



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química - INQUI
Química Tecnológica - Bacharelado



CLAUDIO FERREIRA MENDES JUNIOR

**PERFIL ESPECTRAL DE AZEITES DE OLIVA: ANÁLISE REGIOESPECÍFICA POR
RMN DE ^{13}C**

CAMPO GRANDE – MS

2025

CLAUDIO FERREIRA MENDES JUNIOR

**PERFIL ESPECTRAL DE AZEITES DE OLIVA: ANÁLISE REGIOESPECÍFICA POR
RMN DE ^{13}C**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências do curso de graduação em Bacharelado em Química Tecnológica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glaucia Braz Alcantara

CAMPO GRANDE – MS

2025

CLAUDIO FERREIRA MENDES JUNIOR

**PERFIL ESPECTRAL DE AZEITES DE OLIVA: ANÁLISE REGIOESPECÍFICA POR
RMN DE ^{13}C**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências do curso de graduação em Bacharelado em Química Tecnológica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glaucia Braz Alcantara

Campo Grande, 10 de novembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr^a. Glaucia Braz Alcantara (orientadora)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Diego Galvan
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Adilson Beatriz
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

AGRADECIMENTOS

À professora Glaucia, por sua orientação, ensinamentos sempre transmitidos com entusiasmo, paciência e dedicação.

À Luciana, pela coorientação, por sempre compartilhar alegria, entusiasmo e conhecimento.

Aos meus pais, pelo apoio e suporte diários, por estarem sempre ao meu lado ao longo destes anos, e por todo amor incondicional.

À minha companheira Beatriz, pelo apoio constante, pelas nossas conversas, risadas e pelos seus valiosos conselhos.

Aos colegas de laboratório, pela ótima convivência e ajuda sempre que necessário.

Aos professores Dr. Diego Galvan e Adilson Beatriz pela participação na banca examinadora.

Aos professores do Instituto de Química (INQUI), por todos os ensinamentos transmitidos.

RESUMO

A adulteração do azeite de oliva, caracterizada muitas vezes por adição de óleos de menor valor agregado, exige métodos de detecção precisos. Este estudo propõe a aplicação da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C , combinada com análises quimiométricas, para investigar azeites produzidos e/ou comercializados nacionalmente. A RMN de ^{13}C foi utilizada para analisar a região das carbonilas, permitindo a identificação de adulterações. O método foi testado em diferentes tipos de amostras: Premium, apreendidas e comerciais. Vários azeites apreendidos apresentaram perfis espectrais únicos e proporções distintas das carbonilas, ao contrário das amostras comerciais e Premium, que se mostraram semelhantes entre si, além de algumas amostras apreendidas também mostrarem-se similares às amostras comerciais e Premium. O estudo gráfico das deconvoluções da região das carbonilas nos espectros de RMN de ^{13}C mostrou uma proporção três vezes maior de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) na posição sn-1,3 e sn-2 das amostras apreendidas, em comparação às amostras premium e comerciais. Análogo a isso houve uma diminuição de ácidos graxos insaturados (UFA), os quais são predominantes em azeites de oliva. A Análise de Componentes Principais (PCA) de espectro total de RMN ^{13}C obteve a separação das amostras apreendidas em relação às amostras premium e comerciais. Os sinais de RMN de ^{13}C revelou que os carbonos bisalílicos, metilênicos, metílicos e olefínicos são os principais indicadores de comportamentos anômalos ao perfil espectral dos azeites. Já a PCA da análise regioespecífica demonstrou resultados análogos, onde houve a separação de amostras apreendidas das demais, tendo os sinais de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) em sn-1,3 e sn-2 como responsáveis por essa separação. Variações nesses sinais espectrais sugerem a substituição do azeite por óleos de menor valor. Conclui-se que a RMN de ^{13}C e a quimiometria são ferramentas eficazes para correlacionar o perfil de ácidos graxos e, consequentemente, detectar adulterações no azeite.

Palavras-chave: RMN de ^{13}C . Análise Regioespecífica. Azeite de oliva. Adulteração. Óleos de valor agregado.

ABSTRACT

The adulteration of olive oil, often characterized by the addition of oils with lower aggregated value, demands precise detection methods. This study proposes the application of ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR), combined with chemometric analyses, to investigate olive oils produced and/or marketed nationally. ^{13}C NMR was used to analyze the carbonyl region, allowing for the identification of adulterations. The method was tested on different types of samples: Premium, seized, and commercial. Several seized olive oils presented unique spectral profiles and distinct carbonyl proportions, unlike the commercial and Premium samples, which proved similar to each other, although some seized samples were also similar to the commercial and Premium samples. The graphical study of the deconvolutions of the carbonyl region in the ^{13}C NMR spectra showed a three times higher proportion of polyunsaturated fatty acids (PUFA) at the sn-1,3 and sn-2 positions in the seized samples compared to the Premium and commercial samples. Analogously, there was a decrease in unsaturated fatty acids (UFA), which are predominant in olive oils. The Principal Component Analysis (PCA) of the total ^{13}C NMR spectrum achieved separation of the seized samples from the Premium and commercial samples. The ^{13}C NMR signals revealed that the bis-allylic, methylenic, methyl, and olefinic carbons are the main indicators of anomalous behaviors in the spectral profile of olive oils. The PCA of the regiospecific analysis demonstrated analogous results, where the seized samples were separated from the others, with the signals of polyunsaturated fatty acids (PUFA) at sn-1,3 and sn-2 being responsible for this separation. Variations in these spectral signals suggest the substitution of olive oil with lower-value oils. It is concluded that ^{13}C NMR and chemometrics are effective tools for correlating the fatty acid profile and, consequently, detecting adulterations in olive oil.

Keywords: ^{13}C NMR. Regiospecific. Analysis. Olive oil. Adulteration. High value-added oils.

Lista de figuras

- Figura 1:** Estrutura representativa de um triacilglicerídeo (TAG) em azeite de oliva, destacando as posições sn-1,3 (verde) e sn-2 (amarelo).....13
- Figura 2:** Os estados de spin de um hidrogênio na ausência e na presença de um campo magnético aplicado.....14
- Figura 3:** Os estados de spin de um hidrogênio na ausência e na presença de um campo magnético aplicado.....15
- Figura 4:** Espectros de RMN de ^{13}C de amostras de azeite de oliva premium. Triacilglicerídeo esterificado com ácidos oleico, linoleico e linolênico e atribuição molecular para comparação com dados de RMN.....23
- Figura 5:** Atribuição de grupos acil do espectro de RMN de ^{13}C , nas posições sn-1,3 e sn2. Legenda: SFA, ácido graxo saturado; UFA, ácido graxo insaturados; e PUFA, ácido graxos poliinsaturados.....24
- Figura 6.** Ampliação da região de 172,3 a 173,6 ppm dos espectros de RMN de ^{13}C de azeites ilustrativos correspondentes a amostra comercial (A), amostra apreendida pela PF ou MAPA (B), e amostra com selo Premium 2023/ 2024 (C). Legenda: UFA: ácidos graxos insaturados; SFA: ácidos graxos saturados; PUFA: ácidos graxos poliinsaturados.....27
- Figura 7** Gráfico de escores de PCA obtido a partir dos espectros completos de RMN de ^{13}C das amostras de azeite.....28
- Figura 8.** Gráfico de *loadings* de PCA com assinalamentos obtidos a partir dos espectros completos de RMN de ^{13}C para das amostras de azeite.....28
- Figura 9.** Gráfico de escores de PCA obtido a partir da análise regioespecífica de RMN de ^{13}C das amostras de azeite.....30
- Figura 10.** Gráfico de *loadings* de PCA com assinalamentos obtido a partir da análise regioespecífica de RMN de ^{13}C das amostras de azeite. Legenda: UFA: ácidos graxos insaturados; SFA: ácidos graxos saturados; PUFA: ácidos graxos poliinsaturados.....30

Lista de tabelas

Tabela 1. Dados das amostras utilizadas na pesquisa e seus respectivos códigos. Amostras <i>Premium</i> 2023/2024.....	16
Tabela 2. Dados das amostras utilizadas na pesquisa e seus respectivos códigos. Amostras apreendidas.....	19
Tabela 3. Dados das amostras utilizadas na pesquisa e seus respectivos códigos. Amostras comerciais.....	21

Lista de gráficos

Gráfico 1. Dados obtidos das proporções relativas de ácidos graxos nas regiões observadas entre 172,7 ppm a 173,4 ppm das amostras **Premium** 2023/2024 via deconvolução dos sinais das carbonilas nos espectros de RMN de ^{13}C25

Gráfico 2. Dados obtidos das proporções relativas de ácidos graxos nas regiões observadas entre 172,7 ppm a 173,4 ppm das amostras **comerciais** via deconvolução dos sinais das carbonilas nos espectros de RMN de ^{13}C25

