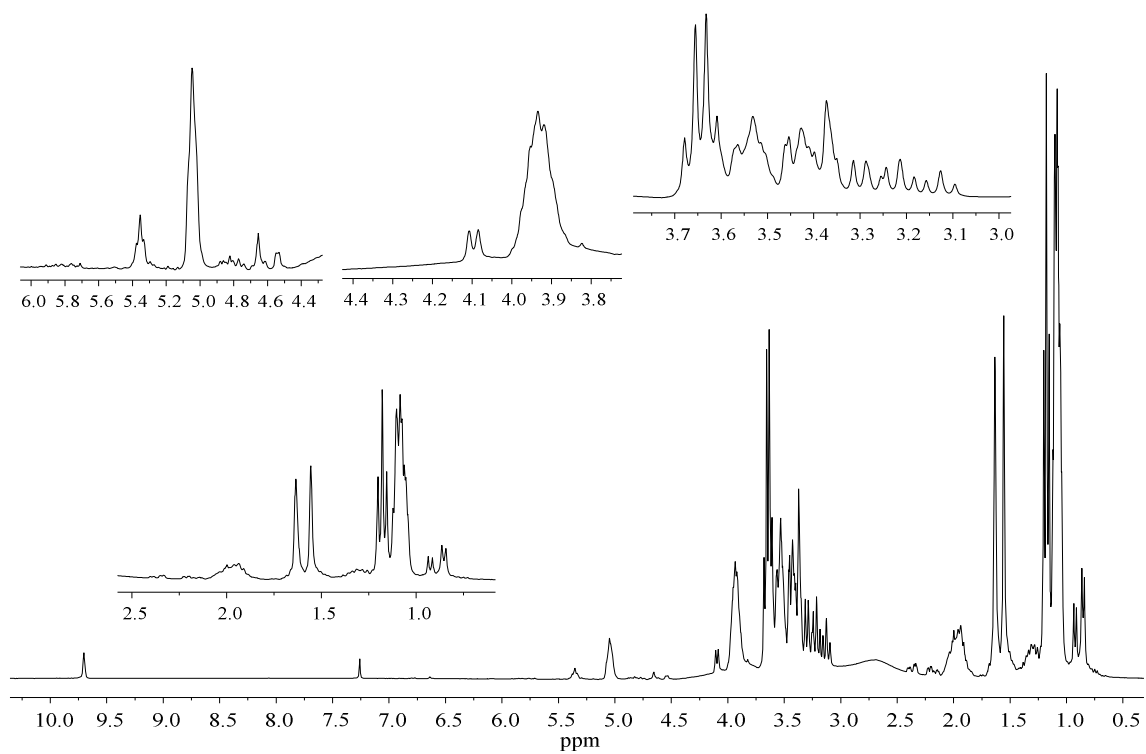


Figura S3.3. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de citronela formulado C10 (300 MHz, em CDCl_3)

