

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Ana Gabriella Carvalho Miguita

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA ESTUDOS DE AUTENTICAÇÃO E
CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS NATURAIS – *HYPERICUM
PERFORATUM* E *LYCIUM BARBARUM***

Belo Horizonte

2023

UFMG/ICEx/DQ. 1.563

T. 710

ANA GABRIELLA CARVALHO MIGUITA

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA ESTUDOS DE AUTENTICAÇÃO E
CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS NATURAIS – *HYPERICUM
PERFORATUM* E *LYCIUM BARBARUM***

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências – Química.

Orientador: Profa. Clésia Cristina Nascentes
Coorientador: Prof. Marcelo Martins de Sena

Belo Horizonte

2023

Ficha Catalográfica

M636e
2023
T

Miguita, Ana Gabriella Carvalho.
Estratégias analíticas para estudos de autenticação e controle de qualidade de produtos naturais – *Hypericum Perforatum* e *Lycium Barbarum* [manuscrito] / Ana Gabriella Carvalho Miguita. 2023.
133 f. : il., gráfs., tabs.

Orientadora: Clésia Cristina Nascentes.
Coorientador: Marcelo Martins de Sena.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.

Bibliografia: f. 117-125.
Apêndice: f. 126-133.

1. Química analítica – Teses. 2. Quimiometria – Teses. 3. Análise de componentes principais – Teses. 4. Matéria médica vegetal – Teses. 5. Produtos naturais – Qualidade – Teses. 6. Plantas medicinais – Teses. 7. Espectrometria de massa – Teses. 8. Fluorescência de raio X – Teses. I. Nascentes, Clésia Cristina, Orientadora. II. Sena, Marcelo Martins de, Coorientador. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Estratégias Analíticas para Estudos de Autenticação e Controle de Qualidade de Produtos Naturais - *Hypericum Perforatum* e *Lycium Barbarum*"

Ana Gabriella Carvalho Miguita

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Clésia Cristina Nascentes - Orientadora
UFMG

Prof. Marcelo Martins de Sena - Coorientador
UFMG

Prof. Boniek Gontijo Vaz
UFG

Dr. Yuri Machado
PCMG

Prof. Christian Fernandes
UFMG

Profa. Mariana Ramos de Almeida
UFMG

Belo Horizonte, 03 de agosto de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Clesia Cristina Nascentes, Professora do Magistério Superior**, em 03/08/2023, às 18:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Christian Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 03/08/2023, às 18:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Martins de Sena, Professor do Magistério Superior**, em 03/08/2023, às 18:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Ramos de Almeida, Professora do Magistério Superior**, em 03/08/2023, às 18:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Yuri Machado, Usuário Externo**, em 08/08/2023, às 22:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Boniek Gontijo Vaz, Usuário Externo**, em 22/08/2023, às 13:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2513106** e o código CRC **B3CE42A8**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me permitiu concluir esta etapa me dando forças durante o percurso para vencer todos os obstáculos.

Aos meus pais por não medirem esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos, por serem minha base, meu porto seguro, e por sempre acreditarem em mim.

Aos demais familiares, minhas avós, tias, tios e primos por toda ajuda, paciência e apoio emocional nessa caminhada. Vocês foram fundamentais nessa realização.

Agradeço aos meus amigos, que são minha segunda família, por me ajudarem de perto ou mesmo de longe a concluir esta etapa com incentivo, torcida, apoio e muito amor. Vocês sabem o quanto são fundamentais em cada vitória.

Aos colegas de laboratório pelo companheirismo e ajuda nesses últimos anos, por terem se transformado em minha família em Belo Horizonte e amigos para a vida toda. Vocês tornaram essa caminhada mais leve e divertida.

Agradeço à minha orientadora Dra. Clésia Nascentes e meu coorientador Dr. Marcelo Sena pela amizade, pelos ensinamentos, ajuda e dedicação durante esses anos. Agradeço também ao Dr. Rodinei Augusti por toda ajuda, colaboração e parceria.

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Instituto de Ciências Exatas e ao departamento de Química, assim como a seus funcionários e professores.

Agradeço ao CNPq pelo custeamento pessoal dessa pesquisa.

Agradeço à FAPEMIG (RED00042-16) pelo financiamento da pesquisa.

Agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

“O desejo profundo da humanidade pelo conhecimento é justificativa suficiente para nossa busca contínua.”

Stephen Hawking

RESUMO

Nos últimos anos, tem crescido o interesse da população por medicamentos e suplementos naturais como substitutos dos medicamentos sintéticos. Porém, há diversos problemas envolvendo o elevado consumo desses produtos, como o grande número de casos de automedicação sem acompanhamento médico, e ainda, a falta de fiscalização e controle de qualidade desses medicamentos, podendo acarretar casos de falsificação e adulteração. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi analisar amostras de dois tipos de produtos naturais para avaliação de autenticidade e qualidade desses produtos. Em uma das aplicações foram analisadas 43 amostras de *Hypericum Perforatum L.* (Erva de São João). As amostras comerciais foram analisadas por espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS) e fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF), e os resultados processados por ferramentas quimiométricas. Por meio das análises por PS-MS foi possível identificar amostras que continham outros princípios ativos além do *Hypericum perforatum*. Desta maneira, 52,3% das amostras foram consideradas adulteradas. Pelas análises por TXRF foi possível identificar e quantificar 19 elementos presentes nas amostras. Foram construídos modelos PCA (Análise de componentes principais) para os dados obtidos por PS-MS e para os obtidos por TXRF, assim como um modelo de fusão de dados, concatenando os resultados das duas técnicas. Na segunda aplicação, foram analisadas 28 amostras (em cápsulas) de Goji berry (*Lycium barbarum*) por PS-MS. Da mesma forma, através de seus espectros foi possível notar a ausência de compostos característicos do fruto em 18 amostras, indicando casos de falsificação dos produtos. Foi construído um modelo PCA a partir dos dados obtidos para avaliar a dispersão das amostras. A partir dos resultados obtidos, pode-se verificar a simplicidade e aplicabilidade da técnica PS-MS para avaliação de autenticidade de fitoterápicos e suplementos e concluir que é clara a necessidade de um maior controle de qualidade desses produtos naturais no Brasil.

Palavras-chave: Erva de São João; Goji berry; espectrometria de massas com ionização por *paper spray*; fluorescência de raios X por reflexão total; análise de componentes principais; fusão de dados.

ABSTRACT

Recently, the population's interest in medicines and natural supplements as substitutes for synthetic drugs has grown. However, there are several problems involving the high consumption of these products, such as the large number of cases of self-medication without medical supervision, and also the lack of inspection and quality control of these medicines, which may lead to instances of forgery and adulteration. Thus, the objective of this work was to analyze samples of two types of natural products to assess the authenticity and quality of these products. In the first application, 43 samples of *Hypericum Perforatum L.*, known as St John's wort, were analyzed. Commercial samples were analyzed by paper spray mass spectrometry (PS-MS) and total reflection X-ray fluorescence (TXRF), and the resulting data were processed by chemometric tools. Through PS-MS spectra, it was possible to identify samples containing other active principles in addition to *Hypericum perforatum*. Therefore, 52.3% of the samples were detected as adulterated. Through TXRF data, it was possible to identify and quantify 19 elements present in the samples. PCA (Principal Component Analysis) models were built for the data obtained by PS-MS and for those obtained by TXRF, as well as a data fusion model, concatenating the results of the two techniques. In the second application, 28 commercial samples (in capsules) of Goji berry (*Lycium barbarum*) were analyzed by PS-MS. Likewise, through mass spectra, it was possible to detect the absence of compounds characteristic of the fruit in 18 samples, indicating cases of product counterfeiting. A PCA model was built from the data obtained to evaluate the dispersion of the samples. From the results obtained, one can verify the simplicity and applicability of the PS-MS technique for assessing the authenticity of herbal medicines and supplements and conclude that there is a clear need for greater quality control of these natural products in Brazil.

Keywords: St John's wort; Goji berry; paper Spray Mass Spectrometry; total reflection X-ray fluorescence spectrometry; principal component analysis, data fusion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático de um espectrômetro de massas.	29
Figura 2. Representação esquemática da ionização <i>electrospray</i> (ESI).....	31
Figura 3. Desenho esquemático da montagem do sistema PS-MS.....	32
Figura 4. Imagem da formação dos múltiplos <i>sprays</i> . (Espy <i>et al.</i> , 2012).....	32
Figura 5. Diferentes ângulos do papel para o PS-MS (papeis cortados em forma circular para garantir que o spray seja formado apenas nas pontas) e formação dos sprays em cada angulação. (Yang <i>et al.</i> , 2012).	33
Figura 6. A) Posicionamento do papel em frente ao espectrômetro de massas. B) Intensidade do sinal referente à cocaína de acordo com o posicionamento do papel. (Liu <i>et al.</i> , 2010).	34
Figura 7. Arranjo simplificado usado na (a) fluorescência de raios X convencional e na (b) TXRF. (Klockenkämper e Bohlen, von, 2001).....	37
Figura 8. Fragmento de espectro de raios X do material NIST 1640, em destaque a intensidade do sinal do <i>background</i> (NBG) e o pico do analito Rb (NI). (BRUKER, 2012).	39
Figura 9. Representação do filme de amostra no disco, para medidas de TXRF. (BRUKER, 2012).	40
Figura 10. A) representação das amostras simuladas em função de suas variáveis e B) representação dos escores das componentes principais 1 e 2 (CP1 e CP2). (Pereira, 2016).	43
Figura 11. Representação da matriz de dados X a partir de dados de espectrometria de massas.	44
Figura 12. Representação da decomposição da matriz de dados X de acordo com um modelo PCA.	45
Figura 13. Dados de pessoas com depressão por região no mundo de acordo com a OMS. (WHO, 2017).	48
Figura 14. Imagem da <i>Hypericum perforatum</i> L.	49
Figura 15. Imagem da <i>Ageratum conyzoides</i> L.	52
Figura 16. Imagens de algumas amostras de Erva de São João utilizadas nesse trabalho.....	55
Figura 17. Aparato instrumental utilizado para as análises: a) Espectrômetro de massas Thermo LQC-Fleet; b) Fonte de ionização <i>paper spray</i>	56

Figura 18. Ilustração do sistema ultrassônico do tipo <i>cup horn</i> empregado no procedimento de preparo das amostras de <i>Hypericum perforatum L.</i>	59
Figura 19. Disco de quartzo com amostra utilizado em TXRF.	60
Figura 20. Estrutura química das moléculas dos metabólitos presentes nas amostras de <i>Hypericum perforatum</i>	63
Figura 21. Espectro representativo obtido por PS(+)-MS de uma amostra de Erva de São João contendo atazanavir (<i>m/z</i> 705) como PI.	65
Figura 22. Espectro representativo obtido por PS(+)-MS da amostra de <i>Ageratum conyzoides</i>	67
Figura 23. Espectros representativos obtidos por PS(+)-MS de quatro amostras de vegetais de erva de São João.	68
Figura 24. Espectros representativos obtidos por PS(+)-MS de três amostras de cápsulas de erva de São João.	69
Figura 25. Espectros representativos obtidos por PS(+)-MS de duas amostras de comprimidos de erva de São João.	70
Figura 26. Espectro representativo obtido por PS(+)-MS do padrão da Erva de São João.	72
Figura 27. Gráfico de T^2 de <i>Hotelling</i> x resíduos Q.	74
Figura 28. Gráficos de escores de PC1xPC2 dos espectros PS-MS das amostras de erva de São João.	75
Figura 29. Gráficos de pesos de a) PC1 e b) PC2.	76
Figura 30. Gráfico de Pareto com as respostas múltiplas obtidas a partir do planejamento fatorial 2_{III}^{5-2} empregado para otimização do método de análise por TXRF.	78
Figura 31. Fragmento de um espectro de amostra de erva de São João obtido por TXRF.	80
Figura 32. Escores de PC1xPC2 dos dados obtidos a partir das análises no TXRF.	84
Figura 33. Gráfico de escores de PC1xPC2 dos dados obtidos a partir das análises no TXRF.	84
Figura 34. Gráficos de pesos de a) PC1 e b) PC2.	85
Figura 35. Gráficos de escores de PC1xPC2 dos dados obtidos a partir das análises no TXRF apenas com amostras de <i>Hypericum perforatum</i>	87

Figura 36. Gráficos de pesos de a) PC1 e b) PC2 do modelo contendo dados de TXRF apenas com amostras de <i>Hypericum perforatum</i>	88
Figura 37. Gráfico de T ² de Hotelling x resíduos Q.	89
Figura 38. Escores de PC1xPC2 dos dados obtidos a partir de um modelo PCA de fusão de dados de PS-MS e TXRF.....	90
Figura 39. Gráficos de pesos de a) PC1 e b) PC2 para o modelo PCA obtido por fusão de dados.....	91
Figura 40. Frutos de <i>Lycium barbarum</i>	93
Figura 41. Imagens de algumas amostras comerciais de Goji berry em cápsulas analisadas nesse trabalho.	100
Figura 42. Imagem de amostra de frutos secos de Goji berry utilizada como referência.	100
Figura 43. Imagem do conteúdo de algumas cápsulas de Goji berry.	103
Figura 44. Imagem de alguns dos extratos das amostras comerciais de Goji berry.	103
Figura 45. Imagem das amostras em etanol no processador ultrassônico com o acessório <i>cup horn</i>	105
Figura 46. Espectro representativo obtido por PS(+)-MS da amostra de Goji berry utilizada como referência (fruta seca).....	106
Figura 47. Espectros representativos obtidos por PS(+)-MS de duas amostras comerciais de Goji berry.....	108
Figura 48. Espectros representativos obtidos por PS(+)-MS de quatro amostras comerciais de Goji berry.....	109
Figura 49. Gráfico de T ² de Hotelling x resíduos Q.	111
Figura 50. Gráficos de escores de PC1xPC2 dos dados obtidos de análise de Goji berry por PS-MS.....	112
Figura 51. Gráficos de pesos (dados de Goji berry) de a) PC1 e b) PC2.	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Marca e origem das amostras de Erva de São João adquiridas.....	53
Tabela 2. Condições do planejamento fatorial 2_{III}^{5-2} na análise por TXRF.	61
Tabela 3. Massa nominal e m/z dos íons protonados dos metabólitos do <i>Hypericum perforatum</i>	64
Tabela 4. Resultados do planejamento fatorial 2_{III}^{5-2} para otimização das análises por TXRF.	77
Tabela 5. Resultados de precisão e veracidade do método de análise por TXRF utilizando o CRM NIST 1573a, n = 7.	79
Tabela 6. Resultados de precisão e veracidade do método de análise por TXRF com Triton X114 utilizando o CRM NIST 1573a, n = 8.....	80
Tabela 7. Faixas de concentração os elementos determinados por TXRF nas amostras de erva de São João (n=43).....	81
Tabela 8. Faixas de concentração determinadas para os elementos nas amostras de erva de São João contendo apenas <i>Hypericum perforatum</i> (n=21).....	82
Tabela 9. Alguns dos compostos presentes no <i>Lycium barbarum</i> L.....	94
Tabela 10. Condições de extração de Goji berry relatadas na literatura.	98
Tabela 11. Marca e origem das amostras comerciais de Goji berry analisadas.	99
Tabela 12. Condições do planejamento experimental 2^2 com triplicata no ponto central para o procedimento de extração.	102
Tabela 13. Íons dos metabólitos de referência da <i>Lycium barbarum</i>	104
Tabela 14. Resultado do planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central para o procedimento de extração.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CCD – Planejamento Composto Central (do inglês “*Central Composite Design*”)
- CI – Ionização química (do inglês “*Chemical Ionization*”)
- DART-MS – Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ionização por Análise Direta em Tempo Real (do inglês “*Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry*”)
- DESI – Ionização por Desorção *Electrospray* (do inglês “*Desorption Electrospray Ionization*”)
- DPR – Desvio Padrão Relativo
- EDXRF – Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva (do inglês “*Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*”)
- EI – Ionização por impacto eletrônico (do inglês “*Electron Ionization*”)
- ER – Erro Relativo
- ESI – Ionização por *Electrospray*
- GC-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês “*Gas Chromatography Mass Spectrometry*”)
- GC-NPD/MS – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas com Detector de Nitrogênio-Fósforo (do inglês “*Gas Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Detection and Mass Spectrometry*”)
- HCA – Análise Hierárquica de Agrupamentos (do inglês “*Hierarchical Cluster Analysis*”)
- ICP-MS - Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês “*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*”)
- ICP-OES – Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês “*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*”)
- IT – *Ion trap*
- IV – Infravermelho
- LC-DAD – Cromatografia Líquida com Detector de Arranjo de Diodos (do inglês “*Liquid Chromatography-Diode Array Detector*”)
- LC-HR-ESI-MS – Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas de Ionização por Eletropulverização de Alta Resolução (do inglês “*Liquid Chromatography High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry*”)

LC-MS – Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês “*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*”)

LC-QTOF-MS – Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas com Analisador Quadrupolo-Tempo de Voo (do inglês “*Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry*”)

LC-UV – Cromatografia Líquida com Detecção por Ultravioleta (do inglês “*Liquid Chromatography-Ultraviolet*”)

LD – Limite de Detecção

LDA – Análise Discriminante Linear (do inglês “*Linear Discriminant Analysis*”)

LQ – Limite de Quantificação

m/z – Razão massa-carga

MCR-ALS – Resolução Multivariada de Curvas (do inglês “*Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares*”)

MRC – Material de Referência Certificado

MS/MS (MS^2) – Espectrometria de Massas Sequencial

OPLS-DA – Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais (do inglês “*Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*”)

OT – Orbitrap

PARAFAC – Análise de Fatores Paralelos

PC – Componente Principal (do inglês “*Principal Component*”)

PCA – Análise de Componentes Principais (do inglês “*Principal Component Analysis*”)

PCR – Regressão por Componentes Principais (do inglês “*Principal Component Regression*”)

PLS – Mínimos Quadrados Parciais (do inglês “*Partial Least Squares*”)

PLS-DA – Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês “*Partial Least Squares Discriminant Analysis*”)

PS-MS – Espectrometria de Massas com Ionização por *Paper Spray* (do inglês “*Paper Spray Mass Spectrometry*”)

QqQ – Triplo quadrupolo

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SIMCA - Modelos Independentes de Similaridade utilizando Componentes Principais (do inglês “*Soft Independent Modeling of Class Analogy*”)

TLC – Cromatografia em Camada Delgada (do inglês “*Thin Layer Chromatography*”)

TOF - Análise por tempo de voo (do inglês "*Time of Light*")

TXRF - Espectrometria de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (do inglês "*Total-reflection X-Ray Fluorescence*")

XRF - Espectrometria de Fluorescência de Raios X (do inglês "*X-Ray Fluorescence*")

WDXRF - Fluorescência de Raios X por Dispersão de Comprimento de Onda (do inglês "*Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence*")

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 Consumo de produtos naturais	22
2.2 Autenticidade de plantas medicinais	25
2.3 Estudo de metabólitos	26
2.4 Espectrometria de massas	28
2.4.1 Analisadores	29
2.4.2 Técnicas de ionização	30
2.4.2.1 Ionização por paper spray (PS-MS).....	31
2.5 Espectrometria de Fluorescência de Raios X (XRF)	35
2.5.1 Espectrometria de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) .	36
2.5.2 Análise quantitativa em TXRF	37
2.5.3 Preparo de amostras para análise por TXRF	39
2.6 Quimiometria	40
2.6.1 Planejamento de experimentos	41
2.6.2 Análise de componentes principais (PCA)	42
2.6.3 Fusão de dados (<i>Data fusion</i>)	46
3 AVALIAÇÃO DE AUTENTICIDADE DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE <i>HYPERICUM PERFORATUM L.</i> (ERVA DE SÃO JOÃO)	48
3.1 Introdução.....	48
3.1.1 Determinação de componentes orgânicos e inorgânicos em <i>Hypericum perforatum</i>	50
3.1.2 <i>Ageratum conyzoides L.</i>	52
3.2 Objetivos	53
3.3 Metodologia	53
3.3.1 Amostras	53
3.3.2 Espectrometria de massas com ionização por paper spray (PS-MS).....	56
3.3.2.1 Reagentes e instrumentação	56
3.3.2.2 Procedimentos de extração	57
3.3.3 Fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF)	58
3.3.3.1 Reagentes e instrumentação	58

3.3.3.2 Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas e análise por TXRF	59
3.3.3.3 Preparo das suspensões para análise direta por TXRF.....	60
3.3.3.4 Validação do método.....	61
3.3.4 Tratamento dos dados	62
3.4 Resultados e discussão.....	63
3.4.1 Análises por PS-MS.....	63
3.4.1.1 Procedimentos de extração	65
3.4.1.2 Extração sólido-líquido	66
3.4.1.3 Espectros PS-MS de amostras de Erva de São João	66
3.4.1.4 Análise de componentes principais (PCA).....	73
3.4.2 Análises por TXRF	76
3.4.2.1 Planejamento fatorial fracionário para otimização das análises por TXRF	77
3.4.2.2 Validação do método.....	78
3.4.2.3 Análises das amostras de Erva de São João	80
3.4.2.4 Análise de componentes principais (PCA).....	83
3.4.3 Fusão de dados	88
3.5 Conclusões parciais	92
4 AVALIAÇÃO DE AUTENTICIDADE DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE LYCIUM BARBARUM (GOJI BERRY).....	93
4.1 Introdução.....	93
4.1.1 Análise e identificação dos compostos de Goji berry.....	95
4.1.1.1 Extração dos compostos.....	97
4.2 Objetivos	98
4.3 Metodologia	98
4.3.1 Amostras	98
4.3.2 Espectrometria de massas com ionização por <i>paper spray</i> (PS-MS).....	101
4.3.2.1 Reagentes e instrumentação	101
4.3.2.2. Procedimento de extração	101
4.3.2.3 Tratamento dos dados	102
4.4 Resultados e discussão.....	103
4.4.1 Processamento das amostras	103
4.4.2 Análise das amostras.....	105

4.4.3 Análise de componentes principais (PCA)	110
4.5 Conclusões parciais	114
5 CONCLUSÕES	115
REFERÊNCIAS	117

1 INTRODUÇÃO

Tem crescido cada vez mais a preferência da população pelo consumo de medicamentos e suplementos naturais ao invés de medicamentos sintéticos. Isso ocorre, principalmente, associado à ideia de que os produtos naturais não têm efeitos colaterais, mas também por eles serem mais acessíveis e de menor custo quando comparados aos medicamentos sintéticos correspondentes, e por grande parte deles serem adquiridos sem prescrição médica no Brasil. Porém, há diversos problemas em relação a isso, como a grande ocorrência de automedicação com esses produtos (muitas vezes com consumo excessivo), sem acompanhamento médico, podendo acarretar prejuízos à saúde, como intoxicação e efeitos adversos. E ainda, como há uma grande falta de fiscalização e controle de qualidade, não só no Brasil, mas em diversos países, são relatados inúmeros casos de falsificação e adulteração desses medicamentos naturais, seja pela adição de substâncias que não constam nos rótulos, sendo essas muitas vezes sem valor terapêutico, ou até mesmo, prejudiciais à saúde, seja pela contaminação por metais pesados ou apenas pela ausência do princípio ativo.

