

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SOLVENTE NA RESOLUÇÃO ESPECTRAL EM DOSY RMN APLICADA A ÓLEOS ESSENCIAIS DE MENTA

Karoline Pereira Miossi¹, Warley de Sousa Borges¹, Álvaro Cunha Neto¹.

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, Campus Universitário de Goiabeiras - 29075-910 - Vitória – ES, Brasil, karoline.miossi@edu.ufes.br, warley.borges@ufes.br, alvaro.cunha@ufes.br.

Resumo

O DOSY RMN tem apresentado ser um experimento capaz de realizar caracterização de misturas complexas, como óleos essenciais. A técnica permite a separação dos compostos presentes na mistura a partir dos coeficientes de difusão (D). No entanto, alguns fatores, como a viscosidade podem afetar no valor de D, dessa forma, na interpretação de dados. Neste estudo, tem como objetivo investigar a interferência da viscosidade dos solventes na determinação dos coeficientes de difusão de componentes majoritários de óleos essenciais de menta por DOSY. Foram analisadas amostras de óleo menta, previamente caracterizadas por ¹H RMN, dissolvidas em dois solventes deuterados com diferentes propriedades físico-químicas: CDCl₃ e DMSO-d₆ e realizados experimentos de DOSY RMN. Os resultados indicaram correlação entre D e a viscosidade dos solventes, conforme previsto pela equação de Stokes–Einstein. Com isso, pode-se verificar a importância da escolha de solventes em experimentos de DOSY e de outros com RMN, aplicados a óleos essenciais.

Palavras-chave: Difusão. Menta. Mistura. RMN. Solvente.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra — Química Orgânica.

Introdução

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) por ordenação de difusão (DOSY), estudam-se diferentes difusões moleculares, por meio do espectro de RMN convencional. Dessa forma, a difusão é dispersa ao longo de outra dimensão pelo coeficiente de difusão (D) translacional de cada composto na amostra (Ben-Tal *et al.*, 2022).

As medições de difusão são, geralmente, realizadas usando pulsos de gradiente de campo magnético. Um pulso de gradiente resulta nas coerências com uma fase que corresponde à posição e à ordem de coerência dos spins individuais na amostra. Em seguida, a marcação de fase pode ser removida por outro pulso de gradiente, que geralmente é chamado de gradiente de refocalização. Quando os spins permanecem estacionários durante o tempo entre os pulsos de gradiente, a intensidade e a fase do sinal de RMN após o segundo gradiente serão independentes da intensidade e da duração dos pulsos de gradiente, nesse caso a marcação de fase é completamente removida. No entanto, se os spins se moverem entre a marcação de fase e os gradientes de refocalização, a intensidade e/ou a fase do sinal serão afetadas. Dessa forma, o movimento molecular devido à difusão isotrópica torna o sinal mais atenuado e é esse efeito que é usado para medir os coeficientes de difusão (Loening; Keeler; Morris, 2021).

O espectro de DOSY pode-se observar a separação do deslocamento químico em uma dimensão e o coeficiente de difusão (D) molecular em outra. Como o D é uma propriedade molecular, todos os picos de uma molécula serão alinhados, logo, é possível separar os componentes presentes na amostra (Huang *et al.*, 2023).

Dessa maneira, D pode ser obtido pelo gradiente do pulso no campo usando a equação de Stejskal-Tanner (Equação 1):

$$I = I_0 \exp[(\gamma G \delta)^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) D] \quad \text{Equação 1}$$

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Onde I é a intensidade do eco de spin observada, I_0 é a intensidade do experimento análogo realizado sem gradientes, G é a intensidade do gradiente ($G \cdot \text{cm}^{-1}$), Δ é o chamado atraso de difusão (s), D o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), δ o comprimento do gradiente (s), e γ a constante magnetogirica ($\text{rad} \cdot G^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) do núcleo cuja fase é codificada/decodificada pelos gradientes (Cobas *et al.*, 2005).