Gráfico 3. Dados obtidos das proporções relativas de ácidos graxos nas regiões observadas entre 172,7 ppm a 173,4 ppm das amostras **apreendidas** pela PF e MAPA via deconvolução dos sinais das carbonilas nos espectros de RMN de ^{13}C26

Lista de abreviaturas e siglas

SFA – Ácidos Graxos Saturados (Saturated Fatty Acids, do inglês)

UFA – Ácidos Graxos Insaturados (Unsaturated Fatty Acids, do inglês)

PUFA – Ácidos Graxos Poliinsaturados (Polyunsaturated Fatty Acids, do inglês)

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

sn – Número Estereoespecífico (Stereospecific Number, do inglês)

MAPA - Ministério da Agricultura e Pecuária

PF – Polícia Federal

TAG – Triacilglicerídeo

PCA - Análise de Componentes Principais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Adulteração de azeites: uma ameaça à saúde pública.....	12
1.2 Distribuição Posicional de Ácidos Graxos no TAG.....	13
1.3 Uso da técnica espectroscópica por RMN de ^{13}C para fins investigativos para matrizes oleosas.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Reagentes e matérias.....	16
3.2 Preparo das amostras.....	21
3.3 Espectroscopia de RMN de ^{13}C	22
3.4 Análise quimiométrica e estatística.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Perfil espectral de ácidos graxos dos azeites de oliva.....	23
4.2 Análise regioespecífica das amostras estudadas.....	24
4.3 Análise multivariada de ^{13}C de azeite de oliva.....	27
4.4 Análise multivariada a partir da análise regioespecífica de ^{13}C de azeite de oliva.....	29
CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

1.1 Adulteração de azeites: uma ameaça à saúde pública.

Desde os tempos antigos, o azeite de oliva tem sido considerado um óleo nobre, ocupando um lugar de destaque em relação aos demais óleos comestíveis. Embora receba diversas classificações dependendo da origem, da variedade do fruto e do grau de prensagem, o azeite de oliva apresenta maior valor no seu estado bruto, devido às suas características naturais de cor, sabor e aroma [1]. Considerado uma cultura milenar, seu uso está associado a práticas religiosas, mitos, manifestações artísticas e tradições. Acredita-se que a origem da oliveira se confunda com o início das civilizações que nasceram em torno do mar Mediterrâneo [2].

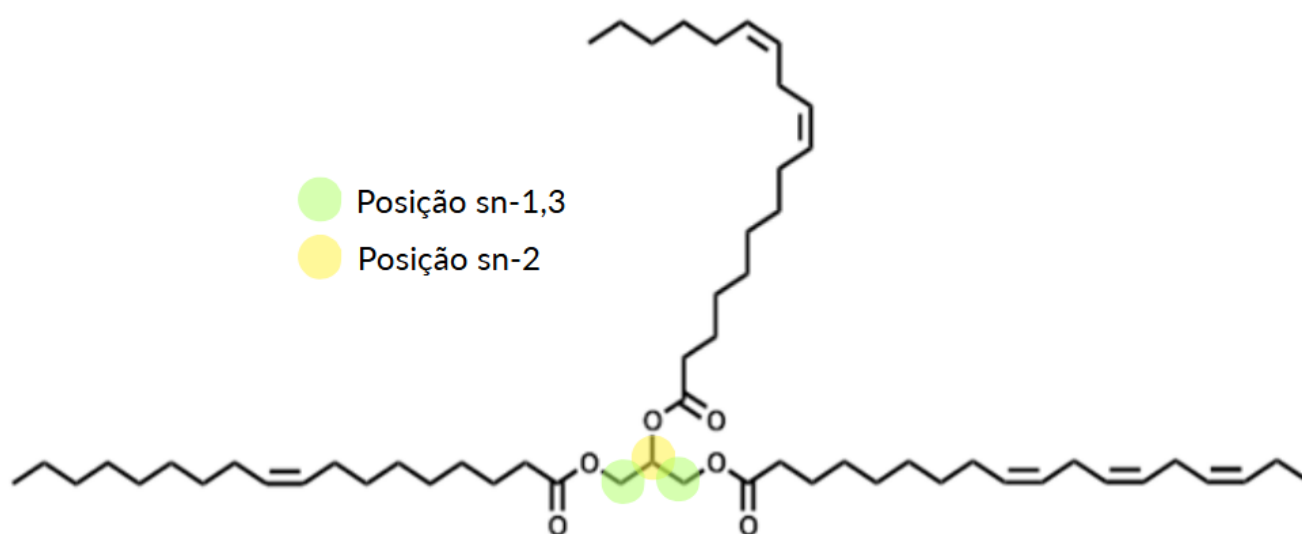
Recentemente, o aumento de casos de imitação e adulteração de alimentos tem sido notado, impulsionado por fatores como avanços tecnológicos, concorrência desleal e desafios econômicos. Grande parte dessas fraudes alimentares visa maximizar lucros através da mistura de produtos de menor valor com itens mais caros. Notavelmente, o azeite de oliva tem sido o alimento mais frequentemente envolvido em fraudes [3]. O azeite de oliva extra virgem e o azeite de oliva virgem são as duas classes de azeite de oliva com a classificação mais alta devido aos seus ricos perfis de sabor e aos diversos benefícios à saúde. No entanto, o alto custo desses azeites virgens e as dificuldades na identificação de fraudes levaram a um aumento nos casos de adulteração de até 87,5% nos últimos dez anos [4]. A adulteração do azeite de oliva, que geralmente ocorre pela mistura com azeite do tipo lampante ou outros óleos comestíveis mais baratos, como os de milho, amendoim e girassol, representa sérias ameaças e desafios tanto para os fornecedores quanto para a saúde dos consumidores finais, como perda de benefícios nutricionais e riscos de alergia não declarada [5].

A determinação da autenticidade do azeite de oliva frequentemente emprega cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC) [6]. Contudo, essas técnicas analíticas são laboriosas, exigindo frequentemente múltiplas etapas de preparação da amostra e um extenso período de análise. Em contraste, a espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) desponta como uma ferramenta analítica poderosa, amplamente utilizada na identificação molecular de substâncias em amostras complexas, como alimentos e produtos naturais [4].

1.2 Distribuição Posicional de Ácidos Graxos no TAG.

Um triacilglicerídeo consiste em um esqueleto de glicerol com três posições para os ácidos graxos se ligarem, as posições externas são chamadas de sn-1 e sn-3 (sn-1,3), e a posição central é chamada de sn-2 (Figura 1) [15].

Figura 1: Estrutura representativa de um triacilglicerídeo (TAG) em azeite de oliva, destacando as posições sn-1,3 (verde) e sn-2 (amarelo).



Fonte: Próprio autor.

Software: ChemDraw Professional 15.0

Diferentes combinações de ácidos graxos resultam em distintas espécies moleculares de TAG. Portanto, cada óleo possui uma composição única de espécies moleculares de TAG devido a essas misturas complexas. É crucial notar que tanto a composição quanto a distribuição posicional dos ácidos graxos, especialmente os PUFA's ômega-3, exercem uma forte influência na digestão e absorção no corpo humano, além de afetarem sua estabilidade oxidativa [17]. No entanto, a estrutura e a composição dos TAGs em óleos naturais são complexas. Estudos descreveram a caracterização de diferentes óleos utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) para análise de TAGs [17].

Em trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa, a análise regioespecífica de triacilgliceróis (TAG) por RMN de ^{13}C foi crucial para a precisão nutricional e autenticidade alimentar. Em fórmulas infantis, [13] mostrou que a concentração de ácidos graxos saturados nas posições sn-1,3 (em vez de sn-2 como no leite humano) causa má absorção e

constipação. Similarmente, [12] usou a técnica para detectar adulterações sofisticadas em óleos vegetais de alto valor, identificando adições que alteravam a distribuição posicional sn-2 vs sn-1,3 mesmo mantendo o perfil global de ácidos graxos. Essa abordagem é crucial para a distinção entre azeite de oliva puro e misturas. Ela demonstra que, embora a adulteração ou formulação artificial possa replicar a composição química global, ela falha em reproduzir a arquitetura posicional exata do lipídio original.

1.3 Uso da técnica espectroscópica por RMN de ^{13}C para fins investigativos de matrizes oleosas.

Muitos núcleos atômicos tem uma propriedade chamada spin: os núcleos comportam-se como se estivessem girando. Na verdade, qualquer núcleo atômico que tenha massa ímpar ou número atômico ímpar, ou ambos, tem um momento angular de spin e um momento magnético [7]. O número quântico de spin pode ter valores maiores ou iguais a zero e que são múltiplos de $\frac{1}{2}$. Aqueles com $I = 0$ não possuem spin nuclear e, portanto, não podem exibir fenômeno de ressonância magnética nuclear (RMN), como ^{12}C e ^{16}O [8].