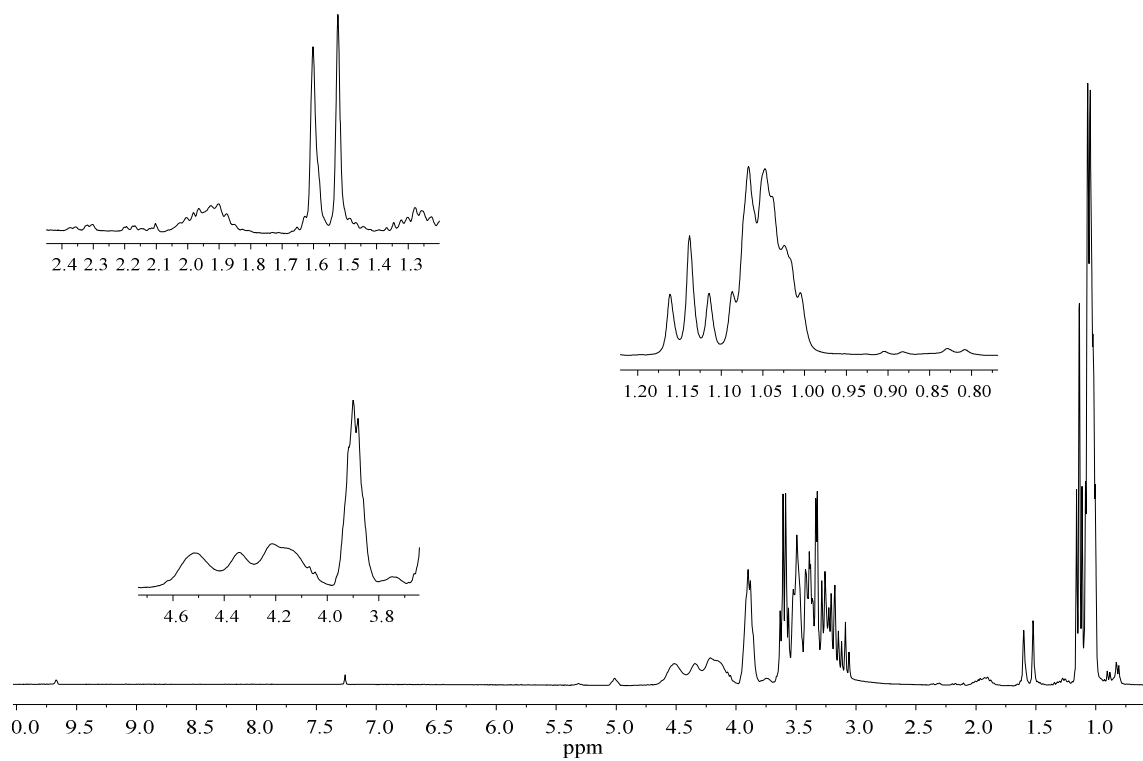


Figura S3.4. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de citronela formulado C11 (300 MHz, em CDCl_3)

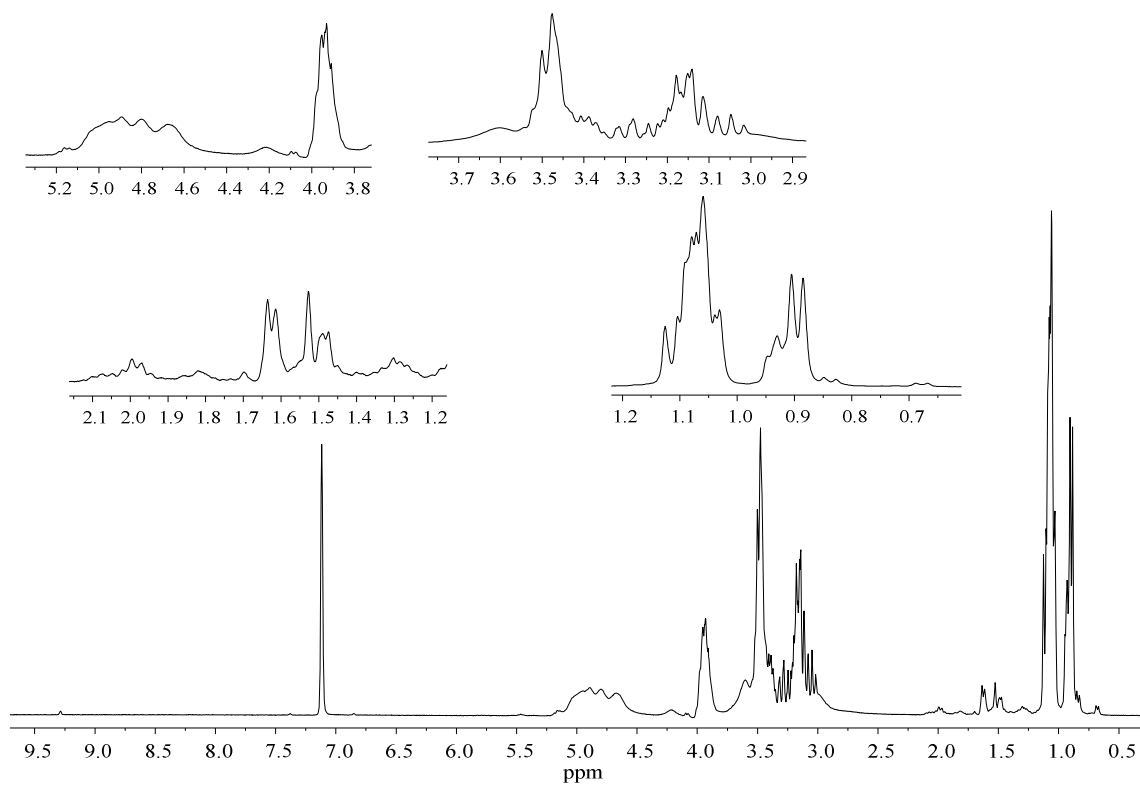


Figura S3.5. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de citronela formulado C11 (300 MHz, em C_6D_6)