A espécie *Hypericum perforatum* L., conhecida popularmente como Erva de São João, é uma planta comumente utilizada para tratamento de depressão e transtornos psiquiátricos, sendo uma das plantas medicinais mais consumidas no mundo (Mauri e Pietta, 2000). Suas propriedades são atribuídas principalmente à metabólitos como hipericina, pseudo-hipericina e hiperforina, além de flavonoides e ácidos fenólicos (Koyu e Haznedaroglu, 2015). Apesar de ser nativa da Europa e Ásia, a *Hypericum perforatum* também pode ser encontrada em diversos outros países, incluindo os da América Latina. Portanto, é possível que haja diferenças em sua composição pela diferença de distribuição geográfica, devido a fatores como clima e composição do solo, o que resulta em diferentes teores dos metabólitos e nutrientes inorgânicos dependendo da região de cultivo. Além disso, como mencionado anteriormente, assim como nos demais produtos naturais, é possível a ocorrência de falsificação dos produtos comerciais de *Hypericum perforatum* pela falta de fiscalização e controle de qualidade (Scotti et al., 2019; Hoban et al., 2018).

Os frutos de Goji berry (*Lycium barbarum*) apresentam elevado valor nutricional por conterem grande quantidade de nutrientes, como vitaminas, minerais, fibras e proteínas, sendo muito benéficos à saúde e capazes de prevenir doenças. Por isso, eles estão sendo cada vez mais utilizados e consumidos em todo o mundo, seja como fruta, matéria-prima de alimentos, chá ou suplemento alimentar (Liu *et al.*, 2021). De acordo com estudos e trabalhos publicados, autores alegam que os frutos de Goji berry podem ser utilizados para melhoria do sistema imunológico, prevenção de câncer, como importante fonte de vitamina C, além de ter efeitos positivos no metabolismo, retardando envelhecimento, evitando fadiga, contribuindo para o controle da glicose em diabéticos e apresentar propriedades antioxidantes (Wu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2022). A bioatividade dos frutos de *L. barbarum* está intimamente associada aos seus componentes fitoquímicos, como polissacarídeos, polifenóis, carotenoides, ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos graxos, aminoácidos, espermidinas, minerais e vitaminas (Wu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2022; Ahad *et al.*, 2020; Inbaraj *et al.*, 2008). Devido à grande procura por produtos à base de Goji berry, seu valor comercial pode ser muito elevado, o que chama atenção para possíveis casos de adulteração desses produtos.

Uma abordagem que pode ser extremamente útil e importante no estudo desses produtos naturais é a determinação e avaliação dos metabólitos secundários dos vegetais, que são compostos produzidos em plantas com objetivo principal de proteção a estresses abióticos e bióticos, além de possuírem valores nutricionais e farmacológicos importantes na nutrição humana (Gottlieb e Borin, 2001). Nesse contexto, diversos estudos podem ser realizados com a finalidade de desenvolver metodologias para análises qualitativas e/ou quantitativas de espécies vegetais, incluindo etapas de extração e uso de moderna instrumentação analítica (Funari *et al.*, 2013).

Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar amostras de produtos naturais (Erva de São João e Goji Berry) vendidos como fitoterápicos ou suplementos, avaliando a autenticidade e um dos aspectos da qualidade – presença de metais tóxicos – desses produtos. Em uma das aplicações, foram analisadas 43 amostras de *Hypericum perforatum* L. adquiridas no comércio local de diversas cidades brasileiras, assim como em outros países, por espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS) e fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF). Utilizando PS-MS

procurou-se determinar os principais metabólitos secundários presentes nos vegetais, avaliando a autenticidade dos produtos. Através de TXRF, foram avaliados os elementos inorgânicos presentes nas amostras. Utilizou-se também ferramentas quimiométricas, como análise de componentes principais (PCA) e fusão de dados, com o intuito de identificar grupos de amostras que possuem composição química similar. Em outra aplicação, foram analisadas 28 amostras comerciais de Goji berry por PS-MS. Da mesma forma, através de seus espectros de massas, buscou-se determinar os metabólitos característicos da *Lycium barbarum* para avaliar a composição dos produtos e possíveis adulterantes, e através de um modelo PCA foi avaliada a dispersão das amostras com relação às suas composições químicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Consumo de produtos naturais

Nos últimos anos, houve um crescimento na utilização de plantas utilizadas com propósitos terapêuticos, como suplementos alimentares e fitoterápicos, podendo ser utilizadas as suas diferentes partes (folhas, frutos, caules e raízes), assim como formulações derivadas (cápsulas, comprimidos ou misturas para chás) (Calahan *et al.*, 2016). De acordo com Shaheen, em seu livro publicado em 2019, foi estimado que 80% da população mundial use plantas medicinais com frequência ou tenha usado em determinados momentos da vida; enquanto nos países em desenvolvimento, essas taxas podem chegar até a 95%. Além disso, estima-se também que a venda de medicamentos naturais cresce em média 6,4% ao ano em todo o mundo (Shaheen *et al.*, 2019).

A alta procura por medicamentos naturais pode ser motivada pela crescente insatisfação do consumidor com os medicamentos sintéticos, já que muitos deles possuem efeitos colaterais, enquanto a maioria da população acredita que os medicamentos naturais não apresentem tais efeitos. Além disso, há, na maioria dos países, uma maior facilidade em adquirir produtos naturais, e com preços mais acessíveis, comparados aos medicamentos sintéticos. De fato, muitas plantas podem conter grande quantidade de moléculas terapêuticas bioativas e o benefício para a saúde é evidente em muitos estudos científicos, porém também há estudos que revelam que o consumo dessas plantas pode acarretar efeitos colaterais diversos (Calahan *et al.*, 2016; Sarker, 2014).

Somado à possibilidade de efeitos colaterais, os medicamentos naturais são normalmente utilizados por automedicação, ou seja, sem prescrição médica. Essa situação é preocupante pelo fato de que a utilização inadequada de qualquer produto, mesmo com baixa toxicidade, pode acarretar sérios problemas de saúde, principalmente se existirem fatores de risco, como contraindicação por problemas de saúde, ou possíveis problemas com o uso concomitante com outros medicamentos (Silveira, Bandeira e Arrais, 2008).

Um problema ainda mais preocupante, que está chamando a atenção dos órgãos de vigilância e de saúde do mundo todo, são os casos de adulterações dos produtos naturais, principalmente em formulações que já são vendidas processadas.

De acordo com Shaheen, os casos mais comuns de adulterações que podem ocorrer são a troca de princípios ativos nas formulações, ou mesmo a ausência desses, e a adição intencional de outras substâncias. Além disso, é possível ocorrer contaminação por metais pesados nos produtos devido a deficiência no controle de qualidade (Shaheen *et al.*, 2019).

Devido aos casos de adulteração, diversos países têm aumentado a vigilância dos medicamentos naturais. Apesar de haver políticas públicas e investimentos há anos, incentivados pela OMS desde 1978, a atenção se voltou para esse assunto apenas recentemente. Nos Estados Unidos, por exemplo, diversos profissionais, como toxicologistas, farmacêuticos e químicos, têm se empenhado em estudar os efeitos colaterais de diversas plantas medicinais. A organização *American Herbal Pharmacopoeia* (AHP) possui mais de 2000 monografias publicadas em seu site com informações a respeito de diversos produtos naturais, seus riscos e benefícios conhecidos. Na Alemanha, devido à intensa vigilância dos produtos naturais, mais de 400 fitoterápicos já foram submetidos a análises, sendo que muitos deles foram retirados do mercado devido à elevada toxicidade e risco à saúde. Outros países, como Itália e Austrália, também têm se destacado atualmente pela vigilância e estudos desses medicamentos naturais (Silveira, Bandeira e Arrais, 2008).

No Brasil, nas últimas décadas algumas normativas foram editadas pela ANVISA, estabelecendo parâmetros para segurança, eficácia e qualidade dos produtos, além de registro e comercialização em todo o país (Henrique *et al.*, 2014). O Ministério da Saúde junto à ANVISA definiu alguns termos e normas referentes às plantas utilizadas com propósitos terapêuticos. De acordo com essas definições, plantas medicinais são conceituadas como espécies vegetais, cultivadas ou não, utilizadas com propósitos terapêuticos. Há uma definição também para drogas vegetais notificadas, que são aquelas que têm origem nas plantas medicinais ou suas partes, e passam por processos de colheita e secagem, podendo ser íntegras, trituradas ou pulverizadas. Essas drogas vegetais só podem ser utilizadas durante um curto período de tempo, por via oral ou tópica, devendo ser disponibilizadas apenas na forma de plantas secas, e comercializadas em farmácias e drogarias. Porém, elas não são consideradas medicamentos e, por isso, são isentas de prescrição médica. A ANVISA também define medicamentos fitoterápicos como aqueles obtidos a partir de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em

evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. Os fitoterápicos, assim como suas matérias-primas, passam por uma série de regulamentações e controle de qualidade no Brasil, e só podem ser comercializados após aprovação da ANVISA. Nessa categoria entram os comprimidos, cápsulas e demais formulações farmacêuticas, e eles são considerados medicamentos, portanto, a maioria desses produtos necessita de prescrição médica (Carvalho *et al.*, 2012). Para todos esses produtos fitoterápicos serem registrados e comercializados, é necessário a apresentação, por parte da empresa, de relatórios de estudo de estabilidade, produção e controle de qualidade, além de segurança e eficácia (Ministério da Saúde, 2014). Já os suplementos alimentares, de acordo com a ANVISA, são destinados a fornecer nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos em complemento à alimentação. Essa categoria foi criada no Brasil em 2018 e, apesar de não serem considerados medicamentos, os suplementos também devem passar por uma série de procedimentos de segurança e controle de qualidade para que sejam comercializados (ANVISA, 2020).

Porém, apesar de haver regulamentação no Brasil, continuam presentes no mercado produtos que não atendem aos requisitos necessários, pois não há confiabilidade com relação à autenticidade e ao controle de qualidade (Henrique *et al.*, 2014). Muitos dos produtos são comercializados sem a fiscalização necessária, já que não possuem nem informações nos rótulos, e não necessitam prescrição médica.

Além das normativas que envolvem saúde pública, também há leis que tipificam algumas dessas ações como crimes. De acordo com a Lei nº 9.677 de 02/07/1998, chamada de Lei dos Crimes Contra a Saúde Pública, é ilícito, de acordo com o Art. 273, “Falsificar, corromper, adulterar ou alterar produto destinado a fins terapêuticos ou medicinais”, com pena de reclusão, de 10 a 15 anos, e multa. Ainda de acordo com esse artigo, estão sujeitos à mesma pena quem importa, vende ou, de qualquer forma, distribui ou entrega a consumo esses produtos falsificados ou adulterados. De acordo com o Art. 275 dessa mesma Lei, é crime “Inculcar, em invólucro ou recipiente de produtos alimentícios, terapêuticos ou medicinais, a existência de substância que não se encontra em seu conteúdo ou que nele existe em quantidade menor que a mencionada”, com pena de reclusão de 1 a 5 anos, e multa. (BRASIL, 1998)

2.2 Autenticidade de plantas medicinais

De maneira geral, as plantas utilizadas com propósitos terapêuticos podem apresentar problemas de autenticidade, tanto por adulterações quanto por falta de conhecimento de quem comercializa esses produtos. Um problema bastante comum é a troca por espécies semelhantes, tanto na aparência dos vegetais quanto pelo fato de que plantas diferentes podem ter o mesmo nome popular. Normalmente, isso ocorre de forma não intencional, e é causada pelo desconhecimento do vendedor ou do consumidor. Pode ocorrer também a comercialização de produtos contaminados por metais tóxicos ou pesticidas, uma vez que o controle de qualidade destes produtos não é tão rigoroso. As adulterações incluem a ausência ou a menor concentração de princípio ativo do que se espera ter no produto, além da adição intencional de substâncias, sendo muito comum a adição de fármacos sintéticos. Tais adulterações podem causar diversos problemas aos consumidores, como efeitos colaterais, intoxicação e problemas relacionados a interação desses produtos com outros medicamentos no organismo (Shaheen *et al.*, 2019).

Alguns casos de adulteração desses medicamentos e os efeitos colaterais causados já foram relatados na literatura. Um desses casos ocorreu em Hong Kong, no qual três pessoas foram hospitalizadas com problemas hepáticos após terem tomado um chá natural para fins de emagrecimento. Porém, nos chás foram encontrados fármacos análogos à fenfluramina e à sibutramina, o que ocasionou insuficiência hepática nos três consumidores, e a necessidade de transplante de fígado em um deles. Um exemplo de caso envolvendo a intoxicação por metais pesados ocorreu com um britânico de 35 anos que consumiu um fitoterápico indiano e, posteriormente, apresentou sintomas de problemas motores e atrofia muscular. Com isso, foi descoberto que ele foi intoxicado por arsênio que estava presente nesse fitoterápico (Calahan *et al.*, 2016). No Brasil, um estudo revelou que entre 2016 e 2017 foram identificados mais de 2000 casos de intoxicação por plantas (de Melo *et al.*, 2021). Mais recentemente, diversos noticiários apresentaram casos de pessoas com sérios problemas hepáticos, e até mesmo óbitos, devido ao consumo excessivo de produtos naturais (Oliveira e Costa, 2022).

Além desses, estudos de diversos outros países revelaram problemas de contaminação ou adulteração de produtos naturais e a clara necessidade de um maior

controle de qualidade desses produtos (Sarker, 2014; Posadzki, Watson e Ernst, 2013; Xu et al., 2019). Com esse propósito, vários estudos foram realizados utilizando diversas técnicas analíticas, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia em camada delgada (TLC) ou cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC), espectrometria de absorção molecular no infravermelho (IR), cromatografia gasosa (GC) e eletroforese capilar (CE), além de técnicas de identificação molecular e espectrometria de massa (MS) em conjunto com ferramentas quimiométricas (Yao et al., 2018). Nesta tese, foram utilizadas as técnicas de espectrometria de massas e espectrometria de fluorescência de raios X juntamente com quimiometria.

2.3 Estudo de metabólitos

Uma abordagem interessante no estudo de vegetais é a análise de seus metabólitos, que pode ser realizada pela análise quantitativa de determinados metabólitos previamente selecionados ou pela análise abrangente de todos os analitos presentes em um sistema biológico. Os metabólitos são compostos de baixo peso molecular (<1500 Da) que participam ou interferem em processos bioquímicos, atuando como substratos, produtos finais ou intermediários, ou seja, os metabólitos podem ser formados, degradados ou transformados a partir das reações químicas que acontecem nos organismos, sendo esse conjunto de reações denominado metabolismo. Os metabólitos podem ser divididos em dois grupos, os metabólitos primários e os secundários. Os metabólitos primários incluem os lipídeos, nucleotídeos e glicídios, que são moléculas essenciais aos organismos vivos com determinadas funções vitais. Já os metabólitos secundários são produtos de reações biossintéticas dos metabólitos primários, apresentando normalmente importantes atividades biológicas. Eles estão relacionados à interação dos organismos com o meio ambiente (Gottlieb e Borin, 2001).

As análises metabólicas de plantas são importantes pelas alterações que elas sofrem, já que as plantas são seres vivos que sofrem grande influência de condições do ambiente como luz, umidade, temperatura, suprimento nutricional, entre outras. Assim, o sistema vegetal se comporta de acordo com a resposta do ambiente, alterando o perfil de metabólitos, o que depende também do estágio do crescimento

da planta (Weckwerth, 2003). A complexidade se dá também devido ao grande número de metabólitos existentes – em 2003 estimava-se que no reino vegetal o número de metabólitos já fosse superior a 200 mil (Weckwerth, 2003).

Portanto, para uma análise adequada, a escolha do preparo de amostras e das técnicas de análise são etapas muito importantes nesse tipo de abordagem. Com relação ao preparo de amostras, é comum o emprego de técnicas de extração, em que normalmente são utilizadas misturas de água/álcool juntamente com sonicação ou micro-ondas, podendo também ser utilizadas outras técnicas, como extração por fluido supercrítico e pervaporação. Qualquer alteração quanto à temperatura, pressão e composição dos solventes pode causar grandes mudanças na qualidade dos extratos e até a degradação dos metabólitos. O preparo de amostras empregado deve ser compatível com a técnica analítica, sendo as mais utilizadas para essa finalidade: eletroforese capilar, espectrometria de massas, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografias líquida ou gasosa acopladas a diferentes detectores (Canuto *et al.*, 2018).

Scognamiglio *et al.* (2019) realizaram um estudo metabolômico por RMN de plantas mediterrâneas, pois elas são caracterizadas por apresentarem um alto teor de metabólitos secundários importantes como reguladores de crescimento, podendo ser úteis para o desenvolvimento de novos herbicidas ecológicos. Para isso, cinco espécies foram utilizadas como doadoras (*Pistacia lentiscus*, *Bellis sylvestris*, *Phleum subulatum*, *Petrohrhagia saxifraga* e *Melilotus neapolitana*) e três como espécies receptoras (*Triticum durum*, *Triticum ovatum* e *Avena fatua*). Para a extração das plantas doadoras foi utilizada uma mistura metanol/água (1:1) juntamente com sonicação por 40 minutos. Posteriormente, tais extratos foram utilizados para tratar as espécies receptoras. Como resultado, os autores identificaram duas das espécies doadoras (*Melilotus neapolitana* e *Bellis sylvestris*) como fitotóxicas, pois elas afetam um conjunto específico de metabólitos (como açúcares e aminoácidos) e, portanto, vias metabólicas cruciais para o desenvolvimento das plantas (Scognamiglio *et al.*, 2019).

Abdelhafez *et al.* (2019) avaliaram o perfil de metabólitos de três espécies de hibisco (*Hibiscus mutabilis* L., *H. schizopetalus* e *Malvaviscus arboreus* Cav.) além de seus potenciais antioxidante e anti-infeccioso. Os extratos foram obtidos com 95% de etanol e concentrados sob vácuo até *secura*. Posteriormente, parte do extrato foi

suspenso em água destilada e extraído sucessivamente com éter de petróleo, diclorometano e acetato de etila. Em seguida, os extratos foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução com ionização por *eletrospray* (LC-HR-ESI-MS). Os resultados obtidos foram comparados por PCA e análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA). A partir das análises, foram identificados 17 compostos, principalmente das classes dos flavonoides e fenóis. Além disso, em alguns extratos foi comprovado potencial antioxidante e anti-tripanosômico. Tais resultados podem ser úteis para fins quimiotaxonômicos e de autenticação, podendo também expandir a base para sua futura exploração fitoquímica e aplicações relacionadas a alimentos.

2.4 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que permite a identificação e quantificação de compostos orgânicos ou inorgânicos através da elucidação de suas propriedades químicas e estruturais, com características como altas seletividade e sensibilidade. Ela possui aplicações em diversas áreas da química e bioquímica, tais como controle de alimentos, análises forenses, monitoramento de processos e diagnósticos clínicos. A técnica consiste na ionização de átomos ou moléculas que são separados eletromagneticamente por meio de suas diferentes razões massa/carga (m/z) (Hoffman e Stroobant, 2007).

Um espectrômetro de massas é composto basicamente por cinco partes (Figura 1), sendo a primeira delas a entrada para introdução de amostras, que pode ser empregada juntamente com outras técnicas, como cromatografia líquida ou gasosa, ou utilizada por injeção direta das amostras; em seguida, há uma fonte de ionização, responsável por conferir carga aos analitos, podendo a formação dos íons ocorrer a partir da aplicação de uma alta energia, como por exemplo na ionização por impacto de elétrons, ou através de reações ácido/base. Os íons gerados são posteriormente acelerados por campos elétricos e/ou magnéticos até chegarem aos analisadores, responsáveis por separá-los e selecioná-los de acordo com suas diferentes razões m/z e/ou pelas fragmentações dos analitos de interesse. Por fim, os íons são enviados ao detector, responsável por fazer a sua “contagem”, medindo suas abundâncias por meio da conversão em sinais elétricos. Esses sinais são, então,

processados por um sistema de aquisição de dados, interpretando a informação produzida pelo detector para elaboração de espectros de massas (Hoffman e Stroobant, 2007; Shen et al., 2013).

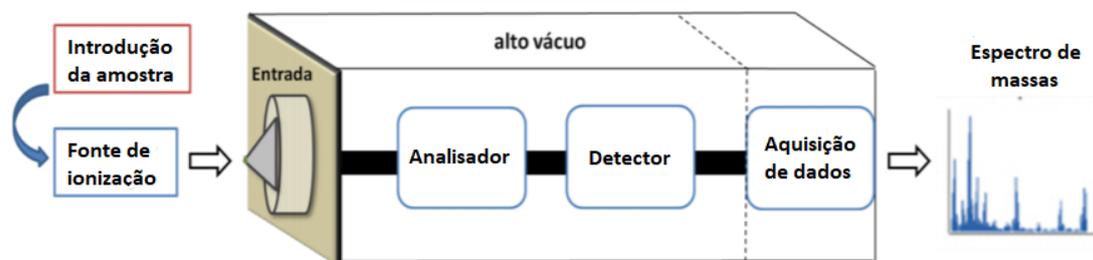


Figura 1. Desenho esquemático de um espectrômetro de massas.
(Paula, de, 2018).

2.4.1 Analisadores

Um analisador de massas define a resolução do equipamento como baixa ou alta, de acordo com a capacidade de produzir sinais distintos para íons com pequenas diferenças entre suas relações massa/carga. Dentre os diversos tipos de analisadores existentes, podem ser destacados os analisadores quadrupolos (Q), por aprisionamento de íons (*Ion Trap* - IT), Orbitrap (OT) e por tempo de voo (*time of flight* – TOF). Na espectrometria de massas sequencial (MS/MS) pode haver a combinação em série de vários analisadores, como por exemplo, o triplo quadrupolo (QqQ) (Hoffman e Stroobant, 2007). Nesta tese foi utilizado espectrômetro de massas com analisador do tipo *Ion Trap*, que pode ser compreendido comparando-o ao analisador quadrupolo.

O analisador quadrupolo utiliza a estabilidade da trajetória em campos elétricos oscilantes para separar os íons de acordo com suas razões m/z . O dispositivo é formado por quatro barras (eletrodos) paralelas na direção dos feixes dos íons. A essas barras são aplicadas voltagens de corrente contínua e uma radiofrequência, o que gera um campo eletrostático oscilante, permitindo que os íons sejam seletivamente estabilizados ou desestabilizados de acordo com as suas razões m/z . Dessa forma, íons de diferentes valores m/z chegam ao detector, podendo por fim, serem diferenciados (Hoffman e Stroobant, 2007).

O analisador do tipo IT possui um princípio similar ao quadrupolo, porém ao invés dos íons descreverem uma trajetória através do ambiente quadrupolar, eles são aprisionados nele. Esses íons, após adentrarem no dispositivo, adquirem movimentos de precessão que são sucessivamente cessados, ocorrendo, posteriormente, a detecção de acordo com suas razões m/z . Esse dispositivo é amplamente utilizado devido às suas vantagens, tais como alta sensibilidade, devido à capacidade de pré-concentrar os íons antes de serem enviados ao detector, e sua capacidade de identificar e quantificar componentes de alto e baixo peso molecular, até mesmo em misturas complexas (Hoffman e Stroobant, 2007).