O fenômeno da RMN ocorre quando núcleos alinhados com um campo B_0 aplicado são induzidos a absorver energia e a mudarem sua orientação de spin em relação ao campo aplicado. Na prática, essa diferença de energia é uma função da intensidade do campo magnético aplicado B_0 como é visto na Figura 2 [7].

Figura 2: Os estados de spin de um hidrogênio na ausência e na presença de um campo magnético aplicado.

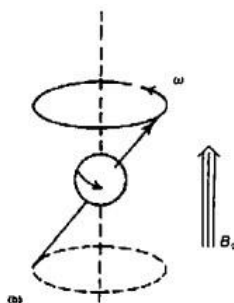


Fonte: PAVIA, 2010.

Segundo Claridge (2016), um campo magnético estático aplicado ao núcleo faz com que ele comece a precessar a uma taxa dependente da força do campo e da razão magnetogírica do spin. O campo é convencionalmente aplicado ao longo do eixo z de uma estrutura de coordenadas cartesianas e o movimento do núcleo é representado como um vetor

movendo-se na superfície de um cone que é conhecido como frequência de Larmor, que pode ser vista na Figura 3.

Figura 3: A precessão de um núcleo girando, resultado da influência de um campo magnético aplicado (frequência de Larmor).



Fonte: Paiva, 2010.

A energia absorvida pelos spins nucleares induz uma voltagem que pode ser detectada por uma bobina adequadamente sintonizada, amplificada e o sinal exibido como um decaimento de indução livre (FID). Processos de relaxação eventualmente retornam o sistema de spin ao equilíbrio térmico, que ocorre na ausência de quaisquer outros pulsos de RF [9].

A RMN tem desempenhado um papel importante de apoio à indústria alimentícia em sua crescente necessidade de entender e ser inovadora em produtos e processos, estabelecendo-se como um novo método para fazer cumprir a legislação. Um exemplo bem conhecido é a autenticação de azeite usando espectroscopia de RMN de ^{13}C [10].

A espectroscopia de RMN surge como uma alternativa promissora para a determinação da autenticidade do azeite de oliva. Ao contrário das técnicas de cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC), que são laboriosas e exigem múltiplas etapas de preparação de amostras e longos períodos de análise, a RMN é uma ferramenta analítica poderosa. Sua eficácia já é comprovada na identificação molecular de substâncias em matrizes complexas, como alimentos e produtos naturais [6], [10], [11].

As análises por RMN de ^{13}C também se mostraram úteis na comparação da distribuição regioespecífica dos ácidos graxos nos triacilglicerídeos [10], [12], [13], cujos resultados evidenciaram a preferência dos ácidos graxos saturados na posição sn-2 e insaturados e poliinsaturados na posição sn-1,3 em óleos vegetais. Nesse sentido, em casos de adição não declarada de outros óleos nos azeites, além da questão legal, a fraude pode trazer

consequências diretas à saúde e bem-estar do consumidor, que deve ter, no mínimo, o direito de escolher o que se está consumindo.

Desta forma, considerando-se o recente estudo desenvolvido pelo nosso grupo [13] e trabalhos disponíveis na literatura [10], bem como considerando o potencial das análises regioespecífica por RMN de ^{13}C na detecção de adulterações em óleos vegetais de alto valor agregado, especialmente naquelas situações não identificadas por outras técnicas, este projeto propôs a utilização da RMN de ^{13}C em conjunto com a quimiometria. Esta última ferramenta permite o tratamento de dados resultantes de análises multivariadas, por meio de ferramentas matemáticas, estatísticas e computacionais. O objetivo foi investigar azeites de oliva por meio destas técnicas, analisando a distribuição regioespecífica de ácidos graxos nos triacilglicerídeos.

2. OBJETIVO

Utilizar as análises de distribuição regioespecífica de ácidos graxos nos triacilglicerídeos por meio da técnica de RMN de ^{13}C para investigar azeites de oliva, a fim utilizar o perfil espectral para futuras avaliações de adulteração desta matéria-prima.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e materiais

As 195 amostras utilizadas neste estudo (Tabela 1), foram adquiridas em comércio local ou cedidas por meio de parceria com o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) e a Polícia Federal (PF).

Com isso, os conjuntos amostrais contêm: **tabela 1**, azeites selo Premium 2023/2024 (puras, selo de qualidade, MAPA); **tabela 2**, amostras cedidas pela Polícia federal e MAPA apreendidas/suspeitas de adulteração com óleos de menores valores e **tabela 3**, amostras comerciais (adquiridas em comércios locais)

Tabela 1. Dados das amostras utilizadas na pesquisa e seus respectivos códigos. Amostras *Premium* 2023/2024.

CÓDIGO DA AMOSTRA	CÓDIGO LP2	CÓDIGO RMN
E0Q	1	AZ-E0Q
Y0S	2	AZ-Y0S
L5H	3	AZ-L5H

O0V	4	AZ-O0V
V3C	5	AZ-V3C
Z1N	6	AZ-Z1N
N5Y	7	AZ-N5Y
W6Q	8	AZ-W6Q
T8G	9	AZ-T8G
F6A	10	AZ-F6A
K8W	11	AZ-K8W
D9M	12	AZ-D9M
G4S	13	AZ-G4S
M4X	14	AZ-M4X
S3B	15	AZ-S3B
J9Y	16	AZ-J9Y
H3Q	17	AZ-H3Q
Z7P	18	AZ-Z7P
B8Y	19	AZ-B8Y
Z6R	20	AZ-Z6R
J4H	21	AZ-J4H
L4I	22	AZ-L4I
T3B	23	AZ-T3B
Y5N	24	AZ-Y5N
02Z	25	AZ-02Z
S4A	26	AZ-S4A
D8W	27	AZ-D8W
O7X	28	AZ-O7X
Z2E	29	AZ-Z2E
Q6O	30	AZ-Q6O
F2I	31	AZ-F2I
Z2Z	32	AZ-Z2Z
L5Z	33	AZ-L5Z
R3Z	34	AZ-R3Z
P0W	35	AZ-P0W
J9U	36	AZ-J9U
Q0E	37	AZ-Q0E
V4P	38	AZ-V4P
G1H	39	AZ-G1H
O2S	40	AZ-O2S
R2B	41	AZ-R2B
X8L	42	AZ-X8L
O4T	43	AZ-O4T
V4P	44	AZ-V4P
M7C	45	AZ-M7E
H4C	46	AZ-H4C
W1E	47	AZ-W1E
K6E	48	AZ-K6E

V3C	49	AZ-M7E
J7D	50	AZ-J7D
K1Y	51	AZ-K1Y
O3D	52	AZ-O3D
D3K	53	AZ-D3K
Y4N	54	AZ-Y4N
M3P	55	AZ-M3P
Q3Q	56	AZ-Q3Q
J4J	57	AZ-J4J
A1F	58	AZ-A1F
H5D	59	AZ-H5D
C4S	60	AZ-C4S
Y3A	61	AZ-Y3A
D1P	62	AZ-D1P
S0Q	63	AZ-S0Q
H6S	64	AZ-H6S
C0G	65	AZ-C0G
U4S	66	AZ-U4S
H8Y	67	AZ-H8Y
Z9K	68	AZ-Z9K
L1A	69	AZ-L1A
Y5W	70	AZ-Y5W
U6U	71	AZ-U6U
Z5O	72	AZ-Z5O
I5X	73	AZ-I5X
N7E	74	AZ-N7E
S7M	75	AZ-S7M
O3P	76	AZ-O3P
C1W	77	AZ-C1W
F6D	78	AZ-F6D
D2J	79	AZ-D2J
O5M	80	AZ-O5M
A8D	81	AZ-A8D
LABV-30894/24-F6A	83	AZ-F6A-24-2
LABV-30895/24-H5D	85	AZ-H5D-24-2
LABV-30903/24-A8D	86	AZ-A8D/24
LABV-30905/24-Y5W	88	AZ-Y5W-24
LABV-30904/24-N5Y	90	AZ-N5Y/24
LABV-30900/24-M7E	91	AZ-M7E-24
LABV-30910/24-C4S	92	AZ-C4S/24
LABV-30906/24-G1H	93	AZ-G1H-24
LABV-30896/24-V4P	94	AZ-V4P-24
LABV-30907/24-S7M	95	AZ-S7M-24
LABV-30892/24-L5Z	96	AZ-L5Z-24
LABV-30897/24-Y4N	97	AZ-Y4N-24

LABV-30899/24-P4R	98	AZ-P4R-24
LABV-30909/24-A1F	99	AZ-A1F-24
LABV-30891/24-U6U	116	AZ-U6U-24
30901/24-M3P	117	AZ-M3P-24
LABV-30898/24-H4C	120	AZ-H4C/24
LABV-30902/24-Z1N	124	AZ-30902

Tabela 2. Dados das amostras utilizadas na pesquisa e seus respectivos códigos. Amostras apreendidas.