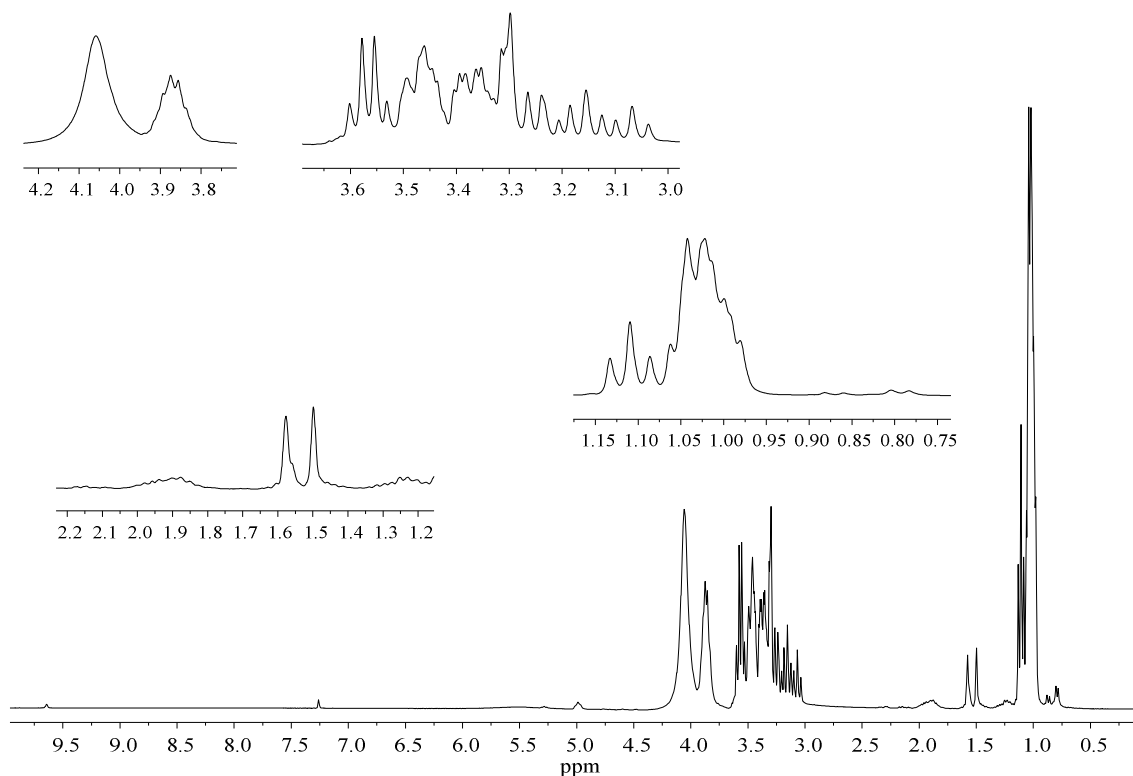


Figura S3.6. Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial de citronela formulado C11 com adição de AlCl_3 (300 MHz, em CDCl_3).

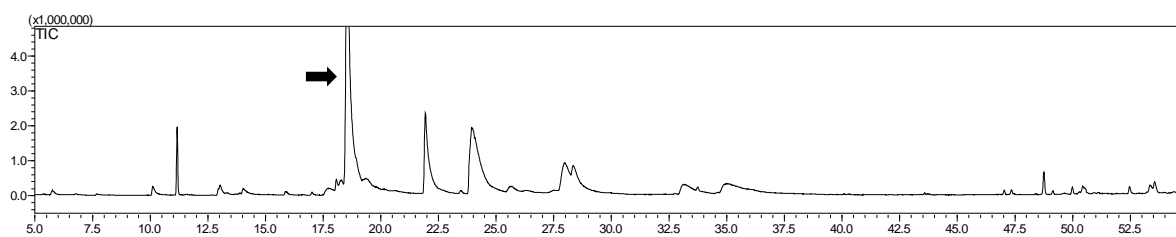


Figura S3.7. Cromatograma dos produtos de degradação de citronelal submetido à temperatura de $55\text{ }^\circ\text{C}$, sob atmosfera de oxigênio durante 48 h. A seta aponta o pico referente ao citronelal remanescente à degradação. Não foi possível identificar nenhum dos compostos formados usando a biblioteca do espectrômetro de massas.