2.4.2 Técnicas de ionização

Dentre os diversos tipos de fontes de ionização, as pioneiras foram a ionização por “impacto eletrônico” (*electron ionization* - EI) e a ionização química (*chemical ionization* - CI), que são técnicas clássicas realizadas sob alto vácuo e requerem a utilização de elevadas energias de ionização e temperaturas, inviabilizando a análise de alguns analitos, como, por exemplo, biomoléculas de elevada massa molecular. A partir do final da década de 80, foram desenvolvidos diferentes técnicas de ionização capazes de produzir íons à pressão atmosférica, possibilitando análises diretas e em tempo real de moléculas maiores e não voláteis, como a ionização por *electrospray* (ESI) e suas variantes, podendo ser destacadas a ionização por dessorção *electrospray* (DESI) e a ionização por *paper spray* (PS-MS) (Hoffman e Stroobant, 2007; Wang et al., 2010).

Esta tese baseou-se na utilização da técnica de ionização por *paper spray* (PS-MS), cujo mecanismo de ionização é semelhante ao ESI. Desse modo, tal mecanismo será descrito a seguir para uma melhor compreensão da técnica PS-MS, a que será descrita posteriormente.

A ionização por *electrospray* (ESI) (Figura 2), proposta por John Fenn *et al.* em 1989, permite que íons sejam transferidos de espécies em soluções aquosas para a fase gasosa. Nessa técnica, ocorre a passagem de um líquido através de um capilar de metal extremamente fino, onde é empregada uma diferença de potencial ocasionando a formação de microgotas altamente carregadas e gerando o chamado cone de Taylor na interface líquido/ar. Com a evaporação do solvente, há uma

diminuição do tamanho dessas gotas, causando um aumento da repulsão eletrostática entre as cargas das suas superfícies, até a ocorrência do fenômeno de “explosão coulômbica”, que favorece a liberação dos íons, formando-se, assim, um fino *spray* de partículas carregadas (Fenn et al., 1989; Crotti et al., 2006).

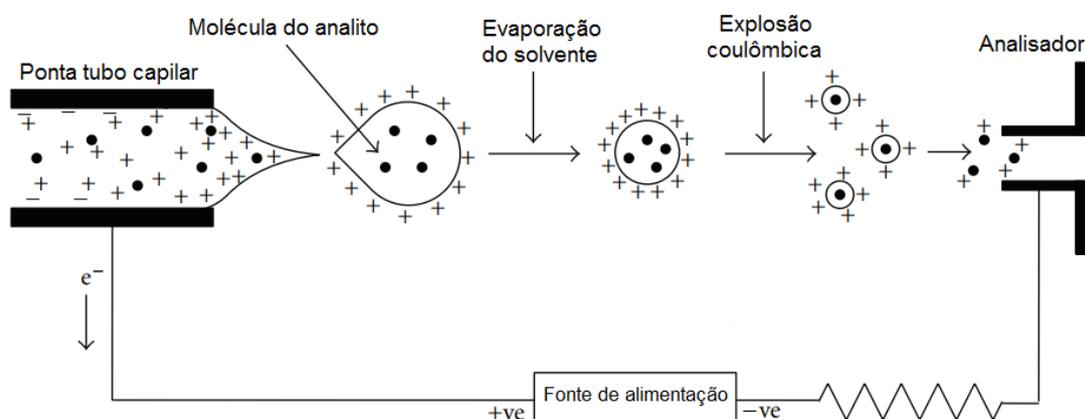


Figura 2. Representação esquemática da ionização *electrospray* (ESI).
(Banerjee e Mazumdar, 2011).

2.4.2.1 Ionização por paper spray (PS-MS)

A ionização por *paper spray* foi descrita por Cooks *et al.* em 2010 e desde então tem recebido bastante atenção devido às suas vantagens, tais como simplicidade, baixo custo, eficiência, rapidez, e baixo consumo de amostras e de solventes, além de possibilitar análises qualitativas e quantitativas de misturas complexas com o mínimo preparo de amostras (Wang *et al.*, 2010).

Esta técnica consiste na aplicação de uma pequena quantidade de amostra (cerca de 1 a 10 μL) a um substrato poroso, normalmente utilizando-se papel cromatográfico cortado na forma de um triângulo equilátero, o qual é posicionado na entrada do espectrômetro de massas. Em seguida, um pequeno volume de solvente (10 a 50 μL) é adicionado ao papel, com o intuito de favorecer o processo de ionização, e um potencial é aplicado na sua base a fim de se obter um fino *spray* de gotículas de solvente contendo os analitos ionizados. De modo semelhante ao ESI, a medida em que o solvente evapora ocorre a liberação dos íons dessolvatados que serão analisados pelo espectrômetro de massas. Um esquema da montagem do PS-MS está representado na Figura 3.

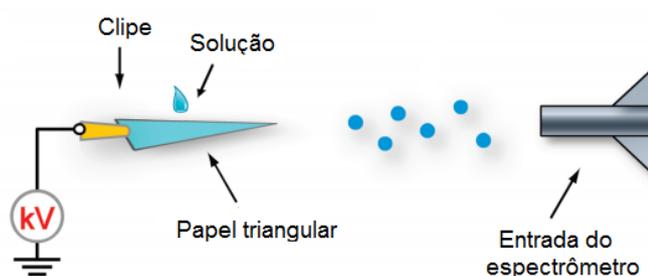


Figura 3. Desenho esquemático da montagem do sistema PS-MS. (Liu *et al.*, 2010).

Alguns autores desenvolveram trabalhos a fim de tentar compreender o mecanismo da ionização por *paper spray* e puderam avaliar a influência de algumas variáveis na formação do *spray*, tais como o tipo de papel e seu posicionamento em frente à entrada do espectrômetro, a angulação da ponta do papel e o tipo de solvente mais adequado para a formação das gotas.

Espy *et al.* (2012) realizaram um estudo com o objetivo de entender o mecanismo do *paper spray* e puderam observar a formação de diversos *sprays* na ponta do papel (cone de Taylor), o que é responsável pela grande eficiência de ionização (Figura 4). Os autores também notaram que alguns fatores influenciavam a ionização, como a composição e fluxo do solvente, a tensão aplicada no papel e a distância do papel até a entrada do espectrômetro. À medida que a composição do solvente se tornava mais viscosa (aumento do teor de água e diminuição do teor de metanol) ocorria a diminuição do *spray*.

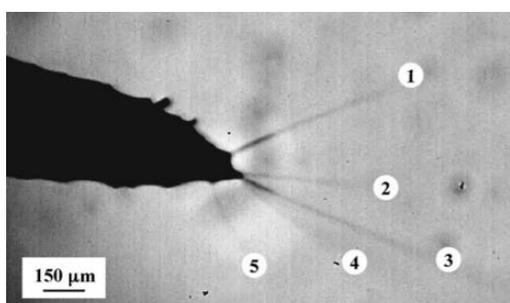


Figura 4. Imagem da formação dos múltiplos *sprays*. (Espy *et al.*, 2012).

Yang *et al.* (2012) avaliaram a geometria do papel para uma maior eficiência na formação do *spray* (Figura 5). A primeira observação que os autores fizeram é que

o *spray* só se forma em pontas afiadas na borda do papel. Portanto, eles avaliaram diferentes ângulos na ponta do papel (30°, 60°, 90°, 120° e 150°), concluindo que, em geral, o diâmetro do *spray* diminui com o aumento do ângulo, ou seja, um menor número de partículas chega até o espectrômetro de massas, reduzindo a intensidade do sinal analítico. Além disso, os maiores ângulos também produziram menores correntes elétricas. Portanto, os autores concluíram que menores ângulos são capazes de gerar *sprays* mais estáveis e, portanto, sinais analíticos mais intensos.

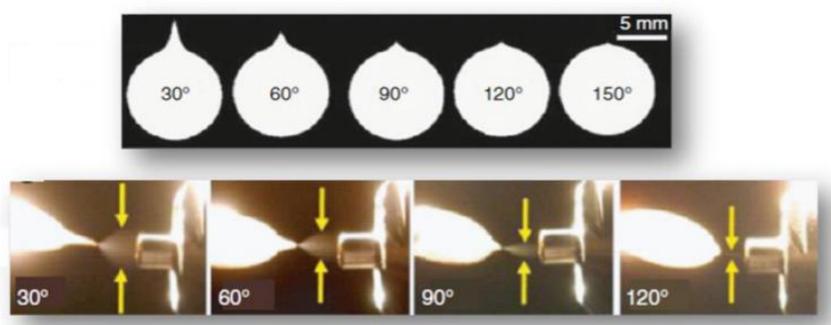


Figura 5. Diferentes ângulos do papel para o PS-MS (papeis cortados em forma circular para garantir que o spray seja formado apenas nas pontas) e formação dos sprays em cada angulação. (Yang et al., 2012).

Liu *et al.* (2010) avaliaram a influência da posição do papel em frente ao espectrômetro de massas. Para isso, um papel contendo uma solução padrão de cocaína/água foi posicionado, podendo ser movido 3 cm na direção x e 8 cm na direção y. Foram realizadas análises de acordo com possíveis posicionamentos do papel, com incremento de 2 mm em cada uma das direções (Figura 6). Os resultados revelaram que as maiores intensidades do sinal referente à cocaína foram obtidas pelo posicionamento do papel em uma área de cerca de 5 x 10 mm (plano x-y).

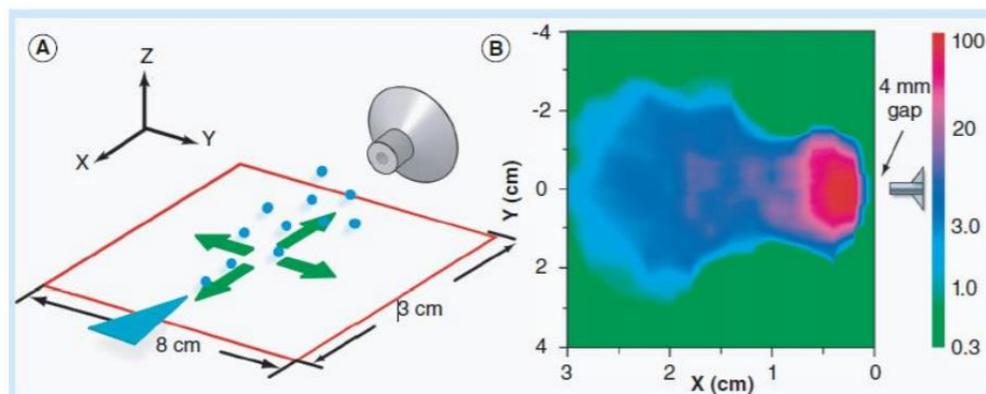


Figura 6. A) Posicionamento do papel em frente ao espectrômetro de massas. B) Intensidade do sinal referente à cocaína de acordo com o posicionamento do papel. (Liu *et al.*, 2010).

Com relação às aplicações, a espectrometria de massas com ionização por *paper spray* tem sido amplamente utilizada nos últimos anos em análises de matrizes complexas. Na literatura são encontrados diversos estudos referentes a análises qualitativas e quantitativas de substâncias em matrizes biológicas (Wang *et al.*, 2013), discriminação de microrganismos (Hamid *et al.*, 2014), análise de alimentos (Sneha, Dulay e Zare, 2017), monitoramento de reações (Resende *et al.*, 2017), e diversas aplicações forenses (Teodoro *et al.*, 2017; Teunissen *et al.*, 2017). Após o trabalho de Deng e Yang (2013), teve início também a utilização da técnica PS-MS na obtenção de *fingerprints*, sendo possível sua utilização para identificação e diferenciação de amostras.

Silva (2014) desenvolveu um trabalho de análises de amostras de ginseng, a fim de diferenciá-las com relação às três espécies existentes (coreano, americano e brasileiro) por PS-MS, além da quantificação de adulterações utilizando calibração multivariada. Dentre as amostras estudadas, o autor identificou uma falsificação, de uma amostra adquirida como ginseng coreano, mas que apresentou sinais referentes ao ginseng brasileiro. Por fim, foi utilizado o método de calibração multivariada PLS para quantificação dessa adulteração. Com relação às demais amostras, foi possível diferenciá-las de acordo com suas espécies.

Silva *et al.* (2019) analisaram amostras de cagaita, uma fruta do cerrado brasileiro, por PS-MS, e puderam obter uma impressão digital da fruta, identificando diversos compostos como ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos e compostos fenólicos. Pela análise de componentes principais (PCA) foi possível observar a

discriminação dos constituintes principais dos vegetais, como os açúcares e compostos fenólicos.

2.5 Espectrometria de Fluorescência de Raios X (XRF)

A análise por fluorescência de raios X se baseia na medida da intensidade dos raios X característicos emitidos pelos elementos presentes nas amostras, quando excitadas por partículas, como prótons, elétrons, íons, raios X ou gama com energias apropriadas. Quando os elétrons das camadas mais internas dos átomos (como K e L, por exemplo) recebem energia na região dos raios X, ocorre a sua ejeção, criando-se uma vacância que é rapidamente preenchida pelos elétrons das camadas mais próximas. Esse processo resulta em um excesso de energia, que se manifesta na forma de emissão de raios X em comprimentos de ondas característicos de cada elemento, com intensidade proporcional à concentração (Santos *et al.*, 2013).

As primeiras evidências da aplicação de raios X mostraram que para gases com baixa massa atômica, a radiação secundária espalhada possuía o mesmo comprimento de onda do feixe de raios X incidido, e a extensão do espalhamento era proporcional à massa atômica do gás. Quanto mais pesado o átomo, mais partículas carregadas ele contém, e são essas partículas as responsáveis pela dispersão de raios X. Portanto, os elementos com menores números atômicos apresentam baixa sensibilidade analítica e baixo valor de energia de emissão, sendo mais difíceis de serem detectados por XRF. Foi demonstrado também que a radiação proveniente dos elementos mais pesados pode ser de dois tipos, sendo chamadas de série K (emissões mais penetrantes) e série L (menos penetrantes) (Santos *et al.*, 2013).

A XRF é uma técnica multielementar muito versátil, podendo ser aplicada qualitativa ou quantitativamente em diversas amostras, incluindo sólidos e líquidos, com o mínimo preparo de amostras. As técnicas convencionais são a fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF) e por energia dispersiva (EDXRF).

2.5.1 Espectrometria de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF)

A fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF) foi proposta por Yoneda e Horiuchi em 1971, como uma variante da fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF) (Yoneda e Horiuchi, 1971). Ela é uma técnica que vem ganhando cada vez mais destaque, pois, além de possuir as mesmas vantagens das técnicas convencionais de XRF, como a capacidade de análise multielementar, análise quantitativa e qualitativa em diversos tipos de matrizes e a necessidade de mínimo ou nenhum preparo de amostras, a TXRF possui ainda mais vantagens, como a necessidade de quantidades mínimas de amostra (na ordem de μL para líquidos ou mg para sólidos); menores limites de detecção, sendo adequada para análise de elementos em nível de traço; além de que nesta técnica não ocorre efeito de absorção, não sendo necessário, portanto, a correção do efeito de matriz. Porém, como desvantagens, podem ser destacadas a ocorrência de sobreposição dos picos, que pode resultar em valores superestimados ou subestimados para elementos presentes em baixas concentrações, além da impossibilidade de detecção dos elementos que são utilizados na geração dos raios X para excitação da amostra (Klockenkämper e Bohlen, von, 1996; La Calle, de et al., 2013).

A diminuição nos limites de detecção da TXRF com relação à EDXRF se dá principalmente pelos ângulos de incidência e reflexão. Na técnica de EDXRF, o ângulo de incidência e o de fluorescência são de aproximadamente $45^\circ/45^\circ$, enquanto na TXRF os ângulos são de $0,1^\circ/90^\circ$, conforme mostrado na Figura 7. Essa diferença na geometria causa a reflexão total dos raios X, pois o feixe de radiação atinge a amostra com um ângulo muito pequeno, sendo minimizada a interação com o suporte, resultando em uma redução da absorção e do espalhamento da radiação na superfície da amostra. Além disso, a radiação emitida é detectada perpendicularmente muito próxima da amostra (3 a 5 mm), aumentando a eficiência de detecção de raios X, uma vez que a relação sinal analítico/ruído é maximizada (Klockenkämper e Bohlen, von, 2001; La Calle, de et al., 2013).

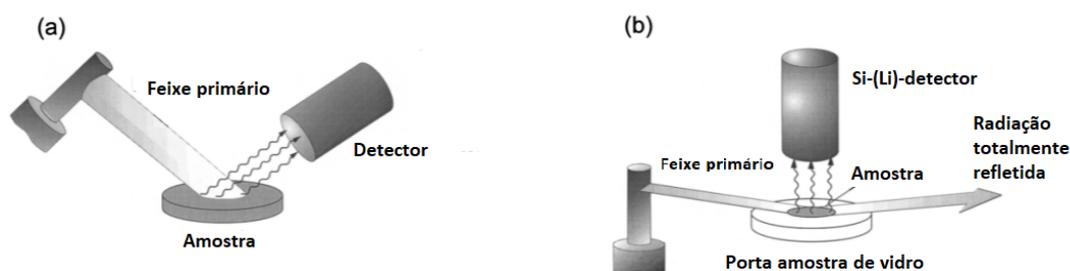


Figura 7. Arranjo simplificado usado na (a) fluorescência de raios X convencional e na (b) TXRF. (Klockenkämper e Bohlen, von, 2001).

2.5.2 Análise quantitativa em TXRF

Para a realização de análises quantitativas é necessária uma simples calibração pela adição de um padrão interno às amostras, permitindo assim a correção de quaisquer erros operacionais e instabilidade do sistema. Para isso, o elemento escolhido como padrão interno não deve estar presente na amostra e não deve apresentar interferência espectral com os elementos a serem quantificados. Sendo assim, os elementos mais utilizados são Ga, Y e Ge (Dhara *et al.*, 2012).

Devido à pequena espessura do filme das amostras sobre o suporte e à alta energia dos raios X normalmente utilizados na excitação, não há ocorrência do efeito de absorção e reforço. Não é necessário, portanto, correção para efeito de matriz.

A equação básica para análise quantitativa é a que relaciona a intensidade dos raios X com a sensibilidade elementar, como mostrado a seguir:

$$I_i = C_i \cdot S_i \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

I_i é a intensidade (cps – contagens por segundo) das linhas $K\alpha$ e $L\alpha$ características emitidas;

C_i é concentração (mg L^{-1} ou mg kg^{-1}) do analito i na solução;

S_i é a sensibilidade elementar do sistema (cps/ppm – mg L^{-1} ou mg kg^{-1}) para o analito i .

Para o padrão interno, a Equação 1 é escrita como:

$$I_p = C_p \cdot S_p \quad (\text{Equação 2})$$

A sensibilidade relativa do elemento indica a relação entre a intensidade do pico do analito e a quantidade na amostra. Geralmente, as sensibilidades relativas podem ser determinadas pelo cálculo de parâmetros fundamentais, como a probabilidade de excitação, a eficiência do detector, entre outros. No entanto, uma maneira simplificada de obter o valor de S'_i é analisando uma solução multielementar de concentrações conhecidas e calculando o fator de sensibilidade que se baseia no pico de cada elemento (Bruker, 2012). O valor da sensibilidade relativa pode ser determinado dividindo a Equação 1 pela Equação 2, a relação de sensibilidade do analito e a sensibilidade do padrão interno, resultando na Equação 3.

$$S'_i = \frac{I_i C_p}{I_p C_i} \quad (\text{Equação 3})$$

Para o cálculo da concentração analítica é suficiente rearranjar a Equação 3, resultando na Equação 4.

$$C_i = \frac{I_i C_p}{I_p S'_i} \quad (\text{Equação 4})$$

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade de um elemento que pode ser discriminada em relação à radiação de fundo (*background*). Em análises por TXRF, os elementos são determinados e quantificados pelos seus picos de fluorescência, portanto o LD é uma relação entre a área do pico e a radiação de fundo subjacente a esse pico. Esta radiação consiste no resultado das interações das radiações espalhadas pela amostra com o detector, e também, das próprias radiações emitidas pela matriz das amostras. Na Figura 8, é mostrado um fragmento de um espectro para o material NIST 1640 (material certificado de água natural), indicando o sinal da radiação de fundo (N_{BG}) para o elemento Rb (BRUKER, 2012).

Um elemento é considerado detectado se a área do pico for 3 vezes maior que a da radiação de fundo e quantificado se a intensidade do pico exceder em 10 vezes essa radiação. Em alguns espectrômetros de TXRF, os valores de LD são

determinados automaticamente pelo *software* do equipamento para cada amostra analisada durante o processamento dos espectros. Isso é importante, pois os valores de LD são dependentes da composição da amostra (que altera o sinal de fundo) e podem variar entre amostras relativamente similares.

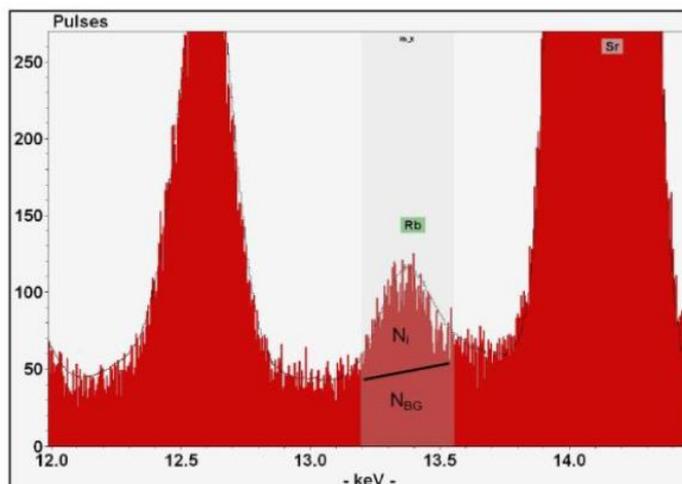


Figura 8. Fragmento de espectro de raios X do material NIST 1640, em destaque a intensidade do sinal do *background* (NBG) e o pico do analito Rb (NI). (BRUKER, 2012).

2.5.3 Preparo de amostras para análise por TXRF

Praticamente todos os tipos de amostras podem ser analisados por TXRF, mas cada um necessita de um preparo de acordo com seu estado físico e matriz. As amostras podem ser analisadas diretamente sem qualquer tratamento, ou podem passar por digestão ou calcinação, no caso de sólidos, assim como extração e pré-concentração no caso de líquidos ou suspensões. No caso das suspensões, as amostras pulverizadas (5–100 mg) normalmente são suspensas em água ou ácido nítrico diluído contendo o padrão interno. Um agente estabilizante, ou surfactante, como o Triton X-100, álcool polivinílico ou polietilenoamino, é utilizado para auxiliar na sua homogeneidade e estabilidade da suspensão. É necessário também a utilização de algum sistema de agitação para a obtenção de suspensões homogêneas e estáveis, podendo ser utilizados vortex, agitação magnética e sonicação. O controle de todos esses fatores, em conjunto com o tamanho das partículas, que deve ser o menor possível, é necessário para se obter suspensões estáveis, que levem a resultados mais reprodutíveis (La Calle, de *et al.*, 2013).