CÓDIGO DA AMOSTRA	CÓDIGO LP2	CÓDIGO RMN
LABV-31548/24-RS	84	AZ-31548
LABV-23401/24-RS	87	AZ-23401
07294/25	89	AZ-07294-25
LABV-23395/24-RS	100	AZ-08MAIO-25
30908/24	101	AZ-30908
30893/24	102	AZ-30893
IQA-05723/25	103	AZ-05723
LABV-23404/24-RS	104	AZ-23404
LABV-23396/24-RS	105	AZ-23396
IQA-05719/25	106	AZ-05719
IQA-05725/25	107	AZ-05725
IQA-05717/25-A	108	AZ-05717-25-A
IQA-05716/25	109	AZ-05716-25
IQA-05718/25	110	AZ-05718-25
IQA-05717/25-B	111	AZ-05717-25-B
IQA-05724/25	112	AZ-05724
IQA-05720/25	113	AZ-05720
IQA-05715/25-RS	114	AZ-05715
LABV-23397/24-RS	115	AZ-23397
LABV-23400/24-RS	118	AZ-23400
IQA-05722/25	119	AZ-05722
LABV-23399/24-RS	121	AZ-23399
LABV-23398/24-RS	122	AZ-23398
LABV-23403/24-RS	123	AZ-23403
LABV-23402/24-RS	125	AZ-23402
2102.24 01	126	AZ-PFA1
2102.24 02	127	AZ-PFA2
2022.24 01	128	AZ-PFA3
2022.24 02	129	AZ-PFA4
2022.24 03	130	AZ-PFA5
2022.24 04	131	AZ-PFA6
2022.24 05	132	AZ-PFA7
2022.24 06	133	AZ-PFA8

2022.24 07	134	AZ-PFA9
2022.24 08	135	AZ-PFA10
2022.24 09	136	AZ-PFB1
2393.24 01	137	AZ-PFB2
2393.24 02	138	AZ-PFB3
2393.24 03	139	AZ-PFB4
2393.24 04	140	AZ-PFB5
2393.24 05	141	AZ-PFB6
2393.24 06	142	AZ-PFB7
2393.24 07	143	AZ-PFB8
2393.24 08	144	AZ-PFB9
2393.24 09	145	AZ-PFB10
2393.24 10	146	AZ-PFC1
2577.24-01	147	AZ-PFC2
2577.24-02	148	AZ-PFC3
2744.24 01	149	AZ-PFC4
2744.24 02	150	AZ-PFC5
2744.24 03	151	AZ-PFC6
2744.24 04	152	AZ-PFC7
2744.24 05	153	AZ-PFC8
2744.24 06	154	AZ-PFC9
2744.24 07	155	AZ-PFC10
2744.24 08	156	AZ-PFD1
2744.24 09	157	AZ-PFD2
2744.24 10	158	AZ-PFD3
2579.24 01	159	AZ-PFD4
2579.24-03	160	AZ-PFD5
2579.24-04	161	AZ-PFD6
1244-24 01	162	AZ-PFD7
1244-24-02	163	AZ-PFD8
0154-25-01	164	AZ-PFD9
0154-25-02	165	AZ-PFD10
0154-25.03	166	AZ-PFE1
0154-25.04	167	AZ-PFE2
681 25-01	168	AZ-PFE3
577-24 01	169	AZ-PFE4
577-24 02	170	AZ-PFE5
577-24 03	171	AZ-PFE6
577-24 04	172	AZ-PFE7
0672-24-01	173	AZ-PFE8
0672.24-02	174	AZ-PFE9
0672.24-03	175	AZ-PFE10

Tabela 3. Dados das amostras utilizadas na pesquisa e seus respectivos códigos. Amostras comerciais.

CÓDIGO DA AMOSTRA	CÓDIGO LP2	CÓDIGO RMN
DETRA 985/24 GILB	176	AZ-PFF1
DIANA APGEF	177	AZ-PFF2
2 AZ AOM 2	178	AZ-PFH1
3 AZ Breno 1 BCS 1	179	AZ-PFH2
5 AZ MLV-2 (Herdade do Esporão)	180	AZ-PFH4
6 AZ MLV3 (La Espanola)	181	AZ-PFH5
7 AZ Nat - 1	182	AZ-PFH6
8 AZ Nat - 2	183	AZ-PFH7
9 AZ André 1A	184	AZ-PFH8
11 C Gabi	185	AZ-PFH10
12 AZ Gabi-2	186	AZ-PFI1
13 AZ Nubia1	187	AZ-PFI2
14 AZ Nubia 2	188	AZ-PFI3
15 AZ Luiza 1	189	AZ-PFI4
17 AZ Luiza 3	190	AZ-PFI6
20 AZ Amay 3 3 Azeite La Espanola	191	AZ-PFI9
21 AZ AOM 3	192	AZ-PFI10
Azeite Borges nº3817	193	AZ-PFJ5
Big 3816 Sallo	194	AZ-PFJ6
BIG 3817 ANDORINHA	195	AZ-PFJ7

3.2 Preparação das amostras

O preparo das amostras foi iniciado com a adição cuidadosa de 650 microlitros (μL) de clorofórmio deuterado (CDCl_3) contendo tetrametilsilano (TMS), com a micropipeta a um tubo tipo Eppendorf limpo. Este volume foi crucial para a diluição adequada e a formação de uma fase homogênea.

Em seguida, adicionou-se 230 microlitros (μL) de azeite puro ao mesmo tubo Eppendorf. Após a adição do azeite, a ponteira foi lavada de 2 a 3 vezes com o CDCl_3 já presente no Eppendorf, aspirando e dispensando o líquido. Esta etapa foi fundamental para garantir a completa homogeneização da mistura, assegurando que todo o azeite fosse transferido para a solução e que a ponteira esteja limpa, prevenindo erro na concentração final.

Por fim, 880 microlitros (μL) da solução preparada (já contendo CDCl_3 e azeite homogeneizados) foram transferidos para um tubo de RMN de 5 mm. A atenção a cada um desses passos foi essencial para a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis.

3.3 Espectroscopia de RMN de ^{13}C

Os espectros de RMN de ^{13}C foram adquiridos em espectrômetro *Bruker AVANCE NEO 500* (11,75 T), operando a uma frequência de ressonância de 125 MHz para a frequência de ^{13}C , equipado com uma sonda multinuclear de 5 mm *Smartprobe*[®], disponível no Instituto de Química (INQUI) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). O *software Bruker TopSpin* (versão 4.1.4) foi utilizado para a aquisição e a versão 4.4.0 para o processamento de espectros.

A sequência de pulso inversão-recuperação (180- τ -90) foi utilizada para definição de tempos de relaxação (T_1) para a região das carbonilas, foco do estudo. Após a avaliação dos parâmetros, a sequência de pulso zgpg30 foi ajustada com tempos de aquisição (AQ) de 2.097 s e de espera para aquisição (d_1) de 2,8 s, respectivamente. Utilizou-se 2048 varreduras (ns) e número total de pontos digitalizados (TD) de 131 k, totalizando um tempo de experimento de 2h 49min 42sec.

O processamento dos espectros foi realizado utilizando função de apodização com *line-broadening* (lb) igual a 0,1 Hz e com número de pontos digitalizados (SI) igual a 131 k, seguido de correção manual de fase e linha de base. O assinalamento da região da carbonila nos espectros de RMN de ^{13}C foi realizado de acordo com dados da literatura [10]; [13]; [14]; [16]. Após o assinalamento realizou-se a deconvolução usando uma mistura de funções *Lorentzian/Gaussian* e integração dos sinais das carbonilas nos espectros de RMN de ^{13}C para o cálculo das proporções de ácidos graxos nas regiões observadas.

3.4 Análise quimiométrica e estatística

A análise dos dados de RMN de ^{13}C foi realizada utilizando algoritmos não supervisionados, especificamente a Análise de Componentes Principais (PCA). Para isso, foram empregados os *softwares NMRProcFlow* (INRA UMR 1332 BFP, Bordeaux Metabolomics Facility) e *MetaboAnalyst 5.0*.

A PCA dos dados de RMN de ^{13}C baseou-se nos espectros completos dos azeites de oliva. Inicialmente, os *buckets* foram construídos e suas tabelas exportadas para o Excel, sendo posteriormente salvas nos formatos .csv e .txt.