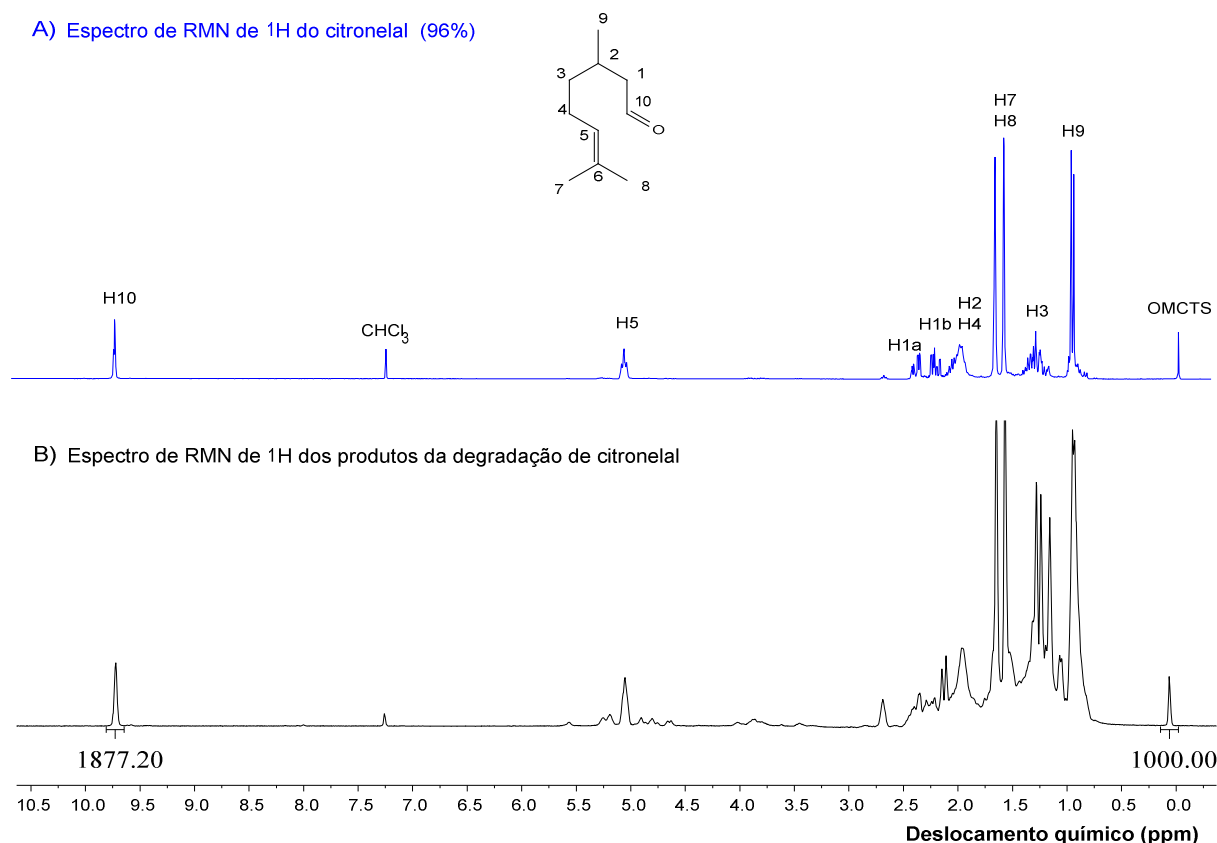


Figura S3.8. Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3). A) Citronelal (96%) adquirido da Sigma Aldrich. B) Produtos da degradação de citronelal submetidos à temperatura de $55\text{ }^\circ\text{C}$, sob atmosfera de oxigênio durante 48 h.

Tabela S3.38. Quantificação do teor de citronelal no produto de degradação deste terpeno usando RMN de ^1H ($\delta = 9,75$).

Amostra	Rep	m (mg)	m_{PI} (mg)	S/R	I_{Cit1} (%)	m_{Cit1} (mg)	Cit1 (%)	M_{Cit} (%)	DP
	1	65,79	1,07	309,08	1881,23	25,12	38,19		
Deg	2	65,79	1,07	334,96	1877,20	25,07	38,10	38,11	0,19
	3	65,79	1,07	304,41	1873,98	25,03	38,04		

Deg = amostra resultante da degradação de citronelal ($55\text{ }^\circ\text{C}$, oxigênio em excesso, 48 h); Rep = repetições; m = massa da amostra resultante da degradação de citronelal; m_{PI} = massa do padrão interno OMCTS; S/R = razão sinal/ruído; I_{Cit1} = Integral do sinal $\delta = 9,75$ referente ao citronelal no espectro de RMN de ^1H da amostra resultante da degradação deste composto; m_{Cit1} = massa de restante citronelal após degradação; Cit1 = percentagem de citronelal restante após degradação; M_{Cit} = média percentagem de citronelal restante após degradação; DP = desvio padrão.

Tabela S3.39. Quantificação do teor de citronelal no produto de degradação deste terpeno utilizando os métodos de RMN de ^1H ($\delta = 9,75$) e de cromatografia gasosa usando normalização de áreas (CG-N).

Amostra	RMN de ^1H (%)	CG-N (%)
Deg	$38,11 \pm 0,19$	$38,22 \pm 0,47$

Deg = amostra resultante da degradação de citronelal (55 °C, oxigênio em excesso, 48 h); RMN de ^1H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio; CG- = cromatografia gasosa usando normalização de áreas.