Além disso, pode-se reacionar D com os raios hidrodinâmicos moleculares da molécula e a viscosidade do solvente pela equação de Stokes-Einstein (Equação 2) (Ben-Tal *et al.*, 2022; Cobas *et al.*, 2005):

$$D = \frac{k T}{6 \pi \eta r_H} \quad \text{Equação 2}$$

onde k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η a viscosidade da solução e r_H o raio hidrodinâmico. O D e o η são afetados pelas estruturas moleculares e pelas interações intermoleculares no líquido. Os fatores estruturais incluem peso molecular, tamanho, forma, deformabilidade, configuração, grupos funcionais, polaridade e polarizabilidade. Interações fortes podem dificultar o movimento molecular e formar estruturas supramoleculares que o restringem. O impacto dessas características nos comportamentos de difusão e viscosidade depende da mistura específica. Apesar de muitos estudos de simulação sobre esses mecanismos, ainda faltam pesquisas experimentais para explicar por que propriedades de difusão e viscosidade de misturas de líquidos não reativos podem divergir das previsões das equações de mistura (Meng Yuan, 2023).

O DOSY é uma técnica não destrutível em que pode-se ser aplicada em diferentes áreas com na caracterização de nanoemulsões e materiais (Pinto *et al.*, 2016; Boccia *et al.*, 2024), em estudos de mecanismos de inclusão ou padrões de ligações (Ogata *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2025), verificação de controle de autenticidade e qualidade com e/ou sem técnicas complementares (Korenika *et al.*, 2024; Holzgrabe *et al.*, 2011).

Um exemplo de mistura complexa é o óleo essencial (OE) de menta. Diversas espécies de *Mentha* são cultivadas para a produção de óleos essenciais, como a *Mentha arvensis* L. (hortela-do-brasil) e a *Mentha x piperita* L. (hortelã-pimenta) (Chu *et al.*, 2025; Farmacopeia Brasileira, 2024). A primeira pode conter, no mínimo, 30% de mentol. Enquanto a segunda, pode conter, no mínimo, 35% para a segunda. Além disso, ambas contêm mentona, acetato de mentila e carvona (Farmacopeia Brasileira, 2024; ISO 9776:199(E), 1999; ISO 856:2006(E), 2006).

Os óleos de menta são conhecidos pelos seus efeitos antibacterianos, antioxidantes, anti-inflamatórios, antieméticos, antiespasmódicos, diaforéticos e analgésicos. Além disso, as hortelãs, vem sendo usadas na medicina popular tradicional em doenças respiratórias ou distúrbios do sistema digestivo (Chu *et al.*, 2025).

Uma vez que uma ferramenta multifuncional permite obter insights sobre sistemas de solução a partir da medição de D e sua correlação com propriedades moleculares ou interações com solventes. O uso de espectrômetros de RMN com gradiente e o avanço das sequências de pulso DOSY ampliaram as publicações sobre dados de difusão, consolidando o DOSY como ferramenta padrão na pesquisa química e farmacêutica (Macho-Ávila *et al.*, 2025). Com isso, objetiva-se estudar a interferência do solvente no valor de D no óleo de menta por DOSY, a fim de estabelecer parâmetros no DOSY de OE.

Metodologia

Analísaram-se amostras de óleo essencial de hortelã-do-brasil e hortelã-pimenta a partir da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, do modelo VNMR400 Varian/Agilent operando a 9,4 T (400 MHz), com sonda Broadband $1\text{H}/\text{X}/\text{D}$ de 5 mm, os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm em relação ao padrão interno (TMS). Previamente, os óleos foram caracterizados por ^1H RMN, no qual foram pesados 5 mg de cada óleo e diluído em 500 μL clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$).

Na análise do DOSY, foram pesados 20 mg de cada óleo e diluídos 500 μL em CDCl_3 e $\text{DMSO}-d_6$. Para cada amostra foram avaliados diferentes valores do comprimento do gradiente de difusão (Diffusion gradient length - DGL) e do atraso de difusão (Diffusion delay - DD), usando 32 scans, sendo realizadas seis Doneshot para cada amostra preparada. Na Tabela 1, pode-se verificar os valores de DD e GDL para cada Doneshot. Em seguida, foi determinado o coeficiente de difusão e relacionado com o solvente.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Tabela 1 - Valores dos parâmetros ajustados em cada Doneshot.