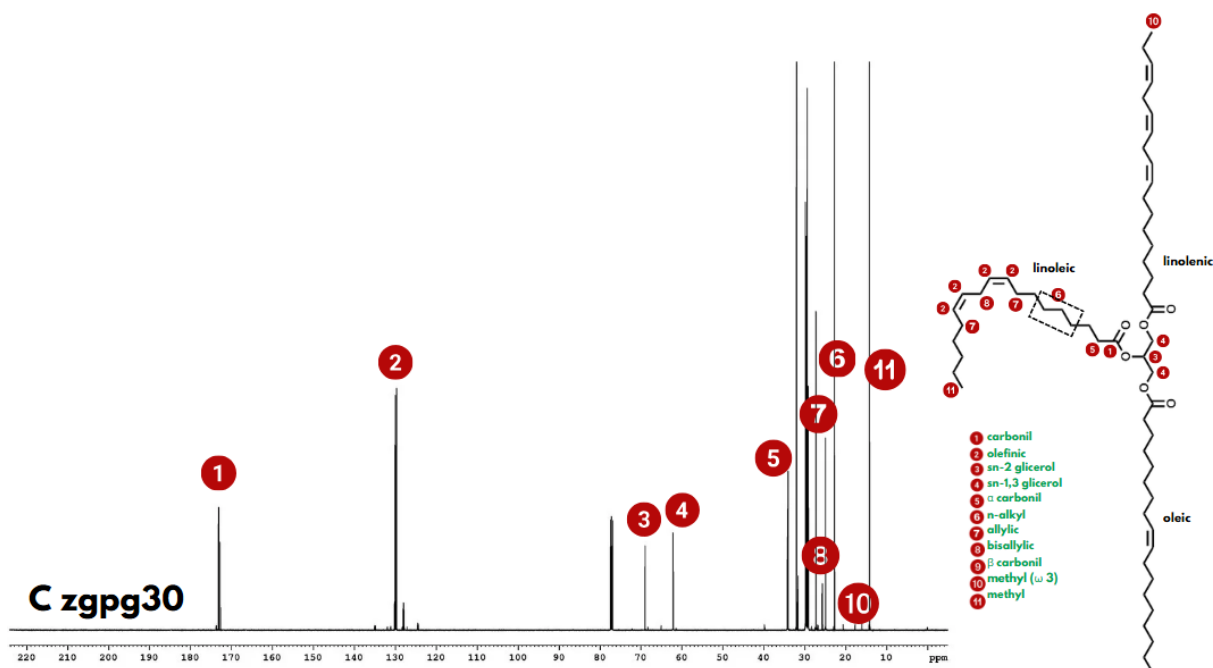
As matrizes de dados resultantes foram então submetidas ao *MetaboAnalyst* 5.0 para a análise quimiométrica. As amostras foram normalizadas pela soma total e as variáveis foram pré-processadas utilizando-se Pareto.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil espectral de ácidos graxos dos azeites de oliva

A aquisição do espectro completo de RMN de ^{13}C foi realizada utilizando a sequência de pulsos zgpg30. A análise permitiu a atribuição molecular dos sinais, e observar triacilglicerídeo esterificado com ácidos oleico, linoleico e linolênico, conforme ilustrado na Figura 4. Com o auxílio da literatura [18], foi possível determinar o assinalamento dos principais metabólitos, destacando-se os sinais característicos das carbonilas (1), olefínicos (2), alílicos (7), bis-alílicos (8), e dos grupos metílicos e metilênicos (10, 11).

Figura 4. Espectros de RMN de ^{13}C de amostras de azeite de oliva premium. Triacilglicerídeo esterificado com ácidos oleico, linoleico e linolênico e atribuição molecular para comparação com dados de RMN.



Fonte: Próprio autor.

Software: ChemDraw Professional 15.0

Os sinais das carbonilas foram atribuídos de acordo com os deslocamentos químicos dos TAGs. O grupo de sinais em 173,4 ppm pertence aos grupos acil nas posições sn-1,3, enquanto o grupo em 172,7 ppm pertence à posição sn-2 [16]. Essa diferença de

deslocamento químico para ácidos graxos em sn-1,3 e sn-2 está diretamente ligada à diferença de blindagem, sendo sn-1,3 menos blindados do que sn-2 devido às contribuições do efeito de blindagem γ -gauche. Na Figura 6 pode-se visualizar as regiões das carbonilas nos espectros de RMN de ^{13}C para as posições sn-1,3 e sn-2.

Com a ajuda da literatura [10], [16], [13] foi possível realizar o assinalamento dos ácidos graxos saturados (SFA), ácidos graxos insaturados (UFA) e ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) nas posições sn-1,3 e sn-2 das amostras estudadas. Na Figura 5 é possível observar a comparação de grupos acil dos espectros de RMN de ^{13}C com os assinalamentos ácidos graxos saturados (SFA), ácidos graxos insaturados (UFA) e ácidos graxos poliinsaturados (PUFA).

Figura 5. Atribuição de grupos acil do espectro de RMN de ^{13}C , nas posições sn-1,3 e sn2. Legenda: SFA, ácido graxo saturado; UFA, ácido graxo insaturados; e PUFA, ácido graxos poliinsaturados.



4.2 Análises gráficas da região das carbonilas de azeites de olivas.

Com os resultados obtidos via deconvolução da região das carbonilas foi possível realizar um estudo gráfico via *Excel* com foco nas áreas dos sinais das amostras, com os gráficos 1, 2 e 3 é possível observar as proporções relativas de ácidos graxos com seus desvios padrões nas regiões observadas entre 172,7 ppm a 173,4 ppm das amostras azeites selo Premium 2023/2024 (puras, sem a adição de óleos vegetais de menor valor, MAPA (Gráfico 1), comerciais (adquiridas em comércio locais) (Gráfico 2) e amostras cedidas pela Polícia federal suspeitas de adulteração com óleos de menores valores (PF e MAPA) (Gráfico 3).

Gráfico 1. Dados obtidos das proporções relativas de ácidos graxos nas regiões observadas entre 172,7 ppm a 173,4 ppm das amostras *Premium* 2023/2024 via deconvolução dos sinais das carbonilas nos espectros de RMN de ^{13}C . Legenda: SFA, ácidos graxos saturados; UFA, ácidos graxos insaturados; PUFA, ácidos graxos poliinsaturados.

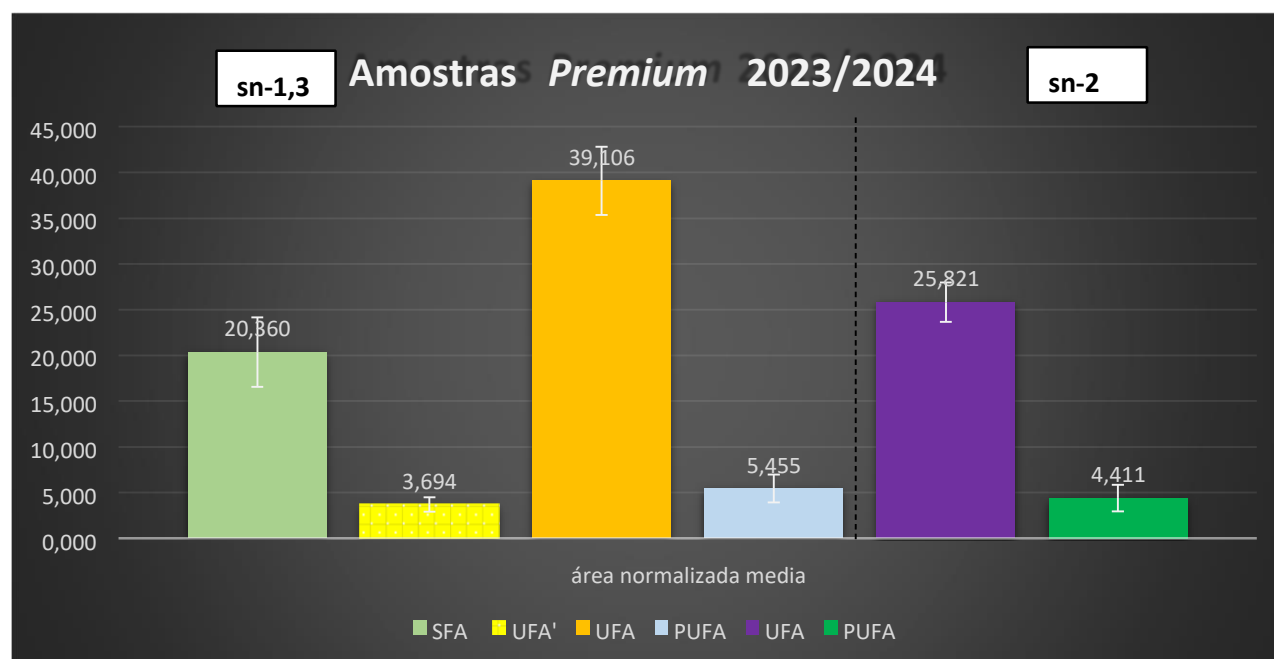


Gráfico 2. Dados obtidos das proporções relativas de ácidos graxos nas regiões observadas entre 172,7 ppm a 173,4 ppm das amostras comerciais via deconvolução dos sinais das carbonilas nos espectros de RMN de ^{13}C . Legenda: SFA, ácidos graxos saturados; UFA, ácidos graxos insaturados; PUFA, ácidos graxos poliinsaturados.