A análise por TXRF necessita de pequenas quantidades de amostras (1–200 μg para sólidos e 1–100 μL para líquidos), que devem ser depositadas como um filme fino sobre um disco (geralmente de 30 mm de diâmetro e 3 mm de espessura), como representado na Figura 9. Amostras muito espessas podem causar danos ao detector, já que este se encontra muito próximo ao porta amostras. Portanto, no caso das suspensões, após homogeneização completa, alguns microlitros são depositados no disco e levados à secagem (La Calle, de *et al.*, 2013).

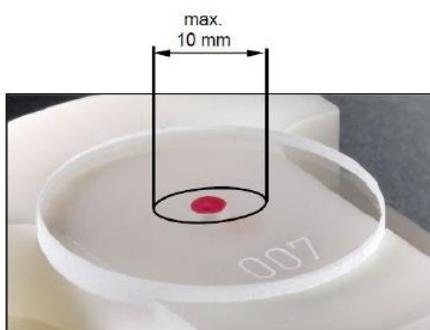


Figura 9. Representação do filme de amostra no disco, para medidas de TXRF. (BRUKER, 2012).

2.6 Quimiometria

Com o avanço das técnicas instrumentais e dos microcomputadores no início da década de 1970, tornaram-se necessários tratamentos de dados mais complexos do ponto de vista estatístico, pois os novos equipamentos possibilitavam a obtenção rápida de respostas multivariadas a partir de medidas analíticas simples. Portanto, com o interesse de extrair maiores informações dos dados, ferramentas que já eram utilizadas em outras áreas da ciência passaram a ser utilizadas na química, dando origem à quimiometria (Bruns e Faigle, 1985).

A quimiometria é definida como a “disciplina química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos, entre outros, empregando uma lógica formal para: 1) definir ou selecionar condições ótimas para procedimentos de análise e experimentos; e 2) extrair o máximo de informação química relevante a partir da análise de dados químicos” (Bruns e Faigle, 1985).

Dentre os métodos utilizados com a finalidade de extrair o máximo de informações, podem ser destacados os de classificação não supervisionada, como a análise de componentes principais (PCA) e a análise hierárquica de agrupamentos

(HCA), os métodos de classificação supervisionados, como a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e o SIMCA (*Soft independent modelling of class analogies*), métodos de calibração multivariada como o PLS e o PCR (*Principal component regression*), assim como os métodos de resolução de curvas, tais como a Resolução de Curvas Multivariada (MCR, *Multivariate Curve Resolution*) e a Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC, *Parallel Factor Analysis*).

Nesta tese, utilizou-se a PCA, que será descrita detalhadamente na seção 2.6.2.

2.6.1 Planejamento de experimentos

O planejamento experimental é uma metodologia baseada em princípios estatísticos utilizada para otimizar processos e experimentos, selecionando as variáveis que causam maior influência, com um número reduzido de ensaios e, conseqüentemente, tempo reduzido de trabalho. Tal metodologia permite não só identificar as variáveis que influenciam positiva ou negativamente o sistema, como também as interações entre elas, permitindo a otimização do sistema sob análise (Button, 2016).

Para realizar um planejamento, inicialmente são feitos experimentos para triagem, com o objetivo de se determinar as variáveis experimentais e as interações entre elas que têm influência significativa sobre as respostas de interesse. As variáveis que não forem selecionadas devem permanecer fixas durante todo o experimento. Para essa finalidade, podem ser utilizados os planejamentos fatoriais completos, fracionários e com ponto central (Teófilo e Ferreira, 2006).

Em um planejamento fatorial, são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse. Se a combinação de k fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos. Por exemplo, se um experimento é realizado com 3 fatores (pH, concentração de uma substância e temperatura) em dois níveis (alto e baixo), o planejamento terá 2^3 experimentos (Teófilo e Ferreira, 2006).

O planejamento fatorial completo necessita de 2^k ensaios para sua execução, portanto, em alguns casos, há a necessidade de se realizar um grande número de experimentos. Considerando, portanto, que os efeitos de ordem alta normalmente são

não significativos, a realização de ensaios para estimar tais efeitos de interação pode ser irrelevante. Portanto, com um número menor de experimentos, é possível obter informações dos efeitos mais importantes, chegando às mesmas conclusões que seriam obtidas de um planejamento fatorial completo. O planejamento que possui tais características é conhecido como fatorial fracionário. Há diversos tipos de planejamentos fatoriais fracionários descritos na literatura, como o 2^{k-b} , em que k é o número de variáveis e b o tamanho da fração. Por exemplo, um planejamento 2^{3-1} é tratado como um modelo 2^2 , reduzindo o número de experimentos (Teófilo e Ferreira, 2006).

Podem ser realizados também planejamentos fatoriais com ponto central, em que um experimento é incluído no centro do planejamento, empregando-se o valor médio dos níveis de todas as variáveis. Tal metodologia é utilizada quando não se deseja a realização de repetições autênticas em todos os ensaios e pode ser empregada para se obter uma boa estimativa dos erros experimentais. É possível, nesse planejamento, avaliar a significância dos efeitos, tanto em planejamentos de triagem (completos ou fracionários) como em metodologias de superfície de resposta (Teófilo e Ferreira, 2006).

Após a realização de experimentos de triagem, os fatores significativos são selecionados, podendo, posteriormente, ser utilizada a metodologia de superfície de resposta para otimização do experimento, com o objetivo de encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores. Nesse sentido, os planejamentos mais utilizados são o composto central (CCD) e o Doehlert (Teófilo e Ferreira, 2006).

2.6.2 Análise de componentes principais (PCA)

A PCA é classificada como um método exploratório, e de classificação não supervisionada, isto é, apenas a natureza dos dados químicos é utilizada para se obter informações sobre o comportamento das amostras. Este método é utilizado para extrair informações projetando os dados em um espaço menor, reduzindo, assim, a dimensionalidade do espaço original do conjunto de dados sem afetar as relações entre as amostras e preservando a maior parte da variância (Ferreira, 2015).

Esse espaço de dimensões reduzidas é construído em torno de novas variáveis, denominadas componentes principais (PC), obtidas a partir de combinações

lineares das variáveis originais. Essas componentes descrevem as tendências relativas dos dados analíticos e são calculadas em ordem decrescente de importância. A primeira componente (PC1) é traçada no sentido de maior variância dos dados, descrevendo a maior quantidade de informação original (Figura 10). A segunda componente, PC2, por sua vez, tem a direção de máxima variância dos dados no subespaço ortogonal à PC1, descrevendo informação residual, ou seja, que não foi explicada pela primeira componente. E da mesma forma, as demais componentes são sempre direcionadas no sentido de maior variância, ortogonalmente às anteriores (Ferreira, 2015).

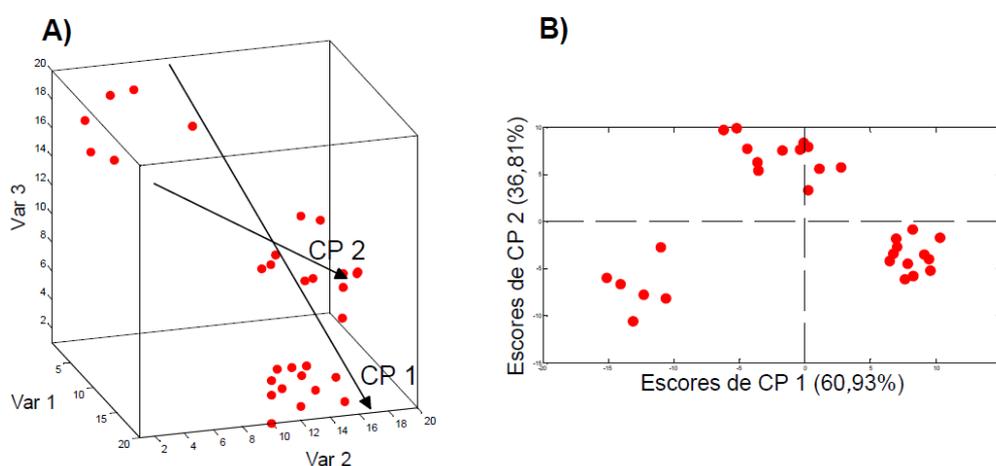


Figura 10. A) representação das amostras simuladas em função de suas variáveis e B) representação dos escores das componentes principais 1 e 2 (CP1 e CP2). (Pereira, 2016).

Considerando um conjunto de dados a partir da análise por espectrometria de massas, a matriz de dados X será organizada de modo que cada linha corresponda a uma amostra e cada coluna corresponda a uma variável, como mostrado na Figura 11.

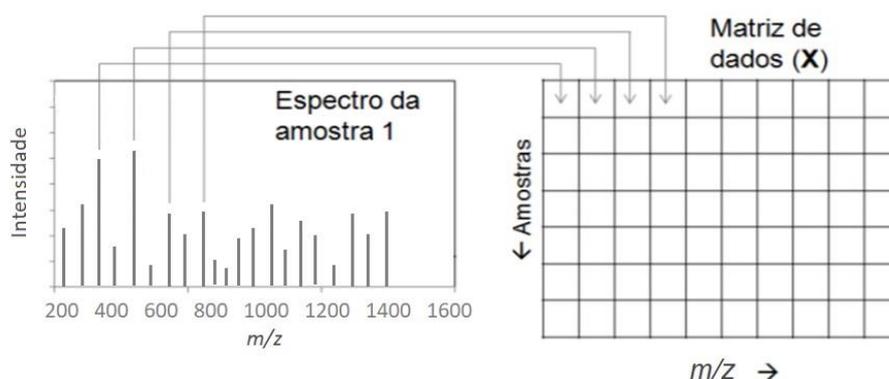


Figura 11. Representação da matriz de dados X a partir de dados de espectrometria de massas.

A PCA é matematicamente descrita como:

$$X = TP^t + E \quad (\text{Equação 5})$$

Ou seja, a matriz de dados originais (X) é decomposta em uma matriz de escores (T), que são as projeções das amostras no novo espaço das componentes principais (possui o mesmo número de linhas que a matriz original e o número de colunas igual ao número de CPs), e uma matriz de pesos/*loadings* (P), determinados pelos cossenos dos ângulos formados entre as variáveis originais e as novas componentes principais (número de linhas igual ao de colunas na matriz original). O símbolo t sobrescrito indica uma matriz transposta. A matriz E é composta pelos resíduos que não foram explicados em nenhuma das PC selecionadas. Essa decomposição é representada na Figura 12.

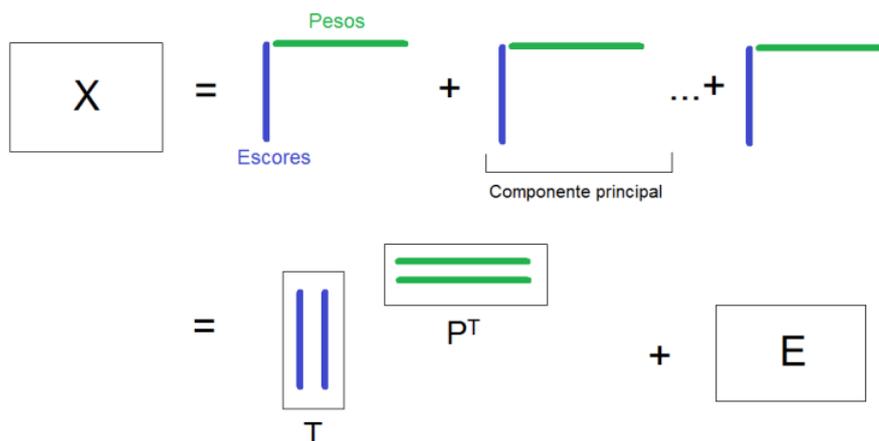


Figura 12. Representação da decomposição da matriz de dados X de acordo com um modelo PCA.

A partir das informações contidas no novo espaço, é possível projetar os dados das amostras em um gráfico dos escores das componentes principais, permitindo observar a possível presença de agrupamentos naturais entre as amostras. E a interpretação de como as variáveis influenciam nessa discriminação se dá pela análise dos pesos (*loadings*), sendo possível identificar os fenômenos ou características responsáveis pelo agrupamento dos dados (Ferreira, 2015).

Os dados podem ser pré-processados a fim de reduzir variações indesejáveis que não contribuem para o modelo e podem influenciar nos resultados finais. Há dois tipos de pré-processamentos, os que são aplicados às amostras, com a finalidade de reduzir o ruído experimental e variações sistemáticas indesejáveis, por exemplo, e os que são aplicados às variáveis, podendo ser destacados a centragem dos dados na média e o autoescalamento. A centragem dos dados na média consiste em calcular a média de cada coluna da matriz e, posteriormente, subtrair tais valores de cada elemento das respectivas colunas, o que resulta em uma translação de eixos para seus valores médios, preservando a estrutura dos dados. O autoescalamento é iniciado da mesma forma que a centragem na média, porém, após os valores serem subtraídos das colunas, o resultado é dividido pelo desvio padrão de cada respectiva coluna. Dados compostos por variáveis escalares discretas são normalmente autoescalados, enquanto dados espectrais são apenas centrados na média, já que o autoescalamento daria pesos iguais para as variáveis, em uma situação em que os máximos dos picos ou sinais têm, naturalmente, maior contribuição para o modelo do

que as variáveis próximas da linha-base. Além disso, o autoescalamento aumentaria o ruído espectral de variáveis de pouca intensidade (Ferreira, 2015).

A PCA também permite identificar a presença de amostras anômalas em um conjunto de dados. Esta detecção é feita por meio da observação de dois parâmetros, os resíduos Q , que estão relacionados à variância residual não modelada, e os valores de T^2 de Hotelling, que avaliam a influência da variância incluída no modelo para cada amostra. Amostras que possuam simultaneamente altos valores de Q e T^2 são consideradas anômalas (*outliers*).

2.6.3 Fusão de dados (*Data fusion*)

A fusão de dados é uma estratégia de modelagem que combina dados provenientes de diferentes origens ou técnicas analíticas em um único modelo, tais como: espectroscopias no infravermelho (IV) médio e próximo, Raman, UV-Vis, espectrofluorimetria, espectrometria de massas, cromatografia (líquida e gasosa), além de análises elementares. Dessa forma, pode-se obter um conhecimento mais completo sobre as amostras, como também modelos com maior capacidade preditiva ou classificatória, permitindo, portanto, interpretações mais abrangentes. Evidentemente, a fusão de dados é útil quando a informação complementar é modelada, uma vez que seu objetivo principal é aumentar a sinergia entre as técnicas fundidas, mesclando informações complementares (Spiteri *et al.*, 2016).

De maneira geral, a fusão de dados pode ocorrer em três níveis: baixo, médio e alto. No nível baixo, todas as variáveis são concatenadas diretamente em uma única matriz, na qual o número de linhas é igual ao número de amostras analisadas e o número de colunas é igual ao número de variáveis medidas em diferentes instrumentos. Após a união dos dados, aplica-se a modelagem quimiométrica adequada para predição ou classificação. No nível médio, primeiramente se extraem as informações relevantes de cada fonte de dados para que posteriormente sejam concatenados em uma única matriz. A abordagem mais comum é a fusão dos escores de modelos PCA, PLS-DA ou PLS. O principal desafio, portanto, é encontrar a combinação ideal de informações extraídas que forneça o melhor modelo final. Por fim, no nível alto, os modelos de classificação ou predição são construídos separadamente para os dados provenientes de cada equipamento/origem e os

resultados de cada modelo individual são integrados em uma única resposta final. O principal desafio é construir modelos que funcionem adequadamente para cada bloco de modo que sua combinação tenha um desempenho consideravelmente melhor que os modelos individuais. Na maioria dos casos em que há comparação entre os níveis, a fusão de nível alto apresenta resultados inferiores com relação aos níveis médio e baixo (Borràs et al., 2015; Biancolillo et al., 2014).

3 AVALIAÇÃO DE AUTENTICIDADE DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE *HYPERICUM PERFORATUM L.* (ERVA DE SÃO JOÃO)

3.1 Introdução

Problemas psiquiátricos, como depressão e ansiedade, estão se tornando as principais causas da redução da qualidade de vida e crescimento da taxa de mortalidade no mundo todo. Além desses problemas frequentemente ocorrerem junto com outros transtornos psiquiátricos, eles podem prevalecer durante toda a vida dos indivíduos, o que reforça ainda mais a importância do combate à essas doenças (Zirak *et al.*, 2019). De acordo com um documento publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2017 estimava-se que 322 milhões de pessoas no mundo sofriam com depressão. A Figura 13 indica a quantidade de pessoas em cada região do mundo que sofriam com depressão na época da publicação deste documento (WHO, 2017).



Figura 13. Dados de pessoas com depressão por região no mundo de acordo com a OMS. (WHO, 2017).

Ao longo dos anos diversos tratamentos foram testados para melhorar a qualidade de vida de quem sofre com problemas psiquiátricos, sendo hoje mais comum o uso de medicamentos sintéticos e psicoterapia. Porém, diversos estudos na área comprovam os efeitos colaterais causados pelo uso de tais medicamentos, como problemas gastrointestinais, distúrbios do sono, disfunção erétil, ganho e/ou perda de peso, além da maioria dos medicamentos atuais terem início de ação lento. Portanto,

devido aos possíveis efeitos colaterais, vem crescendo cada vez mais o interesse na utilização de produtos naturais como forma de substituir o uso destes medicamentos (Zirak *et al.*, 2019).

A espécie *Hypericum perforatum* L., popularmente conhecida como Erva de São João (Figura 14), é uma planta herbácea perene pertencente à família *Hypericaceae*, nativa da Europa, Ásia e África do Norte, sendo uma das plantas medicinais mais consumidas no mundo. Apesar de possuir diversas ações – antimicrobianas, antivirais e anti-inflamatórias – a Erva de São João é comumente utilizada para depressão e transtornos psiquiátricos (Walker *et al.*, 2001). Suas propriedades farmacêuticas são atribuídas principalmente a metabólitos como hipericina, pseudo-hipericina e hiperforina, além de flavonoides (quercitrina, quercetina, rutina) e ácidos fenólicos (ácido clorogênico) (Koyu e Haznedaroglu, 2015). Diversos pesquisadores compararam os efeitos da Erva de São João com medicamentos antidepressivos comumente utilizados, como fluoxetina e sertralina, e concluíram que não há diferenças significativas nas respostas clínicas dos pacientes estudados, além de terem observado uma diminuição dos efeitos colaterais utilizando o medicamento natural (Zirak *et al.*, 2019).



Figura 14. Imagem da *Hypericum perforatum* L.

No Brasil, alguns medicamentos fitoterápicos à base de *Hypericum perforatum* tiveram sua comercialização autorizada pela ANVISA, como o Remotiv®, fabricado pela empresa Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., que teve seu registro renovado pela última vez em 2011, porém sua fabricação foi descontinuada pela empresa. Atualmente, há outros medicamentos autorizados como Triativ® (Myralis Indústria Farmacêutica Ltda), Deprenon Vita® (Laboratório Vitalab Ltda) e Hipericin®

(Herbarium Laboratório Botânico Ltda). Tais medicamentos só podem ser comercializados sob prescrição médica, podendo os envolvidos estar sujeitos a penalidades caso ocorra o descumprimento da lei.

É clara a importância de os usuários utilizarem apenas medicamentos autorizados, com a garantia de serem autênticos, após passarem por uma série de etapas de controle de qualidade. Entretanto, produtos à base da *Hypericum perforatum*, como chás medicinais e drogas vegetais, são ampla e livremente comercializados e consumidos no Brasil e em outros países por pessoas que fazem tratamento para depressão. Frequentemente, esses produtos medicinais são comercializados sem fiscalização, em locais impróprios, sem nenhum controle seja na fabricação desses produtos, importação ou venda. Como nesses locais não há a necessidade da apresentação da receita médica, os usuários muitas vezes optam por adquirir tais produtos, mesmo que possam ser falsificados, conter substâncias que não constam nos rótulos, ou até mesmo não conter o princípio ativo, podendo causar inúmeros problemas. Vale ressaltar ainda que, em muitos desses produtos, a concentração do princípio ativo não é informada. Neste contexto, a determinação da composição química desses produtos é importante para se estimar possíveis danos à saúde dos consumidores.

3.1.1 Determinação de componentes orgânicos e inorgânicos em *Hypericum perforatum*

Sabe-se que o nível de elementos químicos presentes em plantas deve-se às condições ambientais em que elas se encontram, tais como tipo de solo, nível de precipitação, produtividade agrícola ou industrial ao redor, além de origem geográfica. Os vegetais podem acumular elementos essenciais aos organismos vivos, que em elevadas concentrações podem se tornar prejudiciais, ou metais tóxicos, quando disponíveis no solo. Tais plantas, quando consumidas, podem causar diversos danos à saúde (Arceusz, Radecka e Wesolowski, 2010).

Na literatura são encontrados estudos com a *Hypericum perforatum* para investigação de falsificações, assim como controle de qualidade dos medicamentos, análise dos principais componentes orgânicos das plantas, além de análises elementares. Diversas técnicas analíticas são utilizadas para análise dos compostos orgânicos, tais como cromatografias líquida, gasosa e em camada delgada (LC, GC e

TLC), espectroscopia de RMN, espectrometria de massas (MS), enquanto as análises inorgânicas são normalmente realizadas por espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e espectrometria de massas por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Raclariu et al., 2017; Agapouda et al., 2019; Pavlova, Karadjova e Krasteva, 2015).

Hoban *et al.* (2018) realizaram um trabalho com o intuito de avaliar possíveis adulterantes em medicamentos à base de *Hypericum perforatum* adquiridos na Austrália. Para isso, os autores utilizaram técnicas de sequenciamento de DNA, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com analisador quadrupolo-tempo de voo (LC-QTOF-MS), cromatografia líquida com detecção por UV (LC-UV), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com detector de nitrogênio-fósforo (GC-NPD/MS) e ICP-MS. Como resultados, dos 59 medicamentos analisados, 49% continham pelo menos um material não listado nas embalagens, como cafeína, trigo e metais pesados. Além disso, foram encontrados em 24% das amostras DNA de espécies animais, como ratos e morcegos, indicando um controle de qualidade ruim. Também foram comparados medicamentos de diferentes origens, incluindo ervas ocidentais e medicamentos chineses, e foi observado que 94% das amostras chinesas continham algum contaminante em comparação a 37% das ervas ocidentais.

Milevskaya *et al.* (2016) testaram diferentes métodos de extração de vegetais da Erva de São João para análise por cromatografia líquida (LC-MS e LC-DAD). Foram avaliados os métodos de extração por radiação micro-ondas, ultrassom, extração apenas por aquecimento, ou aquecimento juntamente com pressão. Avaliando-se a extração de 15 compostos biologicamente ativos, os autores concluíram que os melhores métodos incluem os efeitos do aquecimento com radiação micro-ondas, bem como o aquecimento com pressão.