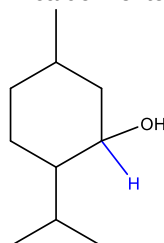
Experimento	Diffusion gradient length (ms)	Diffusion delay (ms)
Doneshot 1	2,0	50,0
Doneshot 2	0,5	50,0
Doneshot 3	0,5	100,0
Doneshot 4	2,0	150,0
Doneshot 5	1,0	50,0
Doneshot 6	1,0	100,0

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Resultados

Inicialmente, foi determinado que o estudo do DOSY seria realizado no sinal do hidrogênio (H_{C-OH}) ligado ao carbono da hidroxila do mentol, como destacado na figura 1 da estrutura química do mentol. Para isso, os óleos foram caracterizados pelo 1H RMN, sendo que o sinal H_{C-OH} é um multipletto com deslocamento químico de 3,1 ppm para o $DMSO-d_6$ para ambos os óleos e 3,4 ppm para o $CDCl_3$.

Figura 1 – Estrutura química do mentol, em destaque o H_{C-OH} .



Fonte: Autoria própria.

Quando as avaliações dos melhores parâmetros de CGD e AD, para a hortelã-pimenta o melhor foi o Doneshot 5, em ambos os solventes. Já para hortelã-do-brasil, no $CDCl_3$ o melhor foi o Doneshot 3 e para o $DMSO-d_6$ o Doneshot 5. Observou-se variações significativas na separação dos sinais com base nos valores de D para o mesmo sinal. Em relação aos solventes, ainda que o $CDCl_3$ possua menor viscosidade que o $DMSO-d_6$, a separação das espécies no eixo da difusão foi mais eficiente para o mais viscoso. Assim, D decresce com o aumento da viscosidade ($D_{DMSO-d_6} = 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $D_{CDCl_3} = 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), previsto pela equação de Stokes–Einstein.

Discussão

Analisando as propriedades do $DMSO-d_6$, tem-se que é mais polar e é solvantante, isso faz com que ocorra uma solvatação diferentes entre compostos oxigenados e hidrocarbonetos, por consequência, aumenta a diferença hidrodinâmico entre os compostos (Kleks *et al.*, 2021). Dessa forma, foi possível maior dispersão dos sinais no eixo vertical, separando os compostos presentes na amostra. Em contrapartida, o $CDCl_3$, mais polar, tem a tendência de solubilizar de forma uniforme os terpenos (Kleks *et al.*, 2021), ocasionado a sobreposição dos sinais no espectro DOSY, logo, não separando os compostos com mais eficiência. Demonstrando a interferência do solvente em uma análise de DOSY em mistura complexa. Quando a análise de DGL e DD, observou-se que o Doneshot 5 apresentou melhor respostas. Com isso, o melhor parâmetro para análise DOSY para amostras de óleo essencial de hortelã-do-brasil e hortelã-pimenta foi o uso de $DMSO-d_6$, o DGL igual a 1,0 ms e DD com 50,0 ms.

Conclusão

O estudo apresentado, demonstrou que a DOSY RMN é um método capaz de investigar as alterações e influências em análises de difusão em misturas complexas, como óleos essenciais.

Conclui-se que o solvente exerce influência significativa sobre o coeficiente de difusão em experimentos DOSY com óleos essenciais de menta. O solvente com viscosidade maior, DMSO-d₆, resultou na redução do D, proporcionando uma separação mais eficaz dos sinais devido à maior resolução hidrodinâmica e à possibilidade de interações seletivas. Com isso, os resultados destacam a importância da escolha criteriosa de solvente para a técnica. Assim, deve-se observar a viscosidade e a solubilidade do solvente. Com isso, a técnica de DOSY pode ser uma estratégia para separação de misturas complexas, sem a necessidade de separação física.