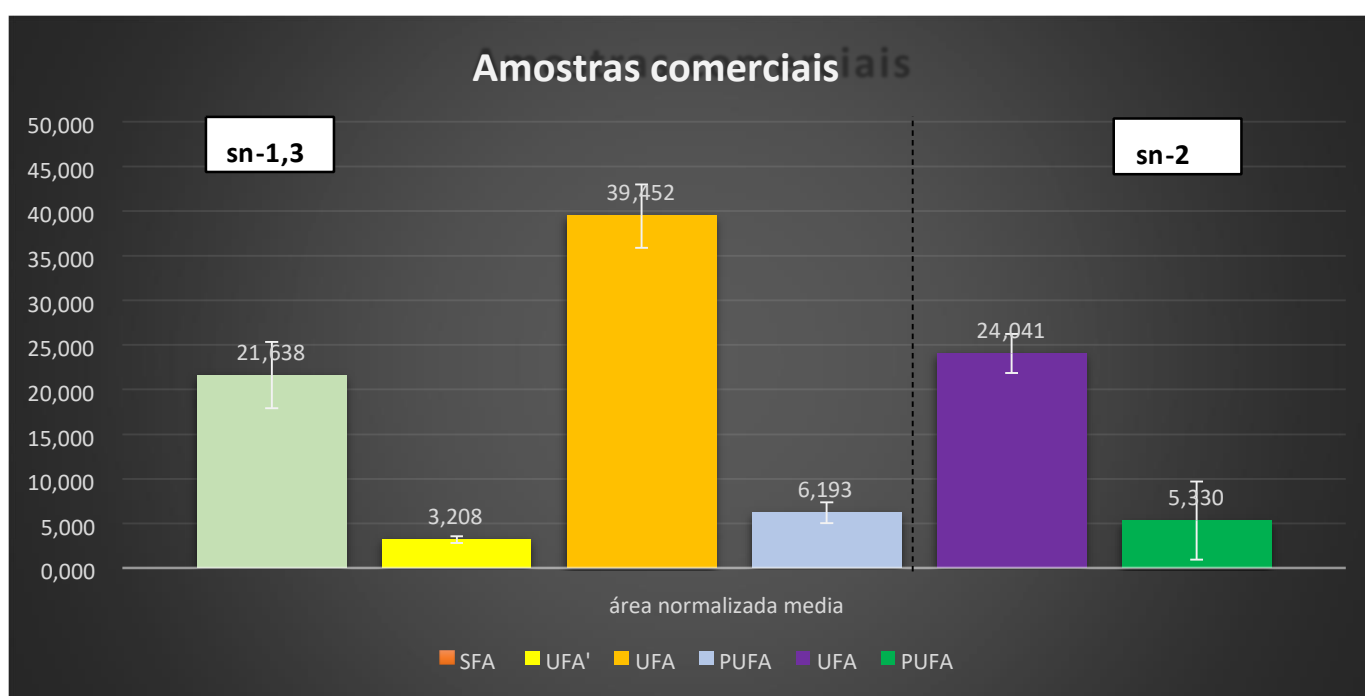
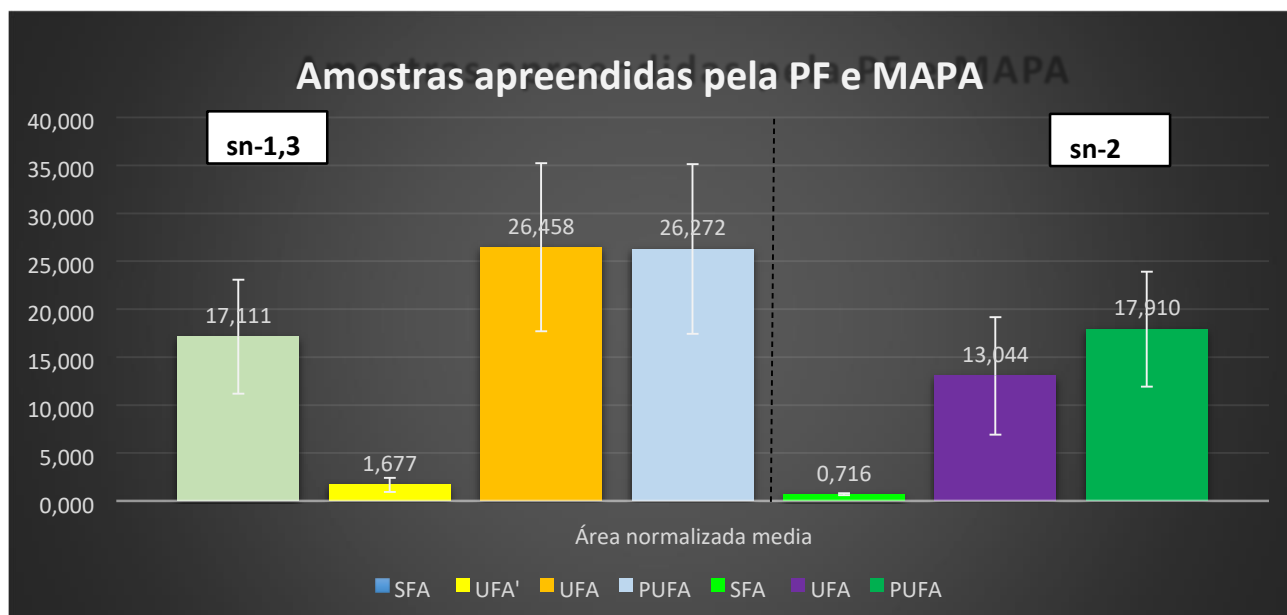


Gráfico 3. Dados obtidos das proporções relativas de ácidos graxos nas regiões observadas entre 172,7 ppm a 173,4 ppm das amostras apreendidas pela PF e MAPA via deconvolução dos sinais das carbonilas nos espectros de RMN de ^{13}C . Legenda: SFA, ácidos graxos saturados; UFA, ácidos graxos insaturados; PUFA, ácidos graxos poliinsaturados.



Os perfis espectrais das amostras comerciais exibiram semelhanças com as amostras *Premium* 2023/2024 (MAPA e PF), que serviram como padrão de qualidade. Contudo, as amostras comerciais apresentaram um desvio padrão maior em ácidos graxos poli-insaturados na posição sn-2, comparativamente às amostras *Premium* 2023/2024.

As análises espectrais da região das carbonilas revelaram um comportamento distinto na distribuição regioespecífica das amostras apreendidas pela PF e MAPA. Nestas, a proporção relativa de ácidos poli-insaturados nas posições sn-1,3 e sn-2 é quatro vezes maior que nas amostras *Premium* 2023/2024 e comerciais. Adicionalmente, observou-se uma diminuição de ácidos graxos insaturados (UFA) nas amostras apreendidas (PF e MAPA) em relação às amostras *Premium* 2023/2024 e comerciais, sendo que os azeites de oliva são naturalmente ricos nesses compostos. Pode ser confirmado na Figura 6, as observações sobre as proporções relativas nas posições sn-1,3 e sn-2 das amostras apreendidas pela PF e MAPA.

Figura 6. Ampliação da região de 172,3 a 173,6 ppm dos espectros de RMN de ^{13}C de azeites ilustrativos correspondentes a amostra comercial (A), amostra apreendida pela PF ou MAPA (B), e amostra com selo Premium 2023/ 2024 (C). Legenda: UFA: ácidos graxos insaturados; SFA: ácidos graxos saturados; PUFA: ácidos graxos poliinsaturados.



4.3 Análise multivariada a partir dos *buckets* do espectro completo de RMN de ^{13}C de azeite de oliva.

A análise do espectro total de RMN de ^{13}C de azeites de oliva (Figura 7) revelou, no gráfico de PCA, uma separação entre as amostras apreendidas pela PF e MAPA, que se posicionaram à direita no eixo PC1 positivo. No entanto, algumas dessas amostras apreendidas se agruparam com as amostras comerciais e *Premium* 2023/2024, localizadas à esquerda no eixo PC1 negativo. As amostras *Premium* e comerciais formaram um agrupamento coeso, indicando a boa qualidade das amostras comerciais estudadas.

Figura 7. Gráfico de escores de PCA obtido a partir dos espectros completos de RMN de ^{13}C das amostras de azeite.