Alguns autores investigaram os elementos presentes em amostras de *Hypericum perforatum* em diversos países no mundo. De acordo com Owen *et al.* (2019), a planta pode ser acumuladora de Cd, e a presença de elementos como Ni, La e Cr pode afetar a produção de compostos bioativos. Os autores publicaram diversos trabalhos analisando os elementos por ICP-OES. Em uma de suas publicações, eles monitoraram a presença de 25 elementos em amostras de *Hypericum perforatum* (vegetais secos, cápsulas e comprimidos). Os elementos

encontrados em maiores concentrações foram Ca, Mg, Al, Fe, Mn, Sr e Zn. De acordo com os autores, pela primeira vez foram encontrados Pt e Y nas amostras, em todas as preparações. Foi aplicada a PCA aos dados, detectando 3 amostras como *outliers*, sendo essas de regiões geográficas diferentes das demais amostras, e possuindo 7 elementos com concentrações muito distintas. Através das 3 primeiras componentes principais, os autores observaram a formação de 3 grupos, de acordo com as formas de apresentação (vegetais secos, cápsulas e comprimidos), diferenciados por uma alteração no perfil elementar devido à adição de excipiente e/ou ao processo de extração, sendo os elementos mais importantes para essa separação Ba, Ca, Cd, Fe, Ni, Sr e Y (Owen *et al.*, 2016).

3.1.2 *Ageratum conyzoides* L.

No Brasil, outra espécie fitoterápica também é conhecida popularmente como Erva de São João, o *Ageratum conyzoides* L. (Figura 15). Porém, esse vegetal possui outras atividades como anti-reumática, anti-inflamatória e cicatrizante, sendo utilizado também no tratamento de dores articulares, assim como cólicas, diarreia e flatulência. Possíveis efeitos colaterais com relação ao seu consumo excessivo são intoxicação do fígado e aumento da pressão arterial (Momesso, Moura e Constantino, 2009).



Figura 15. Imagem da *Ageratum conyzoides* L.

O problema de ambas as plantas serem popularmente conhecidas pelo mesmo nome é que isto gera confusão e consumo de forma equivocada pela população, pois além de poderem não apresentar os efeitos desejados, já que o *Hypericum perforatum* é comumente utilizado para depressão e o *Ageratum conyzoides* para dores e inflamações, podem surgir diferentes efeitos colaterais causados por cada espécie. A

falta de informação pode se dar tanto pelos usuários desses fitoterápicos quanto por parte dos vendedores, que, muitas vezes, comercializam esses produtos de forma equivocada.

3.2 Objetivos

O objetivo desse capítulo foi avaliar o desempenho das técnicas espectrometria de massas com ionização por paper spray (PS-MS) e fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF), como técnicas rápidas, simples e de baixo custo, para avaliação de autenticidade e presença de metais tóxicos em amostras comerciais de *Hypericum perforatum*. Pela técnica PS-MS buscava-se obter fingerprints representativos de amostras autênticas de *Hypericum perforatum*, e pela técnica TXRF buscava-se determinar e quantificar os elementos inorgânicos presentes nas amostras.

De forma complementar, foram utilizados métodos quimiométricos, como análise de componentes principais (PCA), com o intuito de identificar grupos de amostras que possuem composição química similar, e fusão de dados, concatenando os resultados das duas técnicas, buscando interpretações mais abrangentes dos dados.

3.3 Metodologia

3.3.1 Amostras

Um total de 43 amostras (16 vegetais, 22 cápsulas, 5 comprimidos) de erva de São João foram adquiridas em comércios locais ou pela internet em diferentes regiões do Brasil e exterior, como apresentado na Tabela 1. Algumas das amostras comerciais utilizadas estão apresentadas na Figura 16.

Tabela 1. Marca e origem das amostras de Erva de São João adquiridas.

Vegetais		
Marca	Local de aquisição	Produzido / Embalado
A Floresta	Belo Horizonte - MG	Esmeraldas - MG
Alternativa	Belo Horizonte - MG	Esmeraldas - MG
Amazônia	Belo Horizonte - MG	n.e.
Armazém São José	São Paulo - SP	n.e.
Casa dos Chás	Belo Horizonte - MG	n.e.

Central Ervas	Belo Horizonte - MG	n.e.
Central Ervas	Goiânia - GO	n.e.
Flora Medicinal	Internet	Guarujá - SP
Metrópoles Ervas	Belo Horizonte - MG	n.e.
Vita Center	Goiânia - GO	n.e.
-	São Paulo – SP	n.e.
-	São Paulo - SP	n.e.
-	Goiânia - GO	n.e.
-	Goiânia - GO	n.e.
-	Itajubá - MG	n.e.
-	Patos de Minas - MG	n.e.

Cápsulas

Marca	Local de aquisição	Produzido / Embalado
Alterative Pharma	Internet	Descalvado – SP
Chá e Cia – Ervas medicinais	Internet	Bulgária
Eficácia Farmácia de Manipulação	Internet	Belo Horizonte – MG
Erva de São João	Internet	Belo Horizonte – MG
Erva de São João - Bio Vitta's	Belo Horizonte – MG	n.e.
Erva de São João – Bio Vitta's	Belo Horizonte – MG	n.e.
Erva de São João - Erva & Cia	Internet	n.e.
Erva Nativa	Belo Horizonte – MG	Itapemirim – ES
EuroHerbs	Internet	Perris - EUA
Farmácia Cantinho da Terra	Internet	Rio Claro – SP
Flora Nativa do Brasil	Internet	Itapemirim – ES
Guanyejinsato - DUOM	Internet	Colombo – PR
Hipérico - Bio Vitta's	Belo Horizonte – MG	n.e.
Hipérico Erva & Cia	Internet	n.e.
Hipérico – NatuVitty	Internet	Estiva Gerbi – SP
Hipérico – WRA	Internet	n.e.
Hypérico	Goiânia - GO	Rio de Janeiro – RJ
Luna Ervas	Internet	Caieiras - SP
Manipulação e Drogaria São Lourenço	Internet	Ipanema – MG
Manipulação Minas Brasil	Internet	Montes Claros – MG
Nature's Bounty	Internet	New York - EUA
Sundown Naturals	Internet	Boca Raton - EUA

Comprimidos

Marca	Local de aquisição	Produzido / Embalado
ASDA	Lincoln – UK	Swadlincote – Reino Unido

HRI Good mood	Lincoln – UK	Wellingborough – Reino Unido
Hyperativ	Internet	São José do Rio Preto – SP
KarmaMood	Lincoln - UK	Ibbenbüren - Alemanha
Morrisons Herbals	Lincoln – UK	Wellingborough – Reino Unido

n.e.: Informação não encontrada



Figura 16. Imagens de algumas amostras de Erva de São João utilizadas nesse trabalho.

Além das amostras apresentadas na Tabela 1, foram também analisadas uma amostra de *Ageratum conyzoides* L. colhida na cidade de Patos de Minas - MG para ser comparada com as amostras adquiridas em comércio, além de um padrão de referência de *Hypericum perforatum* L. (extrato seco), adquirido da Farmacopeia Europeia.

Todas as amostras foram moídas em um moinho de bolas CryoMill da marca Retsch (Alemanha). Para as amostras vegetais foi utilizada frequência 25 Hz em um tempo de 10 min. Para as amostras em cápsulas (sem os invólucros) e comprimidos foi realizada a moagem com a finalidade de homogeneização e redução do tamanho das partículas, utilizando-se frequência 20 Hz e tempo de 5 min. Após a moagem, as amostras pulverizadas foram armazenadas em frascos secos e mantidas à temperatura ambiente.

3.3.2 Espectrometria de massas com ionização por paper spray (PS-MS)

3.3.2.1 Reagentes e instrumentação

Para o procedimento de extração sólido-líquido foram utilizados etanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA), acetato de etila ($\geq 99,5\%$) (Merck, Alemanha), pentano PA (Neon, Brasil) e clorofórmio PA (Cirq, Brasil). Uma centrífuga (AWEL, modelo MF 20-R, França) foi utilizada na centrifugação das amostras e um agitador vortex (Marconi, MA – 162, Brasil) para a homogeneização. Para pesagem das amostras uma balança analítica (Shimadzu, AUW220D, Brasil) foi utilizada.

Foi utilizado metanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA) como solvente para as análises por PS-MS. Como substrato para aplicação das amostras foi utilizado papel cromatográfico número 1 da Whatman, cortado na forma de triângulos equiláteros com dimensões de 1,5 cm, utilizando uma tesoura convencional previamente higienizada com uma solução metanol/água 50:50.

As medidas foram realizadas em um espectrômetro de massas Thermo Fisher LCQ-Fleet com analisador de massas de baixa resolução do tipo *Ion Trap* (San Jose, Califórnia, USA). A fonte de ionização *paper spray* foi construída utilizando um clipe metálico do tipo jacaré, mantido em um suporte universal, o qual permite movimentação manual nos planos x, y e z, ajustando o posicionamento do papel à entrada do espectrômetro (Figura 17).



Figura 17. Aparato instrumental utilizado para as análises: a) Espectrômetro de massas Thermo LQC-Fleet; b) Fonte de ionização *paper spray*.

As condições experimentais do espectrômetro de massas foram otimizadas para os parâmetros: temperatura do capilar, voltagem do *paper spray*, distância entre o papel e a entrada do espectrômetro, e os volumes de solvente e de amostra no papel. As condições otimizadas foram: temperatura do capilar 320°C, voltagem do *paper spray* 4,0 kV, distância entre o papel e a entrada do espectrômetro de 0,8 cm, volume de solvente no papel 25,0 µL e volume de amostra 2,5 µL.

3.3.2.2 Procedimentos de extração

Foram realizados dois procedimentos para extração das amostras, um utilizando radiação micro-ondas, e outro extração sólido-líquido. Os dois procedimentos foram comparados para se avaliar qual extração resultaria em extratos mais puros em relação às substâncias de interesse.

Para a extração utilizando radiação micro-ondas, inicialmente foi realizado um planejamento fatorial 2^4 com quadruplicata no ponto central para avaliar os efeitos das variáveis: temperatura, (60; 75; 90°C), tempo (10; 20; 30 min), proporção de etanol (v/v em água) (50; 70; 90%), e proporção de ácido fórmico (v/v) (0,1; 0,3; 0,5%) na eficiência da extração. O objetivo foi avaliar a condição que resultasse nos sinais mais intensos das substâncias estudadas apresentadas anteriormente.

Para a extração sólido-líquido, foram adicionados em um tubo de ensaio 200 mg de amostra, previamente moídas, 2,5 mL de etanol, e foram testados 3 solventes de diferentes polaridades: acetato de etila, pentano e clorofórmio, também com volumes de 2,5 mL. Posteriormente, a mistura foi agitada no vórtex, colocada em aquecimento em banho-maria por 10 minutos e, então, centrifugada.

Para o tratamento de todos os dados obtidos por PS-MS, os valores de abundância absoluta dos íons de interesse foram divididos pelos valores do PI e, posteriormente, foi utilizado o cálculo de resposta múltipla para obter uma condição satisfatória que proporcionasse os maiores valores de intensidade para todos os íons avaliados (Resende, 2015). Dessa forma, dentro do conjunto de repostas (sinal analítico) obtido para cada íon, identificou-se qual apresentou o maior valor. Em seguida, efetuou-se a divisão de todas as repostas por esse valor, de forma que a maior resposta fosse igual a 1 e as demais menores que 1. Esse procedimento foi realizado para cada analito individualmente. Por fim, efetuou-se o somatório das

respostas normalizadas de cada analito dentro de um mesmo ensaio. Assim, a resposta múltipla referente a cada ensaio foi calculada a partir da Equação 6:

$$RM_j = \frac{R_a}{MR_a} + \frac{R_b}{MR_b} + \dots + \frac{R_i}{MR_i} \quad (\text{Equação 6})$$

Em que RM_j é a somatória das respostas normalizadas de cada analito no ensaio j , R é o sinal analítico para o elemento no ensaio j , e MR é a maior resposta encontrada para o elemento no conjunto dos experimentos realizados.

3.3.3 Fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF)

3.3.3.1 Reagentes e instrumentação

Para o procedimento de digestão ácida assistida por radiação micro-ondas foram utilizados ácido nítrico 65% (m/m) purificado em destilador Suprapur (Milestone, Itália) e peróxido de hidrogênio 30% (m/m), adquiridos da Merck (Alemanha). A digestão foi realizada em forno micro-ondas modelo ETHOS 1 (Milestone, Itália), com rotor para 10 frascos de alta pressão. Uma centrífuga (AWEL, modelo MF 20-R, França) foi utilizada na centrifugação das amostras. Para pesagem das amostras uma balança analítica (Shimadzu, AUW220D, Brasil) foi utilizada.

Para as análises por TXRF foi utilizado um espectrômetro de fluorescência de raios X por reflexão total, S2 PICOFOX (Bruker, Alemanha). O equipamento é equipado com um tubo de Mo como fonte de excitação, um monocromador multicamada e um detector SDD (*Silicon Drift Detector*). Como padrão interno foi utilizada solução padrão de germânio (Ge) com concentração de 1000 mg L^{-1} (Fluka Analytical). Foram utilizados discos de quartzo de 30 mm de diâmetro e uma espessura de $3,0 \pm 0,1 \text{ mm}$ como porta-amostra. Para a limpeza dos discos foram utilizados detergente alcalino (Sigma-Aldrich, EUA), acetona pura PA (Vetec, Brasil) e solução de silicone em isopropanol (Serva, Alemanha). Para a validação do método foi utilizado um material de referência certificado NIST 1573a (folhas de tomate). Para o preparo das suspensões foi utilizado um processador ultrassônico modelo VCX 550 (Sonics, Newtown, CT, EUA) com o acessório *cup horn*, como ilustrado na Figura 18, e um agitador vortex (Marconi, MA – 162, Brasil).

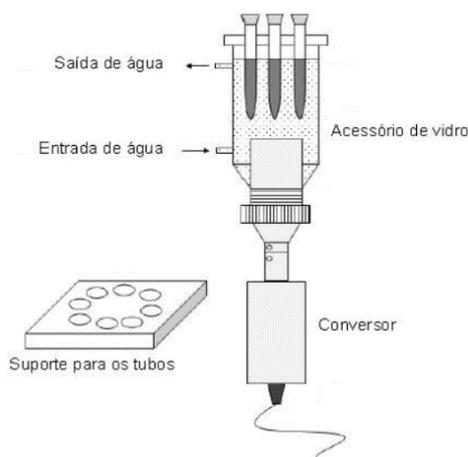


Figura 18. Ilustração do sistema ultrassônico do tipo *cup horn* empregado no procedimento de preparo das amostras de *Hypericum perforatum L.*

3.3.3.2 Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas e análise por TXRF

A digestão ácida assistida por micro-ondas foi utilizada como método de referência para comparação dos resultados obtidos no planejamento para otimização do método de análise direta de suspensões.

Para a digestão, foram pesados cerca de 200 mg de amostra diretamente em cada frasco de Teflon®, nos quais foram adicionados 3,5 mL de HNO₃ concentrado, 3,5 mL de água deionizada e 1,0 mL de H₂O₂. O programa de aquecimento do micro-ondas consistiu em uma rampa de aquecimento de 10 minutos até 200°C, permanecendo nessa temperatura por mais 20 minutos. Após o período de aquecimento, os tubos permaneceram dentro do micro-ondas por mais 30 minutos para resfriamento. Depois de resfriados, os frascos foram abertos e as soluções digeridas foram transferidas para frascos de polietileno e os volumes completados com água deionizada para 20,0 mL.

Para as análises por TXRF, 990 µL dos digeridos foram transferidas para tubos Eppendorf, nos quais foram adicionados 10 µL de uma solução de Ge 100 mg.L⁻¹, utilizado como padrão interno, resultando em um volume final de solução de 1,0 mL e uma concentração do PI de 1,0 mg.L⁻¹. Os frascos foram agitados em vortex para homogeneização. Rapidamente, uma alíquota foi retirada e depositada no centro do disco (Figura 19). Os discos foram então levados à estufa por 10 minutos a 80°C. Posteriormente, eles foram analisados no PICOFOX com tempo de leitura de 500 s para cada amostra.

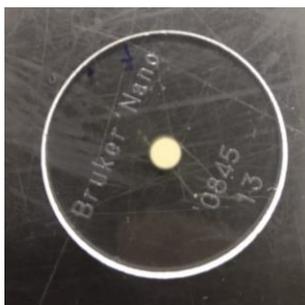


Figura 19. Disco de quartzo com amostra utilizado em TXRF.

3.3.3.3 Preparo das suspensões para análise direta por TXRF

Para análise direta das suspensões por TXRF foi realizado um procedimento para o preparo das amostras, e para isso, um planejamento fatorial 2_{III}^{5-2} foi empregado para avaliar os efeitos das variáveis: massa de amostra, (10; 30 mg), concentração de Triton X 114 (0; 0,5% v v⁻¹), tempo de ultrassom (0; 10 min), concentração do padrão interno Ge (1,0; 2,5 mg L⁻¹), e volume de solução no disco (5, 10 µL) na eficiência do preparo das suspensões e das análises. Este planejamento teve como objetivo avaliar a condição que resultasse em uma maior porcentagem de recuperação dos elementos quando comparado à digestão ácida.

Para o tratamento dos dados, foram utilizados os valores de porcentagem de recuperação de cada elemento avaliado e, posteriormente, foi realizado o cálculo de resposta múltipla afim de se obter a condição com maiores porcentagens de recuperação para todos os elementos.

Para este estudo, preparou-se soluções em tubos Eppendorf contendo diferentes massas de amostras e concentrações de Triton X 114 e padrão interno (Ge), conforme condições da Tabela 2. Os tubos foram submetidos à sonicação por 10 minutos com amplitude de 60% e com um ciclo de 2 pulsos por um. Um fluxo de água à temperatura ambiente foi mantido durante todo o processo, a fim de evitar aquecimento do sistema. Após agitação, uma alíquota foi depositada sob cada disco. Os discos foram levados à estufa por 10 minutos a 80°C. Posteriormente, eles foram analisados no PICOFOX com tempo de leitura de 500 s para cada amostra.

Tabela 2. Condições do planejamento fatorial 2_{III}^{5-2} na análise por TXRF.

Variáveis	Níveis	
	-1 (Baixo)	+1 (Alto)
Massa (mg)	10	30
Triton X 114 (%)	0	0,5
Tempo de US (min)	0	10
[Ge] (mg L ⁻¹)	1,0	2,5
Volume no disco (µL)	5	10

3.3.3.4 Validação do método

Para avaliação da precisão e exatidão do método, utilizando como referência o guia de validação do INMETRO (INMETRO, 2020), foi utilizado um material de referência certificado NIST 1573a – folhas de tomate, que continha elementos em concentrações próximas às encontradas nas amostras, devido à impossibilidade de se obter material certificado de referência de *Hypericum perforatum*. Para isso, foi pesado cerca de 30,0 mg de amostra em tubos Eppendorf em uma solução 0,5% (v/v) de Triton X 114 e concentração final de 1,0 mg L⁻¹ de Ge (PI). O procedimento foi realizado em oito repetições independentes. As análises foram realizadas com tempo de leitura de 500 s para cada amostra. A precisão foi determinada pelo desvio padrão relativo (DPR) e a exatidão foi estimada pelo erro relativo (ER) comparado aos valores de referência.

O DPR é calculado por:

$$DPR(\%) = \frac{DP}{CMD} \cdot 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

O ER é calculado por:

$$ER(\%) = \frac{X_{exp} - X_v}{X_v} \cdot 100 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

X_{exp} = valor obtido ou média aritmética dos valores obtidos experimentalmente

X_v =valor admitido como verdadeiro (valor certificado do MRC)

Os valores de LD e LQ foram estimados com base na relação sinal/ruído, sendo o LD calculado automaticamente pelo *software*, conforme representado pela Equação 9, e o LQ = 3,3 x LD.

$$LD_i = \frac{3.C_i.\sqrt{N_b}}{N_i} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde:

LD_i = limite de detecção do elemento i

C_i = concentração do elemento i

N_i = área do pico de fluorescência em contagens

N_b = área de fundo (background) subjacente ao pico de fluorescência

Todas as amostras de erva de São João moídas foram analisadas pelo método validado.

3.3.4 Tratamento dos dados

Os planejamentos experimentais foram realizados utilizando o *software* STATISTICA® versão 10.0. Os modelos foram obtidos com nível de confiança de 95%.

Os modelos PCA e fusão de dados foram construídos utilizando o *software* MATLAB, versão 7.9.0.529 (The MathWorks, Natick, MA, EUA) e o pacote PLS Toolbox, versão 5.2.2 (Eigenvector Research, Manson, WA, EUA). Para os modelos PCA construídos com os dados de PS-MS foi utilizado como pré-processamento a centragem dos dados na média, e para os dados do TXRF foi utilizado o autoescalamento. Para a fusão de dados, os dados provenientes de cada técnica foram pré-processados individualmente e, após a fusão, foram autoescalados.

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Análises por PS-MS

As etapas de extração das amostras e otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foram realizadas buscando melhorar os sinais dos principais metabólitos da erva de São João: hipericina, pseudohipericina, hiperosídeo, hiperforina, adiperforina, quercitrina, isoquercitrina, quercetina, rutina e ácido clorogênico (Figura 20), já que, segundo a literatura, todas essas moléculas são características da espécie *Hypericum perforatum* (Koyu e Haznedaroglu, 2015; Tolonen et al., 2002; Tatsis et al., 2007; Porzel et al., 2014). Os valores de massa molecular e $[M+H]^+$ de cada composto estão apresentados na Tabela 3.

Os espectros de massas foram obtidos inicialmente nos modos positivo e negativo, porém constatou-se que no modo positivo os íons obtidos apresentavam maior intensidade, e os espectros eram menos ruidosos. Portanto, todos os espectros de massas foram obtidos somente no modo positivo.

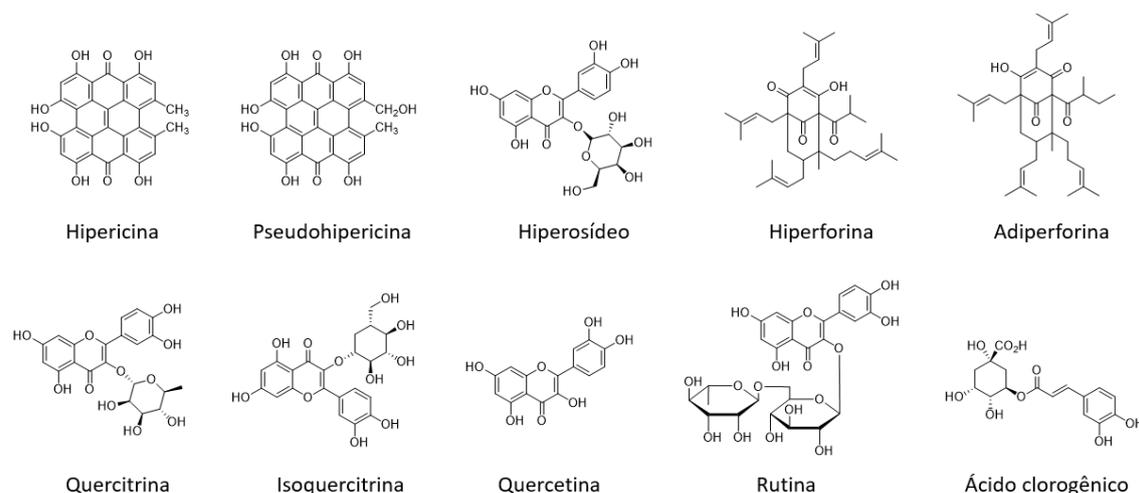


Figura 20. Estrutura química das moléculas dos metabólitos presentes nas amostras de *Hypericum perforatum*.

Tabela 3. Massa nominal e m/z dos íons protonados dos metabólitos do *Hypericum perforatum*.