Referências

- BOCCIA, A. C.; PULVIRENTI, A.; CERRUTI, P.; SILVETTI, T.; BRASCA, M. Antimicrobial starch-based cryogels and hydrogels for dual-active food packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 342, p. 122340, 2024.
- BEN-TAL, Y.; BOALER, P. J.; DALE, H. J.; DOOLEY, R. E.; FOHN, N. A.; GAO, Y.; *et al.* Mechanistic analysis by NMR spectroscopy: A users guide. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 129, p. 28-106, 2022.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. 2 v.
- CARVALHO, M. M.; ELLEFSEN, C. F.; ELTVIK, A. A.; HIORTH, M.; SAMUELSEN, A. B. C. Chemical structure characterization of polysaccharides using diffusion ordered NMR spectroscopy (DOSY). **Carbohydrate Polymers**, v. 349, p. 123021, 2025.
- CHU, M. H.; LIU, T. W.; CHEN, P. H.; CHEN, Y. H.; TANG, K. L.; HSU, S. J.; *et al.* Investigation of the acetylcholinesterase inhibitors of Mentha genus essential oils with in vitro and in silico approaches. **Industrial Crops and Products**, v. 227, p. 120783, 2025.
- COBAS, J. C.; GROVES, P.; MARTIN-PASTOR, M.; CAPUA, A. D. New applications, processing methods and pulse sequences using diffusion NMR. **Current Analytical Chemistry**, v. 1, n. 3, p. 289-305, 2005.
- HOLZGRABE, U.; MALET-MARTINO, M. Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification—The NMR approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 679-687, 2011.
- HUANG, Z.; BI, T.; JIANG, H.; LIU, H. Review on NMR as a tool to analyse natural products extract directly: Molecular structure elucidation and biological activity analysis. **Phytochemical Analysis**, v. 35, n. 1, p. 5-16, 2024.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 856:2006(E)**. Geneva, 2006.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 9776:199(E)**. Geneva, 1999.
- KLEKS, G.; HOLLAND, D. C.; PORTER, J.; CARROLL, A. R. Natural products dereplication by diffusion ordered NMR spectroscopy (DOSY). **Chemical Science**, v. 12, n. 32, p. 10930-10943, 2021.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

KORENIKA, A. M. J.; JEROMEL, A.; TOMAZ, I.; JEDNAČAK, T.; RONČEVIĆ, S.; NEMET, I.; *et al.* Deep reinforcement learning classification of sparkling wines based on ICP-MS and DOSY NMR spectra. **Food Chemistry: X**, v. 21, p. 101162, 2024.

LOENING, N. M.; KEELER, J.; MORRIS, G. A. One-dimensional DOSY. **Journal of magnetic resonance**, v.53, n. 1, p. 103-112, 2021.

MACHO-ÁVILA, I.; GONZÁLEZ-FERRER, G.; BALLESTER, P.; ARAGAY, G. DOSY NMR Experiments at Variable Temperature. A Thorough Analysis of Optimal Conditions for Reliable Results. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 63, p. 712-724, 2025.

OGATA, Y.; INOUE, Y.; IKEDA, N.; MURATA, I.; KANAMOTO, I. Improvement of stability due to a cyclamen aldehyde/ β -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Molecular Structure**, v. 1215, p. 128161, 2020.

PINTO, N. D. O. F.; RODRIGUES, T. H. S.; PEREIRA, R. D. C. A.; SILVA, L. M. A.; CACERES, C. A.; AZEREDO, H. M. C.; *et al.* Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 279-288, 2016.

YUAN, M.; XU, W.; YANG, Y.; LI, S.; YANG, H.; GAO, J.; YANG, M. Diffusion-Ordered Spectroscopy (DOSY) as a Powerful NMR Method to Investigate Molecular Mobilities and Intermolecular Interactions in Complex Oil Mixtures. **ChemPhysChem**, v. 24, n. 24, p. e202300587, 2023.

Agradecimentos

Meus agradecimentos aos colegas do Laboratório de Orgânica, aos órgãos de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES), ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear pelas análises e a disponibilidade do espaço fornecido pela UFES e pelo Núcleo de Competências em Química do Petróleo (NCQP — LabPetro).