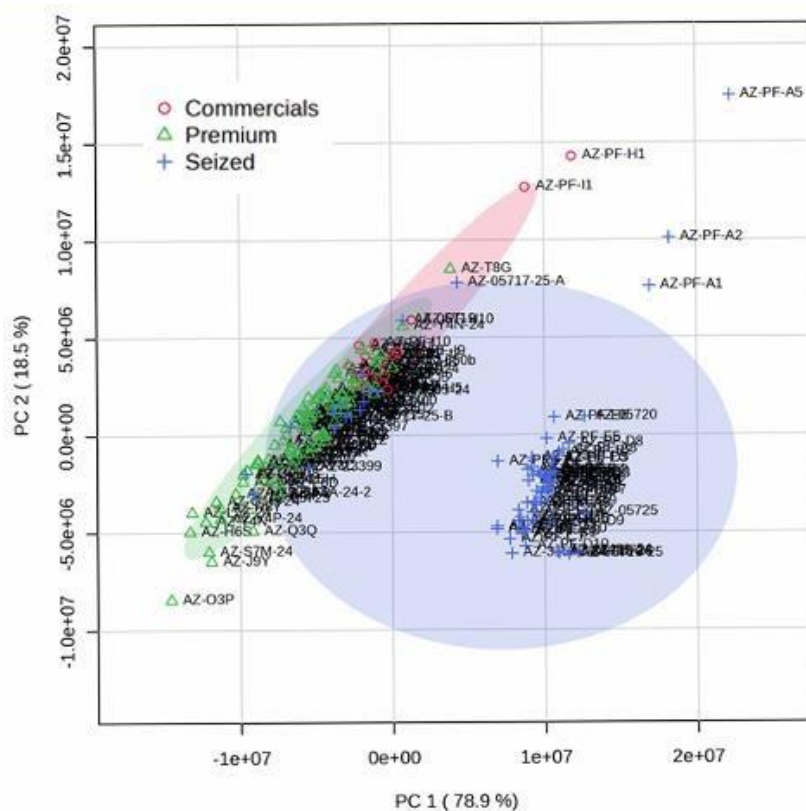
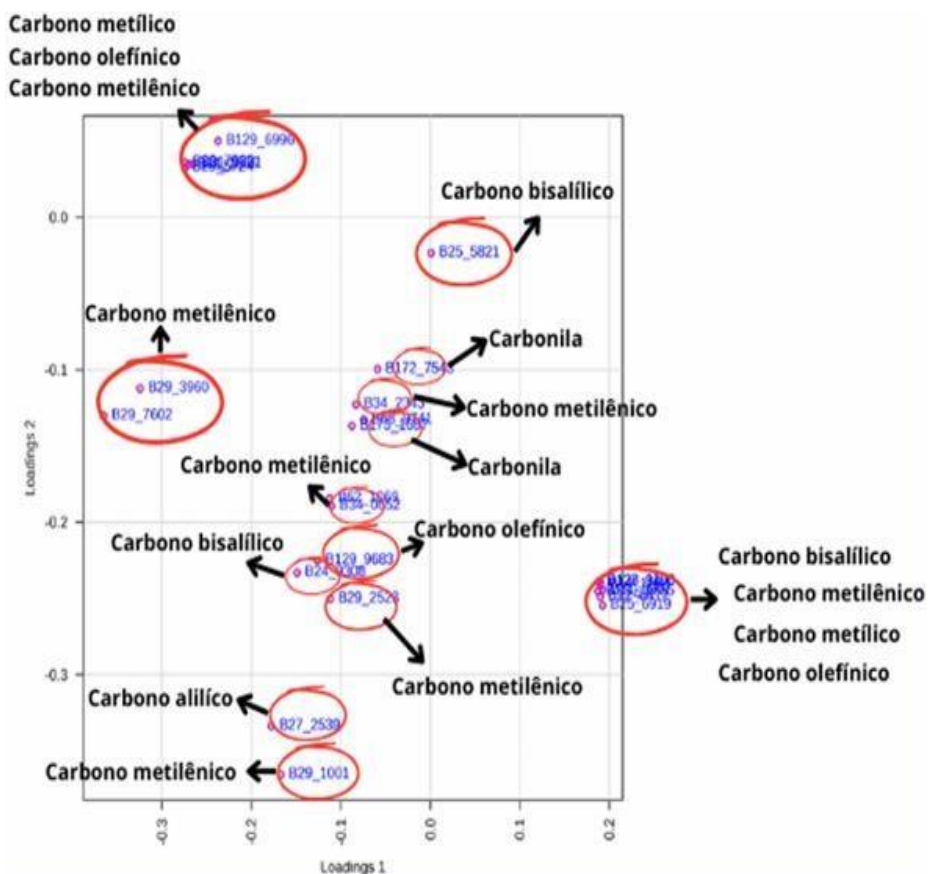


Figura 8. Gráfico de *loadings* de PCA com assinalamentos obtidos a partir dos espectros completos de RMN de ^{13}C para das amostras de azeite.



O gráfico de *loadings* (Figura 8) forneceu informações cruciais sobre os sinais espectrais que contribuíram para a diferenciação das amostras na análise de componentes principais (PCA). Especificamente, os sinais dos carbonos bisalílicos, metilênicos, metílicos e olefínicos foram identificados como os principais responsáveis pelo deslocamento observado nas amostras apreendidas. A presença desses sinais é inerente ao azeite, entretanto, variações significativas em suas proporções podem indicar a substituição parcial do azeite por óleos de menor valor.

Corroborando a análise de PCA, os resultados de proporção relativa, apresentados nos Gráficos 1, 2 e 3, evidenciaram uma proporção distinta de carbonila nas regiões *sn*-1,3 e *sn*-2 das amostras *Premium* 2023/2024, comerciais e amostras apreendidas pela PF e MAPA. Essa diferença na distribuição da carbonila é um marcador importante na caracterização de óleos e gorduras, uma vez que a estrutura dos triacilgliceróis, que contêm grupos carbonila, varia entre diferentes tipos de óleos. Os *loadings* da análise de PCA, ao revelar os sinais específicos que impulsionaram esse comportamento anômalo, permitiram uma compreensão mais aprofundada das características químicas responsáveis pelas distinções observadas entre as amostras.

4.4 Análise multivariada a partir dos dados de análise regioespecífica de ^{13}C de azeite de oliva.

A análise regioespecífica de RMN de ^{13}C dos azeites de oliva (Figura 9) apresentou uma porcentagem de variância explicada pelos eixos das PCs inferior à dos espectros totais. No gráfico de PCA, observou-se uma separação entre as amostras apreendidas pela PF e MAPA, que exibiram um espaçamento suave entre si, posicionando-se à direita no eixo PC1 positivo. Algumas dessas amostras apreendidas agruparam-se com as amostras comerciais e *Premium* 2023/2024, localizadas à esquerda no eixo PC1 negativo. As amostras *Premium* e comerciais formaram um agrupamento coeso, semelhante ao da Figura 6.

^{13}C das amostras de azeite.