Composto	Massa Nominal (g mol⁻¹)	[M+H]⁺ (m/z)
Quercetina	302	303
Ácido clorogênico	354	355
Quercitrina	448	449
Hiperosídeo	464	465
Isoquercitrina	464	465
Hipericina	504	505
Pseudohipericina	520	521
Hiperforina	536	537
Adiperforina	550	551
Rutina	610	611

Foram testados três compostos como padrão interno (PI): zidovudina, atazanavir e fenilefrina, cujas fórmulas estruturais estão representadas na Figura 1A do Apêndice. Dentre as substâncias disponíveis no laboratório para serem testadas, esses três fármacos possuíam sítios básicos mais semelhantes aos dos metabólitos estudados, fazendo com que eles fossem ionizados de forma similar, além de possuírem massas moleculares dentro da faixa requerida pelo equipamento (150 – 2000 m/z) e terem baixa probabilidade de serem encontrados em fitoterápicos utilizados para depressão, mesmo que adulterados. Após a obtenção dos espectros verificou-se que apenas o íon protonado do atazanavir (m/z 705) apresentou intensidade adequada (Figura 21), sendo este o escolhido como PI. Vale ressaltar que mesmo as análises não sendo quantitativas, é importante a utilização do PI para normalizar os dados de PS-MS na otimização, já que podem ocorrer problemas de reprodutibilidade entre as análises.

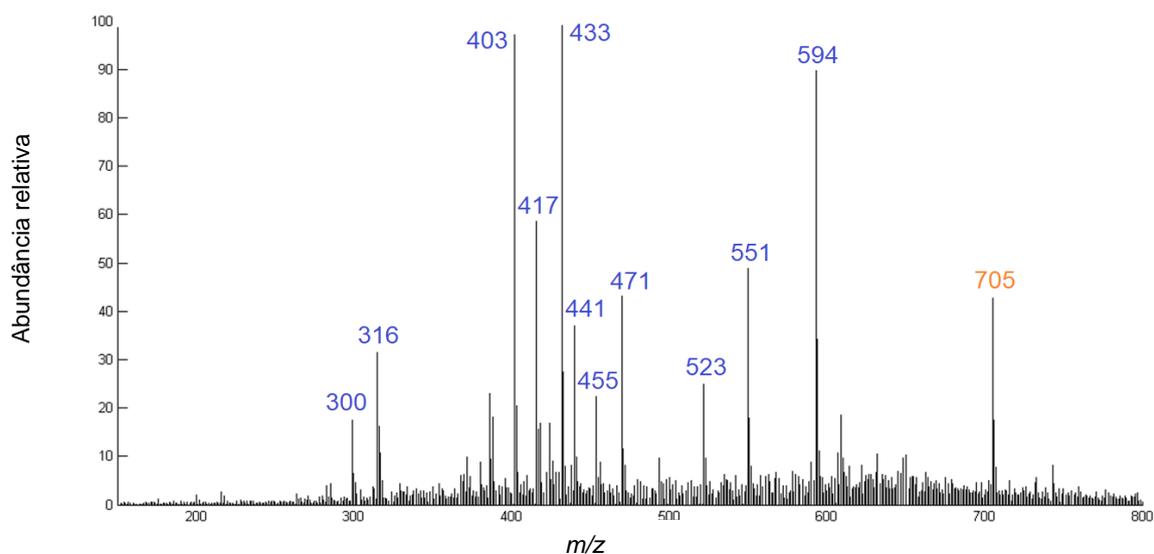


Figura 21. Espectro representativo obtido por PS(+)-MS de uma amostra de Erva de São João contendo atazanavir (m/z 705) como PI.

Para confirmação, foi realizada a fragmentação do íon em m/z 705 (Figura 2A do Apêndice), a qual foi comparada com a fragmentação do atazanavir, conforme a literatura. A fragmentação resultou em íons produto de m/z 687 (perda de 18 unidades de massa), m/z 612 (perda de 93 unidades de massa), m/z 534 (perda de 171 unidades de massa) e m/z 335 (perda de 370 unidades de massa). Segundo a literatura, a fragmentação do atazanavir gera íons produto de m/z 534, 335, 168 e 144, como representado na Figura 3A do Apêndice (Heine *et al.*, 2009). Portanto, foi confirmado que o íon em m/z 705 é referente ao PI.

3.4.1.1 Procedimentos de extração

A maioria dos trabalhos na literatura que envolvem a extração de *Hypericum perforatum* utilizam etanol ou metanol como solventes extratores, e avaliam métodos de extração com variações de temperatura, pressão e utilizando micro-ondas ou ultrassom. Portanto, testou-se dois procedimentos de extração, um utilizando radiação micro-ondas com etanol como solvente, e um procedimento mais simples, a extração sólido-líquido, misturando o etanol com solventes mais apolares, com a finalidade de melhorar a extração de compostos mais apolares e a reduzir interferentes.

Para a extração utilizando radiação micro-ondas, inicialmente foi realizado um planejamento fatorial 2^4 com quadruplicata no ponto central para avaliar os efeitos das variáveis: temperatura, tempo, proporção de etanol (v/v em água) e proporção de ácido fórmico (v/v) na eficiência da extração utilizando radiação micro-ondas. O objetivo era avaliar a condição que resultasse nos sinais mais intensos das substâncias estudadas. Porém, não foram observadas diferenças significativas das intensidades dos sinais dos analitos comparando com a extração sólido-líquido. Por isso, a extração sólido-líquido foi utilizada para essas análises. Os espectros representativos das extrações estão apresentados nas Figuras 4A e 5A do Apêndice.

3.4.1.2 Extração sólido-líquido

Foram testados 3 solventes de diferentes polaridades, pentano, clorofórmio e acetato de etila, juntamente com etanol sob aquecimento no procedimento de extração, para avaliar a condição que resultasse nos sinais mais intensos das substâncias estudadas nos espectros de massas.

Após comparar os espectros obtidos para cada solvente, constatou-se que não houve uma diferença significativa nos sinais das substâncias de interesse, porém foi observado que os espectros adquiridos usando a mistura acetato de etila/etanol apresentaram menor presença de interferentes, resultando em espectros ligeiramente mais limpos. Por isso, essa mistura foi escolhida para extrações posteriores.

Portanto, o procedimento de extração utilizado para as demais análises consistiu na mistura de 200 mg de amostra com 2,5 mL de etanol e 2,5 mL de acetato de etila, em aquecimento em banho-maria.

3.4.1.3 Espectros PS-MS de amostras de Erva de São João

Após o ajuste das condições de extração e de ionização na fonte *paper spray*, foram obtidos, em duplicata, os espectros PS-MS dos extratos na faixa de 150 – 800 *m/z*.

Na Figura 22 é mostrado o espectro médio da amostra de *Ageratum conyzoides*, da qual se conhece a procedência.

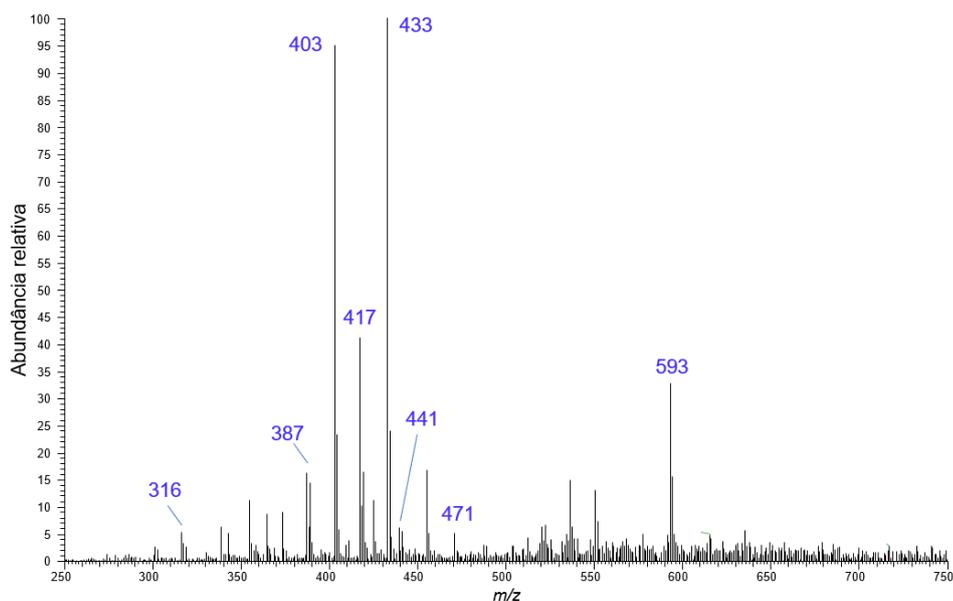


Figura 22. Espectro representativo obtido por PS(+)-MS da amostra de *Ageratum conyzoides*.

De acordo com a literatura, o íon de m/z 316 pode ser atribuído à substância protonada $[M+H]^+$ *N*-óxido de licopsamina, o íon de m/z 387 pode corresponder à linderoflavona B (5,6,7,8-tetrametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona), o íon de m/z 403 pode ser do flavonoide 7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona, o íon de m/z 417 pode corresponder à eupalestina (5,6,7,8,5'-pentametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona), enquanto o íon de m/z 433 pode ser atribuído à 5'-metoxinobiletina (5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona) (Faqueti, 2016). Além dos íons de moléculas protonadas, é comum a ocorrência de adutos, principalmente com Na e K. Portanto, o íon de m/z 441 pode indicar a formação de um aduto $[M+K]^+$ da substância 7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona, da mesma forma que o íon de m/z 471 pode ser do aduto $[M+K]^+$ do composto 5'-metoxinobiletina.

Apesar de não ser observado com alta intensidade nesse espectro, o íon de m/z 300 também é característico desse vegetal, correspondente à substância licopsamina (Faqueti, 2016).

Na Figura 23, estão representados alguns espectros obtidos por PS-MS das amostras adquiridas como erva de São João na forma de plantas secas.

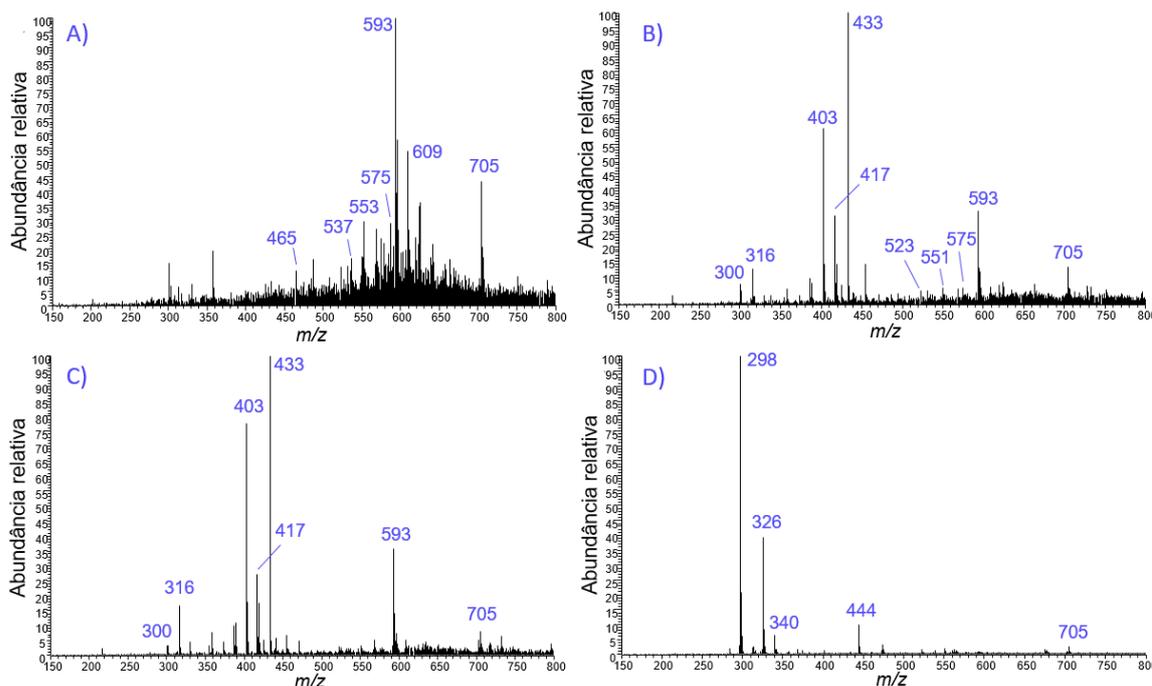


Figura 23. Espectros representativos obtidos por PS(+)-MS de quatro amostras de vegetais de erva de São João.

Na Figura 23a, é possível observar alguns íons característicos do *Hypericum perforatum*, como os de m/z 465 e 537, que podem ser atribuídos ao hiperosídeo e/ou isoquercitrina e hiperforina, respectivamente. Além do sinal em m/z 575 que pode ser atribuído ao aduto $[M+K]^+$ da hiperforina. De acordo com a literatura, o sinal em m/z 553 pode ser atribuído à substância furohiperforina, encontrada em algumas amostras de *Hypericum perforatum* (Verotta et al., 1999; Porzel et al., 2014). Nenhum dos sinais de maior intensidade é característico dos íons presentes no *Ageratum conyzoides*.

Entretanto, o espectro da Figura 23b apresentou diversos sinais atribuídos ao *Ageratum conyzoides*, como os de m/z 300, 316, 403, 417 e 433, além do íon de m/z 551, o qual pode ser característico do adiperforina, presente no *Hypericum perforatum*, e do íon de m/z 575, atribuído ao aduto $[M+K]^+$ da hiperforina. De acordo com a literatura, o sinal em m/z 523 pode ser atribuído à substância denominada protopseudohipericina (Porzel et al., 2014).

Já o espectro da Figura 23c apresenta quase exclusivamente íons característicos do *Ageratum conyzoides* (m/z 300, 316, 403, 417 e 433).

E, por fim, o espectro da Figura 23d não apresenta sinal característico de nenhuma dessas espécies. De acordo com a literatura, os sinais em m/z 298, 326, 340 e 444 podem ser atribuídos ao vegetal *Senna spectabilis*, conhecido no Brasil

como Cássia do Nordeste. Essa espécie possui diversos compostos fenólicos com potencial atividades anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, além de laxante (Pivatto *et al.*, 2005).

Na Figura 24, são mostrados três espectros obtidos por PS-MS de amostras de cápsulas adquiridas como Erva de São João.

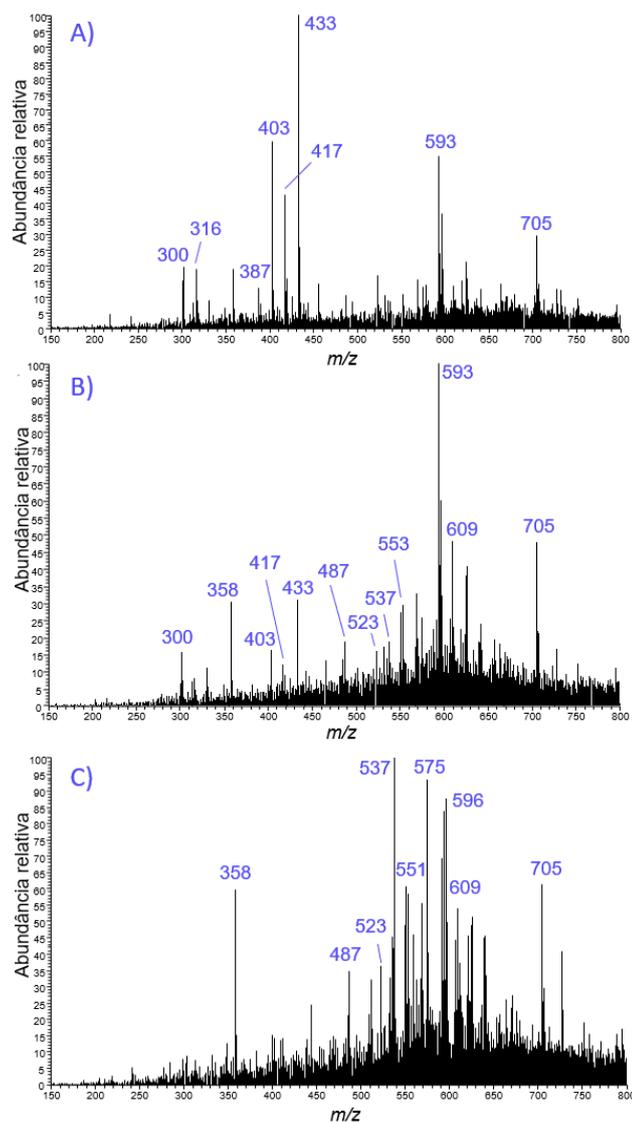


Figura 24. Espectros representativos obtidos por PS(+)-MS de três amostras de cápsulas de erva de São João.

Na Figura 24a, os sinais mais intensos do espectro são característicos dos íons presentes no *Ageratum conyzoides* (m/z 300, 316, 387, 403, 417 e 433).

Na Figura 24b, também são observados sinais de diversos íons atribuídos ao *Ageratum conyzoides* (m/z 300, 403, 417 e 433), além de alguns sinais característicos do *Hypericum perforatum*, como os íons de m/z 487, que pode ser atribuído ao aduto

$[M+Na]^+$ do hiperosídeo, de m/z 523, que pode ser característico da substância protopseudohipericina, em m/z 537, atribuído à hiperforina, e de m/z 553, atribuído à substância furohiperforina.

Já na Figura 24c não há nenhum sinal intenso dos íons do *Ageratum conyzoides*, e nota-se um sinal em m/z 523, atribuído à protopseudohipericina, um sinal intenso em m/z 537, atribuído à hiperforina e em m/z 551, atribuído à adiperforina (Tatsis *et al.*, 2007; Porzel *et al.*, 2014). O sinal em m/z 487 pode ser atribuído ao aduto $[M+Na]^+$ do hiperosídeo e em m/z 575 pode ser atribuído ao aduto $[M+K]^+$ da hiperforina.

Na Figura 25 são mostrados dois espectros de amostras de erva de São João adquiridos em comprimidos.

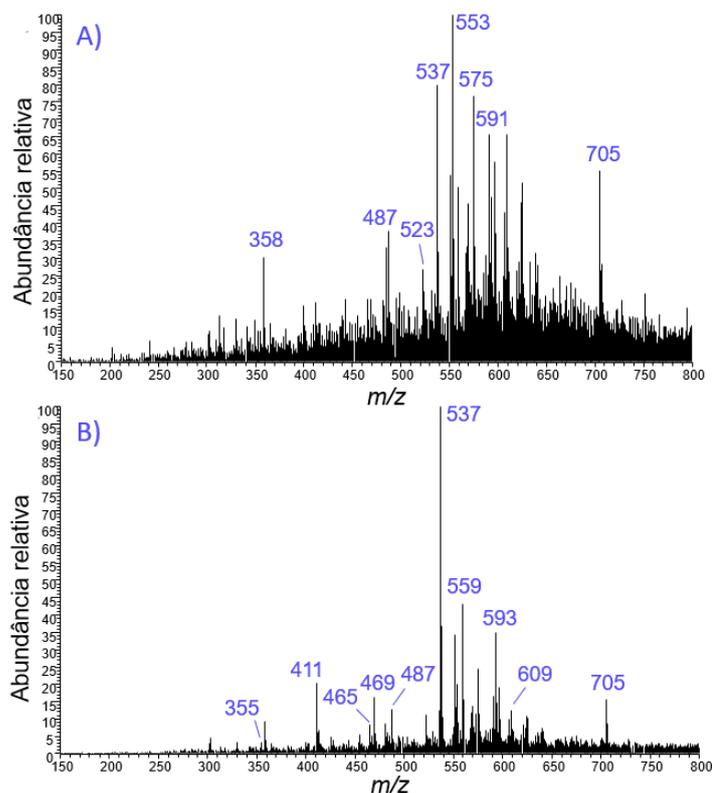


Figura 25. Espectros representativos obtidos por PS(+)-MS de duas amostras de comprimidos de erva de São João.

Nenhum dos espectros da Figura 25 apresenta sinais correspondentes aos íons do *Ageratum conyzoides*, mas eles apresentam sinais atribuídos ao *Hypericum perforatum*, como os de m/z 465 (hiperosídeo ou isoquercitrina), 537 (hiperforina), assim como seus adutos $[M+Na]^+$ de m/z 559 e $[M+K]^+$ de m/z 575. O sinal de m/z 469

pode ser atribuído ao íon da hiperfirina, o sinal de m/z 487 pode ser atribuído ao aduto $[M+Na]^+$ do hiperosídeo, o sinal de m/z 523 pode ser atribuído à protopseudohipericina, e o sinal de m/z 553 pode ser atribuído à substância furohiperforina, de acordo com a literatura (Porzel et al., 2014; Tatsis et al., 2007; Tolonen et al., 2002). Os demais sinais podem ser correspondentes aos excipientes comumente utilizados em comprimidos.

Para confirmação dos resultados, os espectros de massas MS^2 das amostras foram obtidos, com energias de colisão variando entre 30 – 40 eV, assim como os espectros de massas MS^2 do padrão da Erva de São João, estes obtidos tanto no modo positivo quanto no modo negativo. Pelo espectro do padrão da Erva de São João, foi possível observar e fragmentar o íon $[M+H]^+$ da hiperforina (m/z 537), assim como o $[M-H]^-$ da mesma (m/z 535) e o íon $[M-H]^-$ da hipericina (m/z 503), os quais tiveram os perfis de fragmentação comparados com a literatura (Tatsis et al., 2007; Porzel et al., 2014). Nos espectros das amostras de Erva de São João, o íon de m/z 537 apresentou fragmentos correspondentes aos do padrão, em m/z 375, 425, 437, 465 e 509, cujas perdas de unidades de massa foram 162, 112, 100, 72 e 28, respectivamente. Com relação ao íon $[M+H]^+$ da hipericina de m/z 505, tanto no espectro do padrão quanto nos espectros das amostras de Erva de São João, o íon se apresentou muito pouco intenso, a nível de ruído. A Figura 26 mostra o espectro do padrão da Erva de São João, e a Figura 6A do Apêndice mostra o espectro MS^2 do íon m/z 537.

Dentre os demais íons correspondentes ao *Hypericum perforatum*, apenas quercitrina (m/z 449) e hiperosídeo (m/z 465) apresentaram sinais dos íons filhos equivalentes aos encontrados na literatura. (Porzel et al., 2014) A fragmentação, no modo positivo, do íon em m/z 449 resultou em fragmentos de m/z 303, 403, 419 e 431, cujas perdas de unidades de massa foram 146, 46, 30 e 18, respectivamente. Na literatura, os espectros foram obtidos no modo negativo, portanto o íon $[M-H]^-$ da quercitrina possui m/z 447. Quando fragmentado, ele gerou o íon filho de m/z 301, perdendo, portanto, 146 unidades de massa. Já a fragmentação do íon de m/z 465 resultou em fragmentos de m/z 303, 349, 375, 419 e 447, perdendo portanto, 162, 116, 90, 46 e 18 unidades de massa, respectivamente. Na literatura, o íon $[M-H]^-$ do hiperosídeo (m/z 463) gerou o íon filho em m/z 301, que equivale à perda de 162 unidades de massa. (Porzel et al., 2014) Os espectros das fragmentações da

quercitrina e hiperosídeo obtidos por PS-MS estão apresentados nas Figuras 7A e 8A, respectivamente, no Apêndice.

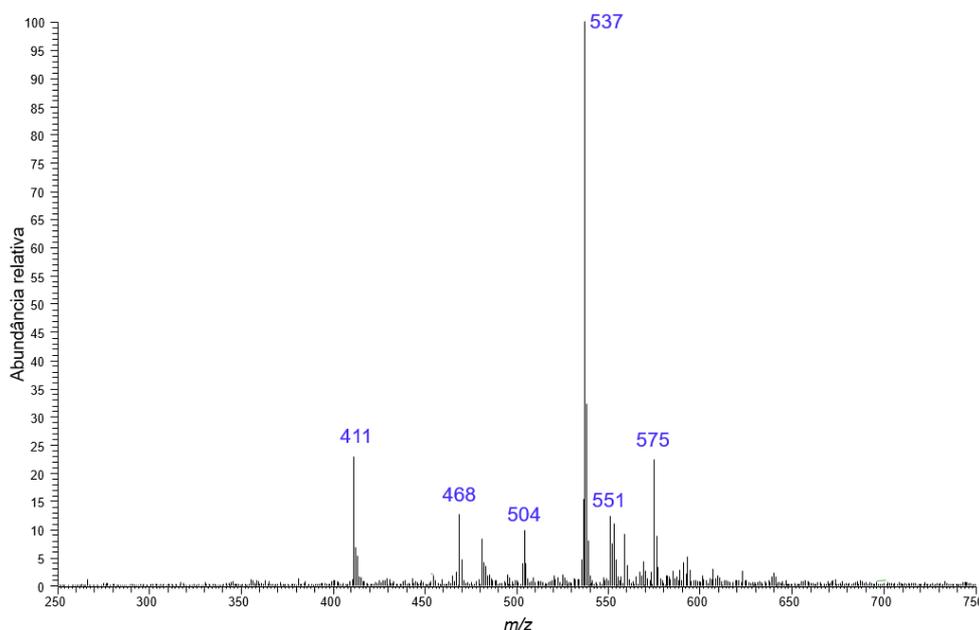


Figura 26. Espectro representativo obtido por PS(+)-MS do padrão da Erva de São João.

Os espectros de massas MS² dos íons de m/z 403, 417 e 433, característicos do *Ageratum conyzoides*, também foram obtidos e comparados com a literatura. De acordo com Faqueti, o íon em m/z 403 apresenta fragmentos de m/z 342, 359, 373 e 388. Já o íon de m/z 417 apresenta fragmentos de m/z 356, 369, 387 e 402 (Faqueti, 2016). E, por fim, os íons filho provenientes da fragmentação do íon de m/z 433 são os de m/z 372, 385, 403 e 418. A maioria das fragmentações obtidas pelas amostras caracterizadas como *Ageratum conyzoides* são compatíveis com a literatura (Owen *et al.*, 2016). Os espectros das fragmentações dos íons de m/z 403, 417 e 433 obtidos por PS-MS estão apresentados nas Figuras 9A, 10A e 11A do Apêndice.

De modo geral, foi possível verificar pelos espectros que algumas amostras apresentaram sinais apenas do *Hypericum perforatum*, outras apenas do *Ageratum conyzoides*, assim como houve amostras com a mistura de ambas as espécies. Além disso, duas amostras de vegetais apresentaram íons de uma terceira espécie, a *Senna spectabilis*.

Levando-se em conta que todas as amostras foram compradas como *Hypericum perforatum*, é preocupante o fato de que 52,3% do seu conjunto continha

outro princípio ativo em sua composição. Das 21 amostras consideradas autênticas, ou seja, contendo apenas íons do *Hypericum perforatum*, 8 foram produzidas em outros países (Bulgária, EUA, Reino Unido e Alemanha) e apenas 13 foram brasileiras. Portanto, é clara a necessidade de um maior controle de qualidade desses fitoterápicos no Brasil. A ausência do princípio ativo em algumas das amostras analisadas evidencia que esse medicamento não apresentará o efeito esperado pelos usuários.

Apesar da técnica PS-MS ter sido eficiente na diferenciação das amostras com relação às espécies presentes, há a necessidade da utilização de um equipamento de alta resolução para a confirmação dos resultados e diferenciação de massas moleculares próximas, além da atribuição de íons que não puderam ser identificados, contribuindo assim para avaliação mais completa dos metabólitos presentes nessas amostras.

3.4.1.4 Análise de componentes principais (PCA)

Os dados relativos aos espectros de massas foram organizados em uma matriz de 44 linhas por 650 colunas para a análise por PCA. Como pré-processamento foi feita a centragem dos dados na média.

Inicialmente, foi verificada a possível presença de amostras anômalas (*outliers*) através do gráfico de T^2 de Hotelling *versus* resíduos Q, com 95% de confiança. Quando uma amostra se encontra no quadrante superior direito é considerada um *outlier*, pois ela possui simultaneamente alto resíduo e alta influência no modelo. Uma amostra com elevado resíduo é pouco modelada (variância não incluída no modelo) e pode ser excluída, enquanto uma amostra com alta influência tem muita contribuição para o modelo (variância incluída). Como pode-se observar na Figura 27, a amostra 29 foi considerada um *outlier*. Portanto, ela foi retirada e o modelo foi construído novamente. No novo modelo, com a exclusão da amostra 29, as amostras 25 e 39 também foram consideradas *outliers* e também foram retiradas do modelo. Assim, o modelo PCA foi construído utilizando 41 amostras. O modelo explicou 64,27% da variância total dos dados utilizando-se 2 componentes principais. As demais componentes não continham informações relevantes para a separação dos agrupamentos e, portanto, foram desprezadas.

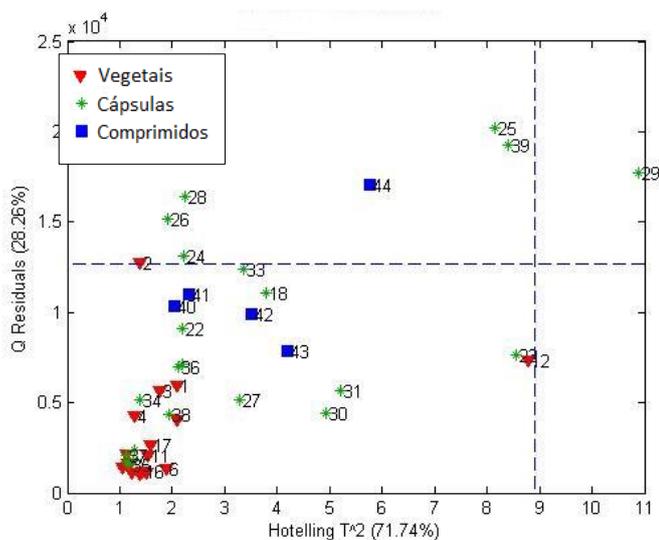


Figura 27. Gráfico de T^2 de *Hotelling* x resíduos Q.

Na Figura 28 está apresentado o gráfico de escores de PC1 *versus* PC2, no que é possível observar a formação de dois agrupamentos. O agrupamento circulado de azul corresponde às amostras cujos espectros apresentaram sinais correspondentes aos metabólitos do *Ageratum conyzoides*, tanto nos casos de mistura das espécies, quanto nos espectros em que apareceram apenas íons desse vegetal. Já o agrupamento circulado de vermelho corresponde às duas amostras de *Senna spectabilis*. As demais amostras, portanto, são referentes aos espectros que continham íons apenas dos metabólitos do *Hypericum perforatum*. É possível observar que essas amostras estão relativamente dispersas entre si, o que pode ser causado pelos diferentes excipientes utilizados nos medicamentos. Por exemplo, dentre as amostras que possuem os excipientes listados na embalagem ou na bula, é possível notar que algumas delas se encontram no lado positivo de PC2 e possuem como excipiente apenas hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), enquanto as amostras no lado negativo de PC2 possuem uma lista maior de excipientes, os quais incluem estearato de magnésio, dióxido de silício, lactose e celulose. Além disso, sabe-se que as diferentes condições de cultivo podem influenciar na concentração dos metabólitos nas plantas, o que também pode ser um fator responsável pela separação das amostras.

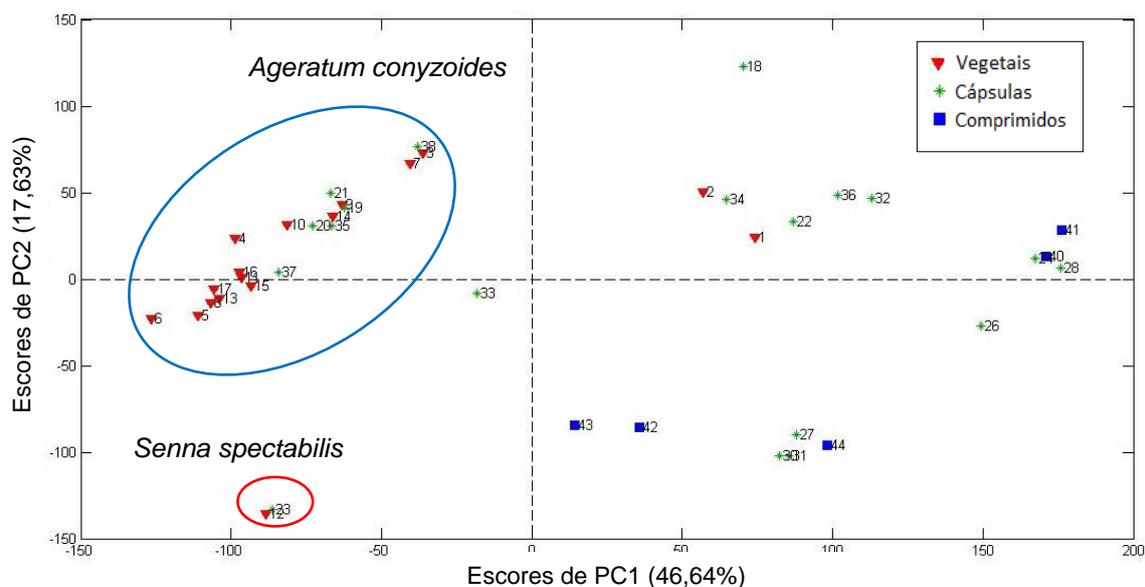


Figura 28. Gráficos de escores de PC1xPC2 dos espectros PS-MS das amostras de erva de São João.

Os pesos (*loadings*) das variáveis estão ilustrados na Figura 29. Na Figura 29a estão apresentados os pesos de PC1. A discriminação das amostras ocorreu devido à contribuição positiva dos sinais referentes ao *Hypericum perforatum*, ou seja, às amostras consideradas autênticas, em m/z 537 e 575, atribuídos ao íon protonado e ao aduto $[M+K]^+$ da hiperforina, respectivamente, além do íon de m/z 553, atribuído à furohiperforina, e um íon de m/z 591. Os íons que contribuíram de forma negativa em PC1 correspondem ao flavonoide 7-hidroxi-5,6,8,5'-tetrametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona (m/z 403), à 5,6,7,8,5'-pentametoxi-3',4'-metilenodioxiflavona (m/z 417) e à 5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona (m/z 433), todos característicos do *Ageratum conyzoides*.

Em PC2, os sinais que contribuíram positivamente para a separação das amostras corresponderam tanto aos metabólitos do *Ageratum conyzoides* (m/z 300, 403, 417 e 433), quanto do *Hypericum perforatum* (m/z 523), além do sinal de m/z 594. No modo negativo, os sinais que mais contribuíram foram os de m/z 298 e 326, atribuídos à *Senna spectabilis*, além de íons do *Hypericum perforatum* (m/z 537, 559 e 575) e os sinais de m/z 549 e 593.

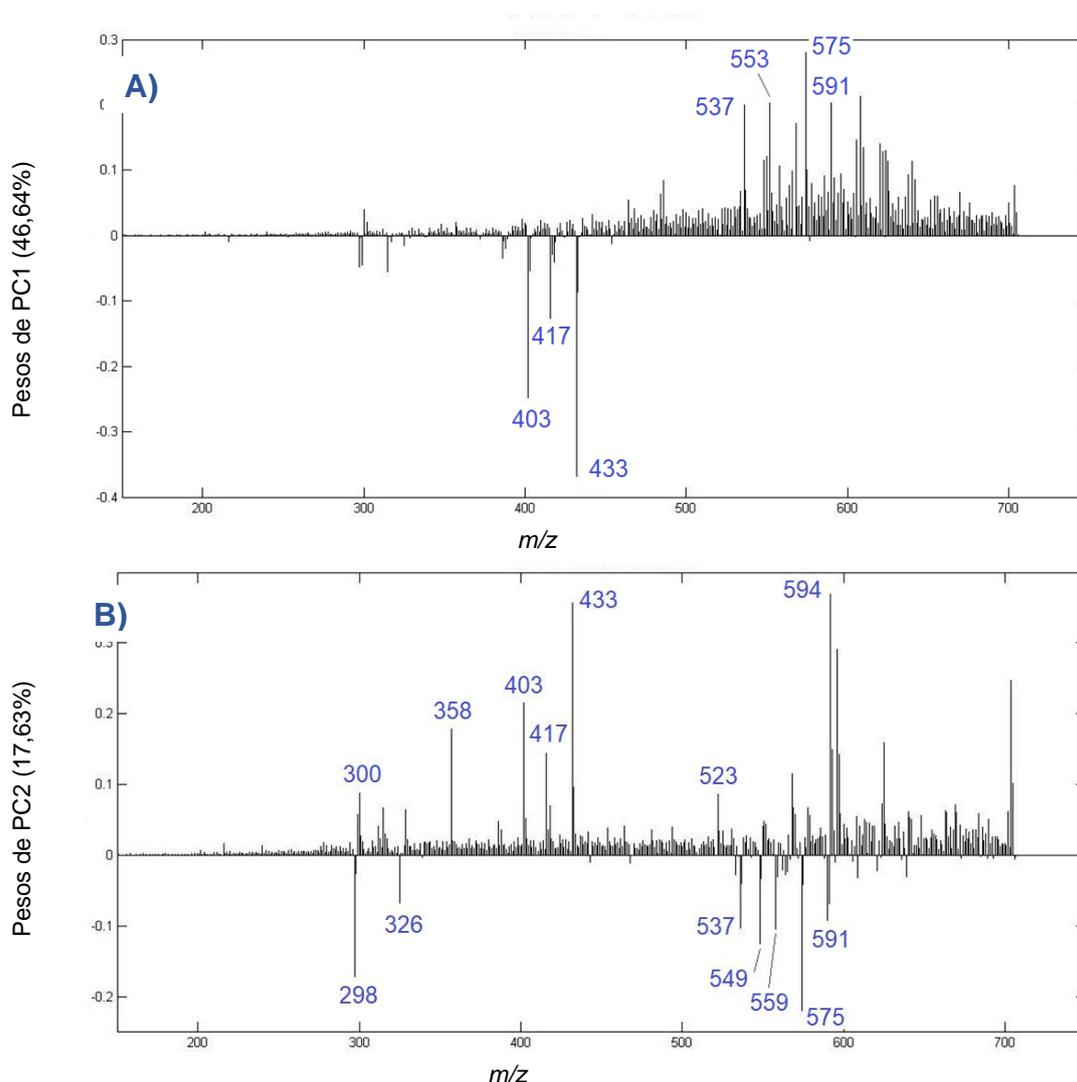


Figura 29. Gráficos de pesos de a) PC1 e b) PC2.

3.4.2 Análises por TXRF

Nesse trabalho, optou-se por trabalhar com suspensão ao invés do método convencional, a digestão ácida, devido a vantagens como: menor custo, já que não são utilizados grandes volumes de ácidos, além de minimizar os erros causados por perdas por volatilização; rapidez no preparo de amostra; e possibilidade de quantificação de cloreto, brometo e iodeto, que não podem ser determinados quantitativamente quando se utiliza ácidos no preparo de amostra. (La Calle, de *et al.*, 2013).

3.4.2.1 Planejamento fatorial fracionário para otimização das análises por TXRF

O efeito das variáveis massa de amostra, proporção de Triton X114, tempo de ultrassom (US), concentração do PI (Ge) e volume colocado no disco sobre o procedimento de preparo de amostra e análises foram avaliados por meio de um planejamento fatorial 2_{III}^{5-2} . Foi calculada a porcentagem de recuperação dos elementos na amostra de suspensão com relação às suas concentrações na amostra digerida. Na Tabela 4, estão apresentados os valores de resposta múltipla para os elementos: P, K, Ca, Ti, Mn, Ni, Cu, Zn, Rb e Sr.

Tabela 4. Resultados do planejamento fatorial 2_{III}^{5-2} para otimização das análises por TXRF.

Ensaio	Massa (mg)	Triton X114 (%)	Tempo de US (min)	[Ge] (mg L ⁻¹)	Volume no disco (μL)	Resposta múltipla
1	10	0	0	2,5	10	5,21
2	30	0	0	1,0	5	5,88
3	10	0,5	0	1,0	10	4,75
4	30	0,5	0	2,5	5	5,94
5	10	0	10	2,5	5	5,83
6	30	0	10	1,0	10	11,0
7	10	0,5	10	1,0	5	4,57
8	30	0,5	10	2,5	10	7,10
9	10	0	0	2,5	10	5,05
10	30	0	0	1,0	5	8,76
11	10	0,5	0	1,0	10	4,64
12	30	0,5	0	2,5	5	5,01
13	10	0	10	2,5	5	5,65
14	30	0	10	1,0	10	6,73
15	10	0,5	10	1,0	5	3,98
16	30	0,5	10	2,5	10	5,07

A partir dos dados desta tabela, foi construído um gráfico de Pareto (Figura 30), o qual indica que os fatores massa de amostra e proporção de Triton apresentaram efeitos significativos. Como o fator massa apresentou efeito positivo, indica que, quando a massa de amostra é aumentada de 10 mg para 30 mg, há um aumento no valor da resposta múltipla. Entretanto, dado que a espessura do filme no disco deve ser a menor possível, pela pequena distância entre o porta-amostra e o detector, não

foram realizados testes com valores de massa superiores, sendo escolhido o valor de 30 mg para as análises posteriores. Por outro lado, como a proporção de Triton apresentou efeito negativo, à medida em que se aumenta de 0% para 0,5%, há uma diminuição da resposta múltipla. Apesar de triton ser amplamente utilizado para melhorar a estabilidade de suspensões, mesmo em baixas concentrações, ele pode aumentar a espessura do filme e o background dos espectros. Esse efeito negativo pode estar relacionado a esse fato, uma vez que para elementos em menores concentrações, o aumento do sinal de fundo é crítico na quantificação.

Os demais fatores, concentração do PI, tempo de US e volume de amostra no disco, não apresentaram influência significativa, portanto as condições escolhidas foram: [Ge] 1,0 mg L⁻¹, volume de amostra no disco 5 µL e não utilização do processador ultrassônico.

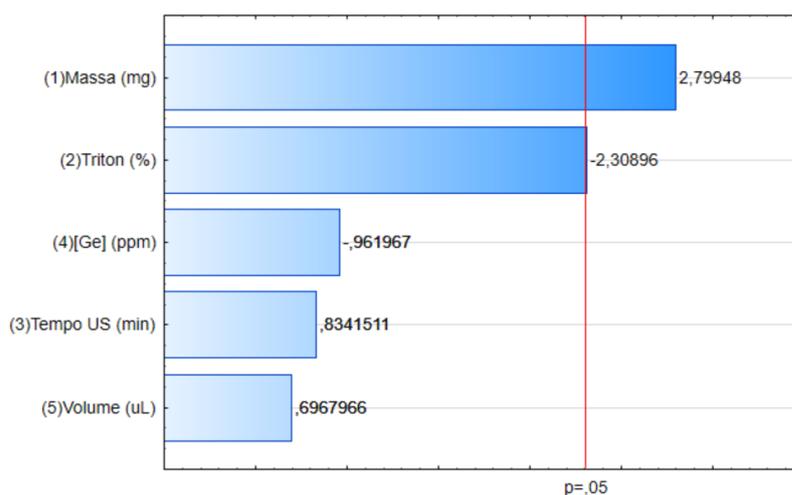


Figura 30. Gráfico de Pareto com as respostas múltiplas obtidas a partir do planejamento fatorial 2_{III}^{5-2} empregado para otimização do método de análise por TXRF.

3.4.2.2 Validação do método

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas através do desvio padrão relativo (DPR) e do erro relativo (ER) utilizando um material de referência certificado, NIST 1573a – folhas de tomate.

Inicialmente, utilizou-se o procedimento determinado pelo planejamento experimental, ou seja, sem a utilização de Triton X114 para a estabilização das suspensões. Entretanto, não foi observada boa estabilidade das partículas tanto na

solução quanto no disco. Além disso, os valores de DPR e ER foram muito elevados para alguns elementos, como observado na Tabela 5. O procedimento foi realizado com 8 repetições independentes, porém uma replicata foi considerada *outlier* e retirada.

Tabela 5. Resultados de precisão e veracidade do método de análise por TXRF utilizando o CRM NIST 1573a, n = 7.

Elemento	Concentração média (mg kg ⁻¹)	DPR (%)	ER (%)
P	2706	12,3	25,2
S	7640	9,6	-20,4
Cl	2955	47,0	-55,2
K	18606	24,4	-30,5
Ca	36849	7,7	-27,0
Mn	264,5	10,4	7,4
Cu	3,760	11,4	-19,9
Zn	30,68	8,6	-0,9
Br	810,7	38,2	-37,6
Sr	71,11	36,8	-6,9

O procedimento foi realizado novamente utilizando 0,5% de Triton X114, para melhor dispersão das partículas. Observando a Tabela 6, é possível notar que após a adição do Triton houve uma melhora na precisão (DPR) e exatidão (ER) para quase todos os elementos. Portanto, optou-se por utilizar 0,5% de Triton X114 nas etapas posteriores. O DPR variou de 5,2% para o Cu até 7,2% para o Cl, e os maiores valores de ER foram para P, S e Cl. Os erros relativos maiores para elementos mais leves como P, S e Cl são comuns nessa técnica, pois várias transições ocorrem na região entre 1 e 5 keV, tornando o espectro mais complexo. (Resende, 2015) O limite de quantificação (LQ) foi calculado multiplicando os valores de LD por 3,3.

A partir desses resultados, verificou-se que o método de análise de suspensões utilizando Triton X-114 como agente estabilizante apresenta desempenho satisfatório para a determinação dos constituintes inorgânicos. Destaca-se que empregando esse método foi possível quantificar elementos com Cl e Br, que não podem ser determinados quando se emprega procedimentos de digestão ácida.

Tabela 6. Resultados de precisão e veracidade do método de análise por TXRF com Triton X114 utilizando o CRM NIST 1573a, n = 8.

Elemento	Concentração média (mg kg ⁻¹)	DPR(%)	ER(%)	LQ (mg kg ⁻¹)
P	2554	5,7	18,2	159
S	7874	5,4	-18,0	91,7
Cl	5653	7,2	-14,4	58,7
K	24518	6,1	-8,4	26,5
Ca	44369	6,0	-12,0	17,0
Mn	232,4	5,5	-5,67	2,5
Cu	4,290	5,2	-8,8	1,1
Zn	29,06	6,8	-6,1	1,0
Br	1251	6,6	-3,8	0,8
Sr	84,69	6,1	-0,4	0,9

3.4.2.3 Análises das amostras de Erva de São João

Após otimização das condições de preparo de amostras, foi realizada a aquisição dos dados para todas as amostras de Erva de São João. O fragmento de um dos espectros está apresentado na Figura 31.