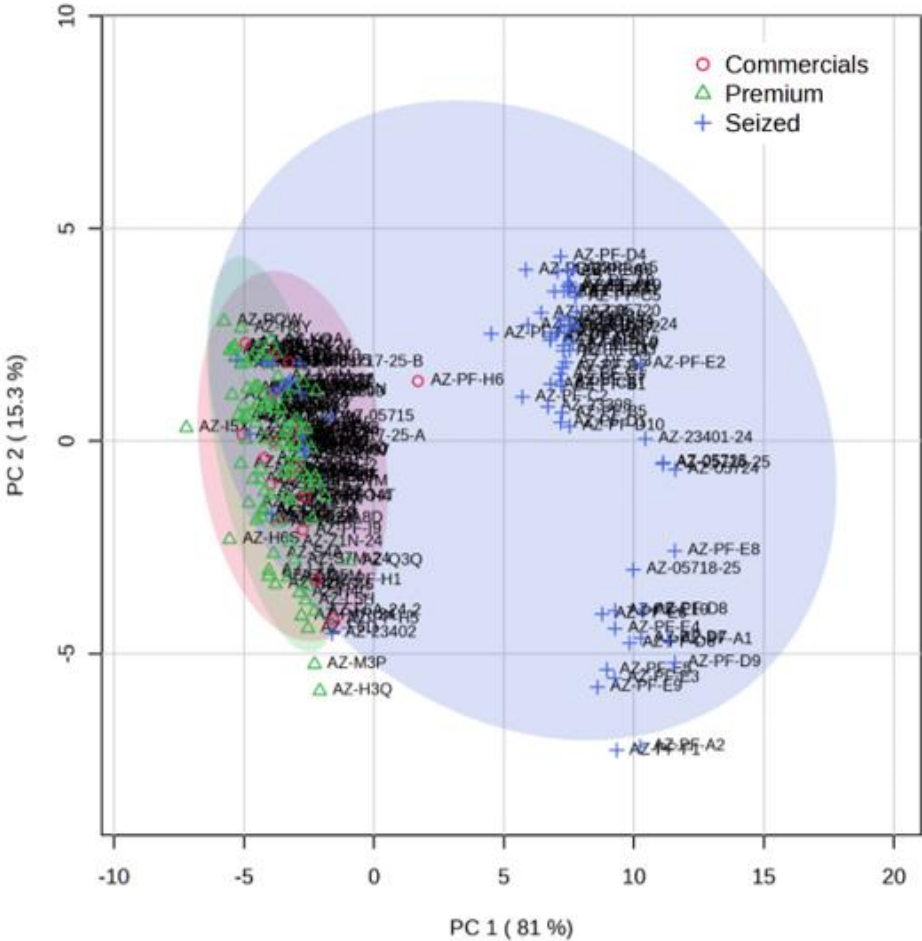
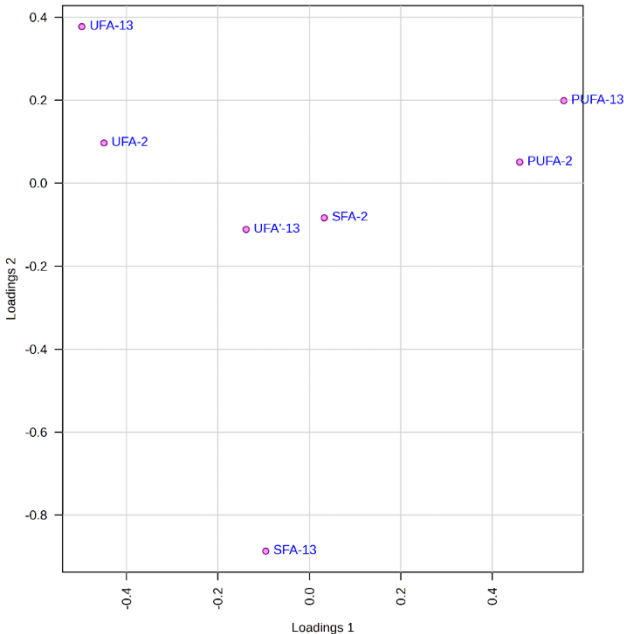


Figura 10. Gráfico de *loadings* de PCA com assinalamentos obtido a partir da análise regioespecífica de RMN de ^{13}C das amostras de azeite. Legenda: UFA: ácidos graxos insaturados; SFA: ácidos graxos saturados; PUFA: ácidos graxos poliinsaturados.



Os *loadings* de PCA para os dados de análise regioespecífica (Figura 10) mostrou que a principal causa dessa diferenciação reside na presença e concentração de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA). Os sinais espectrais correspondentes a esses compostos são os responsáveis por deslocar as amostras apreendidas para a direita no gráfico de *loadings* da PCA. A alta concentração de PUFA em amostras apreendidas sugere que os produtos não são azeite de oliva genuínos, que naturalmente possui baixos níveis de PUFA. Óleos de sementes, frequentemente usados em adulterações, têm teores de PUFA mais elevados.

Em contraste, as amostras de azeite *Premium* e comerciais se posicionam à esquerda no gráfico de *loadings*. Esse deslocamento é atribuído à predominância de ácidos graxos insaturados (UFA), que são os principais constituintes do azeite de oliva. O azeite é rico em ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oleico, que contribuem para sua estabilidade e benefícios à saúde. A análise dos *loadings* da PCA, portanto, validou a autenticidade das amostras *Premium* e comerciais ao demonstrar sua composição característica, rica em UFA e com baixos níveis de PUFA, em consonância com os padrões de qualidade esperados para o azeite de oliva.

5. CONCLUSÃO

A identificação dos perfis de ácidos graxos nas amostras de azeite estudadas (amostras *Premium* 2023/2024, apreendidas pela PF e MAPA e amostras comerciais), com foco nas carbonilas nas posições sn-1,3 e sn-2 dos triacilglicerídeos, foi crucial para detectar variações espectrais significativas. Embora a presença desses sinais seja intrínseca ao azeite, grandes variações em suas proporções podem indicar adulteração por óleos de menor valor, reforçando a confiabilidade da metodologia.

Os resultados corroboraram as apreensões e suspeitas de adulterações do MAPA e da Polícia Federal, demonstrando que essas amostras diferem dos padrões *Premium* e comerciais. Isso estabelece a técnica de RMN de ^{13}C como uma ferramenta poderosa na investigação de azeites de oliva. Além disso, o estudo fornece conhecimento sobre a distribuição regioespecífica por RMN de ^{13}C em azeites de oliva, o que pode auxiliar na definição de um perfil de ácidos graxos nessa matriz. Essa contribuição não só impulsiona o avanço científico na detecção de fraudes alimentares, mas também oferece uma ferramenta prática e confiável para a indústria e órgãos reguladores monitorarem a autenticidade do azeite de oliva e produtos relacionados.

6. REFERÊNCIAS

- [1] ANTONIASSI, R. et al. Avaliação das características de identidade e qualidade de amostras de azeite de oliva. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 1, n. 1-2, p. 32-43, jan./dez. 1998.
- [2] TROVÃO, L. O.; SILVA, F. A. et al. Azeite de oliva e suas propriedades funcionais: uma revisão bibliográfica. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 8, n. 6, p. 44245-44254, jun. 2022.
- [3] YAKAR, A.; KARADAĞ, A. Identifying olive oil fraud and adulteration using machine learning algorithms. *Química Nova*, São Paulo, v. 45, n. 10, p. 1245-1250, 2022.
- [4] ALHARBI, H. et al. The detection of adulteration of olive oil with various vegetable oils – A case study using high-resolution 700 MHz NMR spectroscopy coupled with multivariate data analysis. *Food Control*, v. 166, 110724, 2024.
- [5] OK, S. Detection of olive oil adulteration by low-field NMR relaxometry and UV-Vis spectroscopy upon mixing olive oil with various edible oils. *Grasas y Aceites*, Sevilla, v. 68, n. 1, e181, jan./mar. 2017.
- [6] CAVANNA, D. et al. A Non-Targeted High-Resolution Mass Spectrometry Study for Extra Virgin Olive Oil Adulteration with Soft Refined Oils: Preliminary Findings from Two Different Laboratories. *ACS Omega*, v. 5, n. 37, p. 24169–24178, 2020.
- [7] PAVIA, D. L. et al. *Introdução à Espectroscopia*. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- [8] CLARIDGE, T. D. W. *High-Resolution NMR techniques in organic chemistry*. 3. ed. Oxford: Elsevier, 2016.
- [9] JAMES, T. L. *Fundamentals of NMR*. San Francisco: Department of Pharmaceutical Chemistry, University of California, 1998.
- [10] SACCHI, R.; ADDEO, F.; PAOLILLO, L. ¹H and ¹³C NMR of virgin olive oil: An overview. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 35, n. S1, p. S133–S145, 1997.
- [11] TRUZZI, E. et al. Novel Strategy for the Recognition of Adulterant Vegetable Oils in Essential Oils Commonly Used in Food Industries by Applying ¹³C NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 69, n. 29, p. 8276–8286, 2021.

- [12] LOPES, T. I. B. et al. Toward precision nutrition: commercial infant formulas and human milk compared for stereospecific distribution of fatty acids using metabolomics. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, v. 22, n. 7, p. 484-492, 2018.
- [13] NASCIMENTO, T. A. et al. Vegetable oils: Are they true? A point of view from ATR-FTIR, ¹H NMR, and regiospecific analysis by ¹³C NMR. *Food Research International*, v. 144, 110359, 2021.
- [14] PICARIELLO, G. et al. High resolution ¹³C NMR detection of short and medium chain synthetic triacylglycerols used in butterfat adulteration. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 115, n. 8, p. 858-864, 2013.
- [15] HAGEMAN, J. H. J. et al. Comparison of bovine milk fat and vegetable fat for infant formula: implications for infant health. *International Dairy Journal*, v. 92, p. 37-49, 2019.
- [16] GOUK, S. W. et al. Critical considerations for fast and accurate regiospecific analysis of triacylglycerols using quantitative ¹³C NMR. *Analytical Methods*, v. 5, n. 8, p. 2064-2073, 2013.
- [17] ZHANG, H. et al. Regiospecific Analysis of Fatty Acids and Calculation of Triglyceride Molecular Species in Marine Fish Oils. *BioMed Research International*, v. 2018, art. ID 9016840, 2018.
- [18] FAN, T. W. M. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 28, n. 2, p. 161-219, 1996.