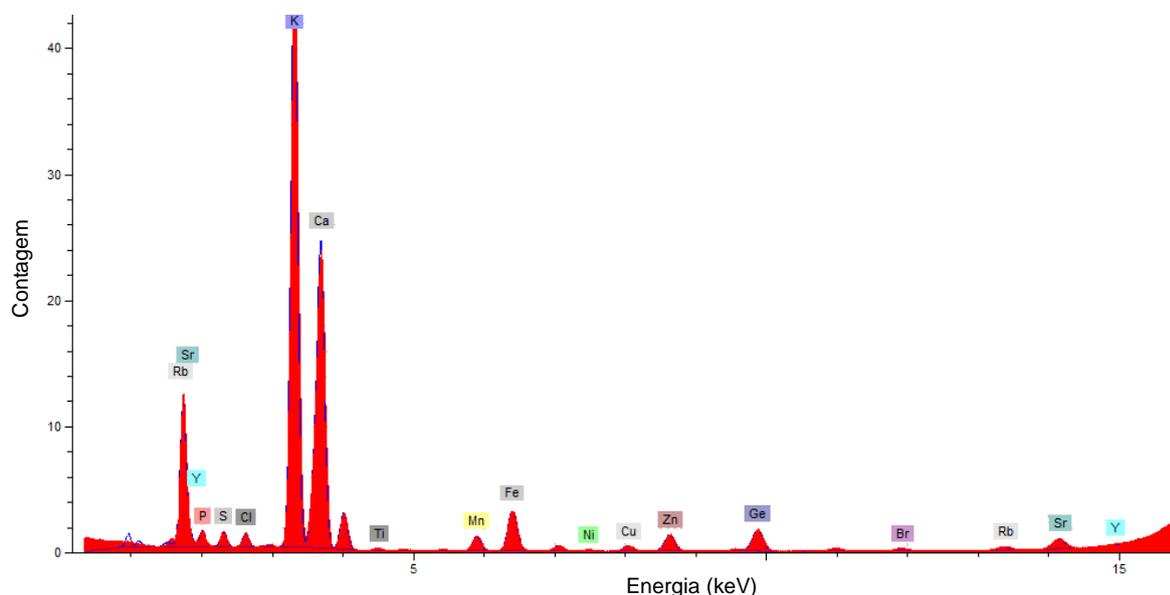


Figura 31. Fragmento de um espectro de amostra de erva de São João obtido por TXRF.

As faixas de concentrações determinadas para os analitos, em mg kg⁻¹, estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Faixas de concentração os elementos determinados por TXRF nas amostras de erva de São João (n=43).

Elemento	Faixa de concentração (mg kg ⁻¹)	Elemento	Faixa de concentração (mg kg ⁻¹)
P*	0,172 – 45,4	As	< LQ – 2,18
S*	0,279 – 2,60	Br	3,23 – 74,9
Cl*	0,430 – 14,6	Rb	1,74 – 118
K*	5,77 – 34,3	Sr	< LQ – 512
Ca*	0,369 – 60,4	Y	< LQ – 13,2
Ti	< LQ – 2898	Cs	< LQ – 27,7
Mn	6,78 – 1268	Ba	< LQ – 169
Ni	< LQ – 10,9	Ce	< LQ – 46,9
Cu	3,91 – 31,4	Pb	< LQ – 2,47
Zn	10,7 – 157		

* g kg⁻¹

Além dos elementos apresentados, foi detectado Ga em 8 amostras, porém com concentrações abaixo do LQ em todas elas. Foi detectado também Fe em todas as amostras. Entretanto, os valores de concentração desse elemento não são confiáveis no TXRF por ele ser detectado constantemente como contaminante nos discos de quartzo. E, por fim, Cr também foi detectado em todas as amostras, porém, esse elemento pode ser contaminante do moinho de bolas e, sendo assim, seus valores de concentração não foram considerados.

Elementos tóxicos como As e Pb foram encontrados em algumas amostras em concentrações relativamente altas. No caso de As, a concentração máxima estava um pouco acima do limite estabelecido pela Farmacopeia americana (USP – *United States Pharmacopeia*) para medicamentos orais (1,5 mg kg⁻¹), e a concentração máxima de Pb estava quase cinco vezes acima do limite (0,5 mg kg⁻¹). (USP, 2017) Como esses metais podem acumular no organismo, foi realizada uma avaliação mais criteriosa, e as amostras contendo esses elementos foram analisadas por ICP-MS, confirmando o resultado das concentrações de As e Pb encontrados por TXRF. Em um trabalho realizado no Brasil em 2020, os autores determinaram a presença de alguns metais em material seco de três medicamentos naturais (*Cordia salicifolia*, *Chiococca alba* (L.) Hitchc., e *Echites peltata*), em que foram encontradas

concentrações de Pb acima do limite da USP em todas as amostras analisadas. (Tschinkel *et al.*, 2020)

De maneira geral, todos os elementos apresentados na Tabela 7 foram encontrados nas três formas de apresentação das amostras (vegetais, cápsulas e comprimidos) em concentrações diversas, com exceção de Cs, que foi encontrado em apenas três amostras de vegetais (adquiridas em Belo Horizonte).

Como já foi constatado usando espectrometria de massas, as amostras apresentam diferentes espécies em suas composições que, por sua vez, absorvem macro e micronutrientes de maneiras distintas. Considerando-se, portanto, apenas as amostras de *Hypericum perforatum*, as faixas de concentrações podem ser distintas das apresentadas anteriormente. Na Tabela 8, estão apresentadas as faixas de concentração das amostras contendo apenas *Hypericum perforatum*.

Tabela 8. Faixas de concentração determinadas para os elementos nas amostras de erva de São João contendo apenas *Hypericum perforatum* (n=21).

Elemento	Faixa de concentração (mg kg ⁻¹)	Elemento	Faixa de concentração (mg kg ⁻¹)
P*	0,423 – 45,4	As	< LQ – 2,18
S*	0,279 – 2,60	Br	3,26 – 22,7
Cl*	0,430 – 14,6	Rb	3,68 – 46,2
K*	5,77 – 33,9	Sr	< LQ – 177
Ca*	0,369– 60,4	Y	< LQ – 4,40
Ti	< LQ – 2898	Cs	< LQ
Mn	8,29 – 1268	Ba	< LQ – 169
Ni	< LQ – 6,95	Ce	< LQ – 18,2
Cu	< LQ – 31,4	Pb	< LQ – 1,93
Zn	10,7 - 157		

* g kg⁻¹

Como pode ser observado nesta tabela, nenhuma amostra de *Hypericum perforatum* apresentou o elemento Cs. E os elementos As e Pb ainda estavam acima do limite estabelecido pela USP em algumas amostras.

Os elementos detectados são condizentes com os relatos da literatura. Owen *et al.* (2016) analisaram amostras de erva de São João por ICP-OES. Além dos elementos detectados nesse trabalho, os autores também quantificaram Al, B, Cd, Mg,

Mo e Pt. Tais elementos não foram determinados por TXRF, porque Al, B e Mg são elementos muito leves e não é possível quantificá-los com esta técnica, além da ocorrência de sobreposição de sinais, pois a linha $L\beta$ do Cd na mesma região da $K\alpha$ do K. O Mo também não pode ser quantificado por estar presente no tubo de radiação do equipamento. E Pt não foi detectado em nenhuma amostra. De forma recíproca, alguns elementos quantificados por TXRF, como os halogênios, não são determinados por ICP-OES.

3.4.2.4 Análise de componentes principais (PCA)

Os dados relativos às concentrações dos elementos utilizando todas as amostras foram inicialmente organizados em uma matriz de 44 linhas por 21 colunas para a análise por PCA. Para esse modelo, o pré-processamento utilizado foi autoescalamento, com a finalidade de atribuir pesos iguais a todas as variáveis, independente da sua escala natural. Inicialmente, assim como no modelo com dados de PS-MS, foi realizada a análise da presença de *outliers* pelo gráfico de T^2 de Hotelling *versus* resíduos Q, com 95% de confiança, em que não foi detectada nenhuma amostra anômala. O gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 está apresentado na Figura 32. Como é possível observar, houve a discriminação de três amostras das demais. Em PC1 houve, principalmente, a discriminação de uma amostra (adquirida em Belo Horizonte), no lado positivo, das demais. Essa discriminação se deu pelas elevadas concentrações de alguns elementos (Rb, Sr, Y, Cs, Ba, Ce e Pb) em contraste aos demais. E, em PC2, duas amostras de comprimidos foram agrupadas no lado positivo, ambas produzidas em Wellingborough – Reino Unido. A discriminação se deu pelas elevadas concentrações de elementos como P, Ca, Ti e Ni em contraste às menores concentrações de Cl, Cu e As. Esse mesmo perfil de agrupamentos foi observado na terceira componentes principal. Entretanto, devido às elevadas influências dessas amostras no modelo há uma dificuldade em se observar o comportamento das demais amostras nas três primeiras componentes principais. Devido a isso, um novo modelo PCA foi construído sem essas amostras.

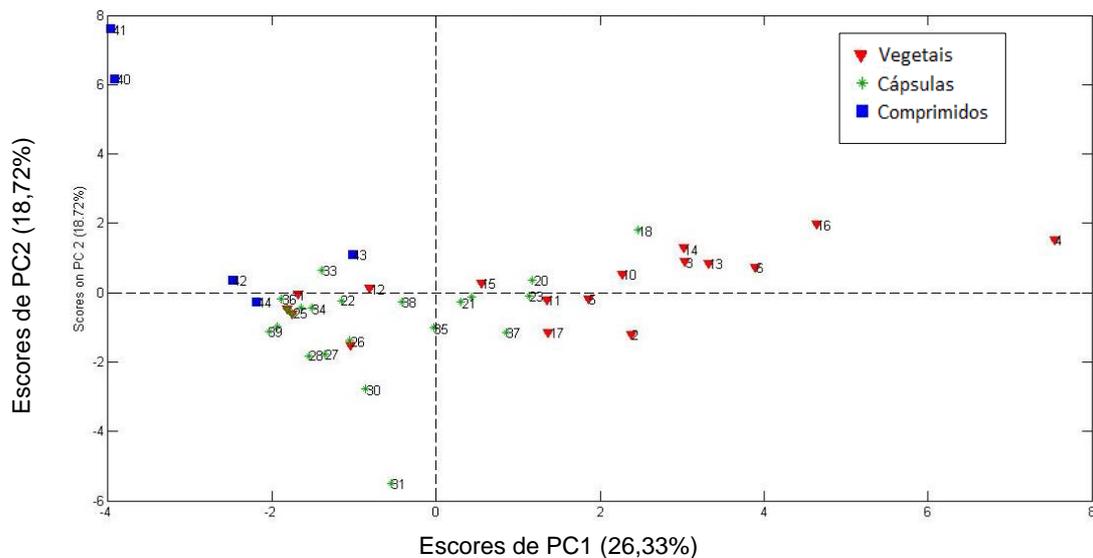


Figura 32. Escores de PC1xPC2 dos dados obtidos a partir das análises no TXRF.

Foi construído o novo modelo PCA, o qual explicou 45,86% da variância utilizando-se 2 componentes principais. As demais componentes não continham informações relevantes para a separação dos agrupamentos e, portanto, não foram consideradas. Para esse modelo também foi utilizado o autoescalamento como pré-processamento. Na Figura 33, está apresentado o gráfico de escores de PC1xPC2.

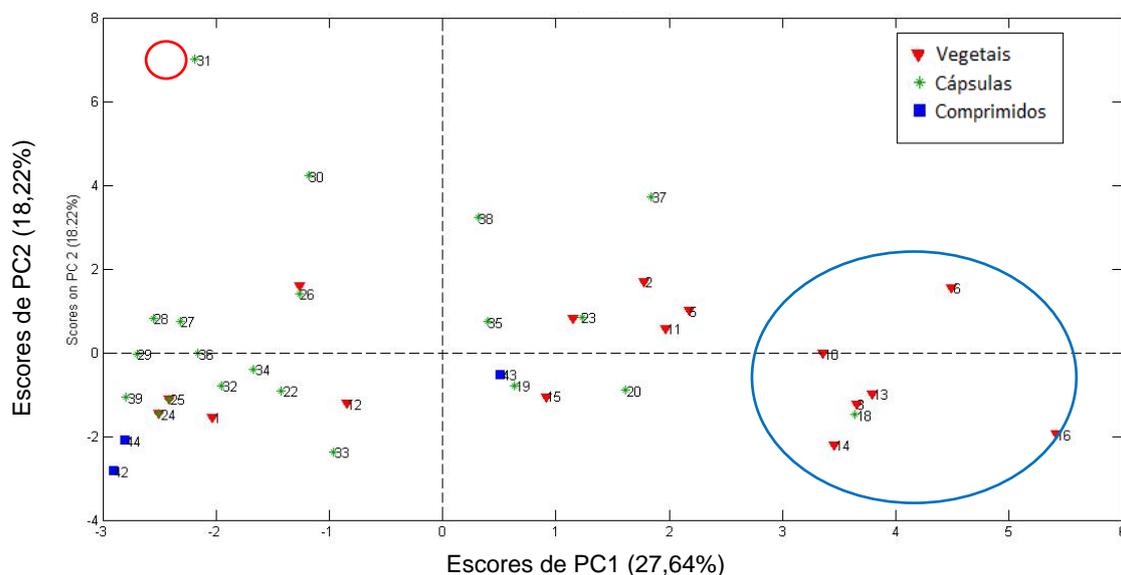


Figura 33. Gráfico de escores de PC1xPC2 dos dados obtidos a partir das análises no TXRF.

Pelo gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 é possível observar a discriminação de alguns grupos de amostras. Em PC1, responsável por explicar 27,64% da variância, houve a formação de um agrupamento no lado positivo composto por algumas amostras adquiridas em diferentes cidades do Brasil (Belo Horizonte, Patos de Minas, Itajubá e São Paulo).

Em PC2, com 18,22% da variância explicada, ocorreu a separação, no lado positivo, da amostra 31, da marca Alternative Pharma, produzida em Descalvado – SP.

Na figura 34 estão apresentados os gráficos de pesos das variáveis para as duas primeiras PCs.

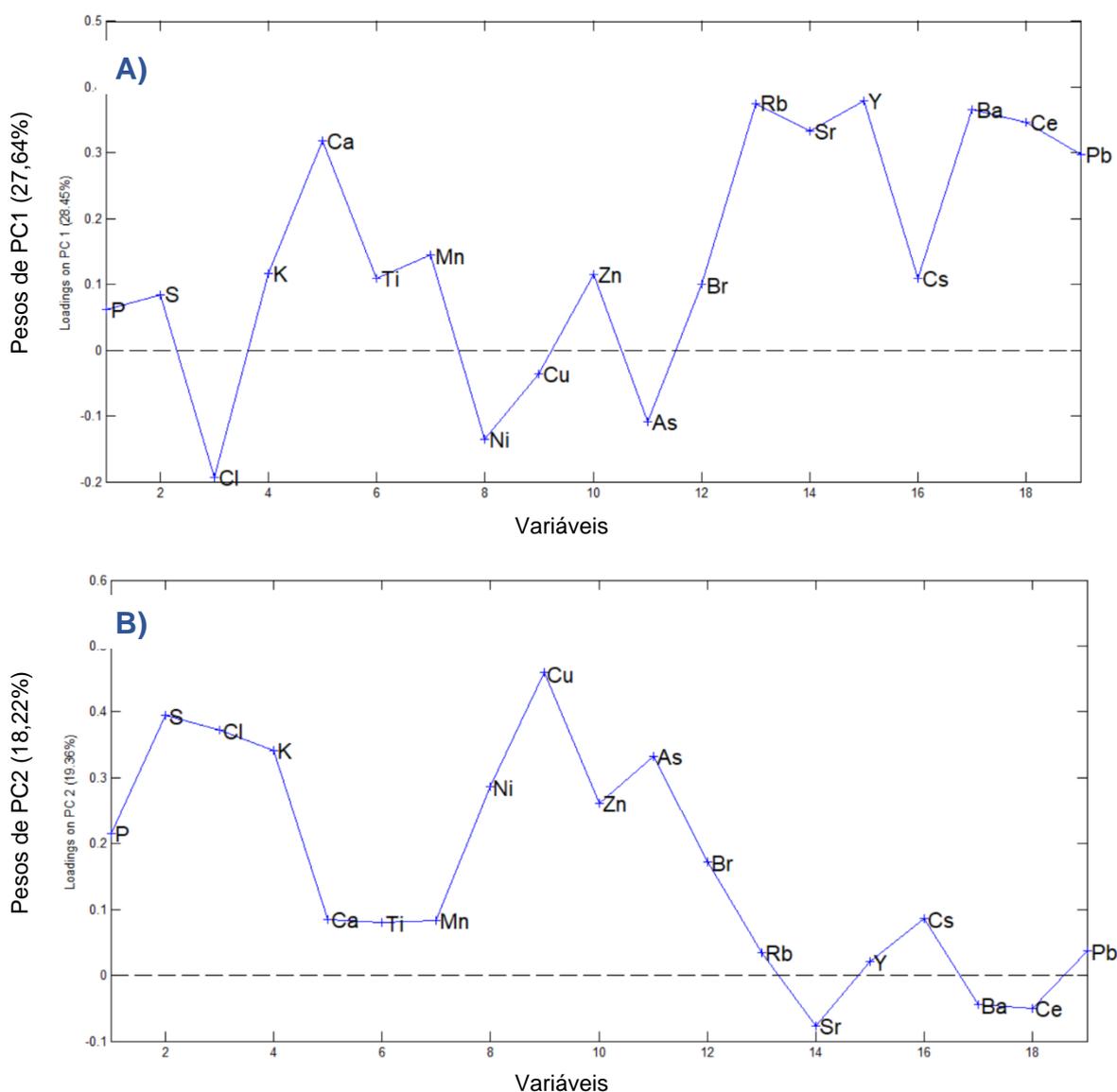


Figura 34. Gráficos de pesos de a) PC1 e b) PC2.

Pelo gráfico dos pesos de PC1 (Figura 34a), é possível observar que a discriminação das amostras no lado positivo se deu principalmente pela contribuição dos elementos Ca, Rb, Sr, Y, Ba, Ce e Pb. No lado negativo, os elementos responsáveis pela discriminação foram Cl, Ni e As.

Em PC2, os elementos que mais contribuíram positivamente para a discriminação foram principalmente S, Cl, K e Cu, devido às suas elevadas concentrações, enquanto no lado negativo a separação se deu pela contribuição de Sr, Ba e Ce (Figura 34b).

Os modelos PCA construídos com os dados elementares mostraram uma tendência de separação das amostras com relação à distribuição geográfica dos vegetais. Entretanto, como já foi constatado, as amostras apresentam diferentes espécies em suas composições que, por sua vez, absorvem macro e micronutrientes de maneira distinta. Portanto, além das amostras serem de localizações diferentes, elas contêm espécies de vegetais diferentes, sendo dois fatores que influenciam nas concentrações dos elementos. Assim, foi construído um novo modelo PCA somente com as amostras que continham apenas *Hypericum perforatum*, utilizando-se 2 componentes principais, responsáveis por explicar 53,90% da variância total dos dados. O gráfico de escores estão apresentados na Figura 35.

No gráfico de PC1 *versus* PC2 (Figura 35) é possível observar uma maior discriminação entre uma amostra de cápsula (12) no lado positivo de PC1, de duas amostras de comprimido (17 e 18) no lado negativo. A amostra com numeração 12 nesse gráfico é a da marca Alternative Pharma, produzida em Descalvado – SP (com numeração 31 no gráfico de PCA do modelo completo), enquanto as amostras 17 e 18 são ambas produzidas em Wellingborough – Inglaterra. Em PC2, há principalmente a discriminação das amostras 2 e 3 das demais. A amostra 2 corresponde a uma amostra de vegetal produzida em Esmeraldas – MG, enquanto a 3 corresponde a uma amostra de cápsula adquirida em Belo Horizonte, mas sem informações sobre o local de produção.

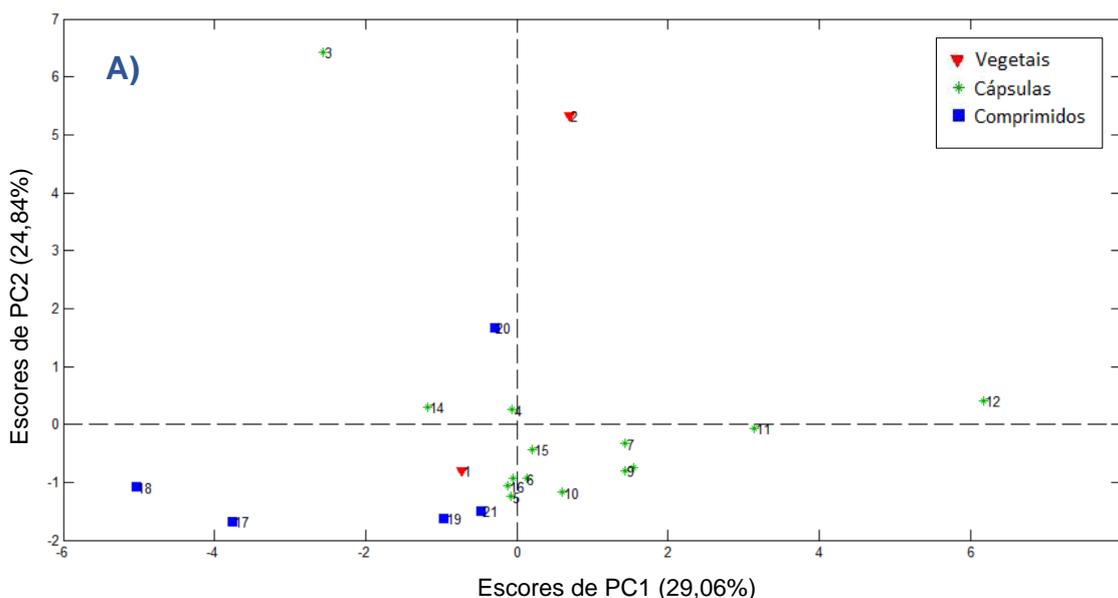


Figura 35. Gráficos de escores de PC1xPC2 dos dados obtidos a partir das análises no TXRF apenas com amostras de *Hypericum perforatum*.

Os gráficos de pesos estão apresentados na Figura 36.

Pelo gráfico de pesos de PC1 (Figura 36a) é possível observar que os elementos que contribuíram positivamente para a discriminação foram S, Cl, K, C e As, em elevadas concentrações na amostra 12, em oposição às elevadas concentrações de P, Ca e Ti nas amostras de Wellingborough. Já em PC2 (Figura 36b), os elementos que tiveram maior contribuição positiva foram Mn, Zn, Rb, Sr, Y, Ba e Pb, que apresentaram concentrações elevadas nas amostras 2 e 3, em oposição principalmente aos elementos P, Cl, K, Ca, Ti e Ni.

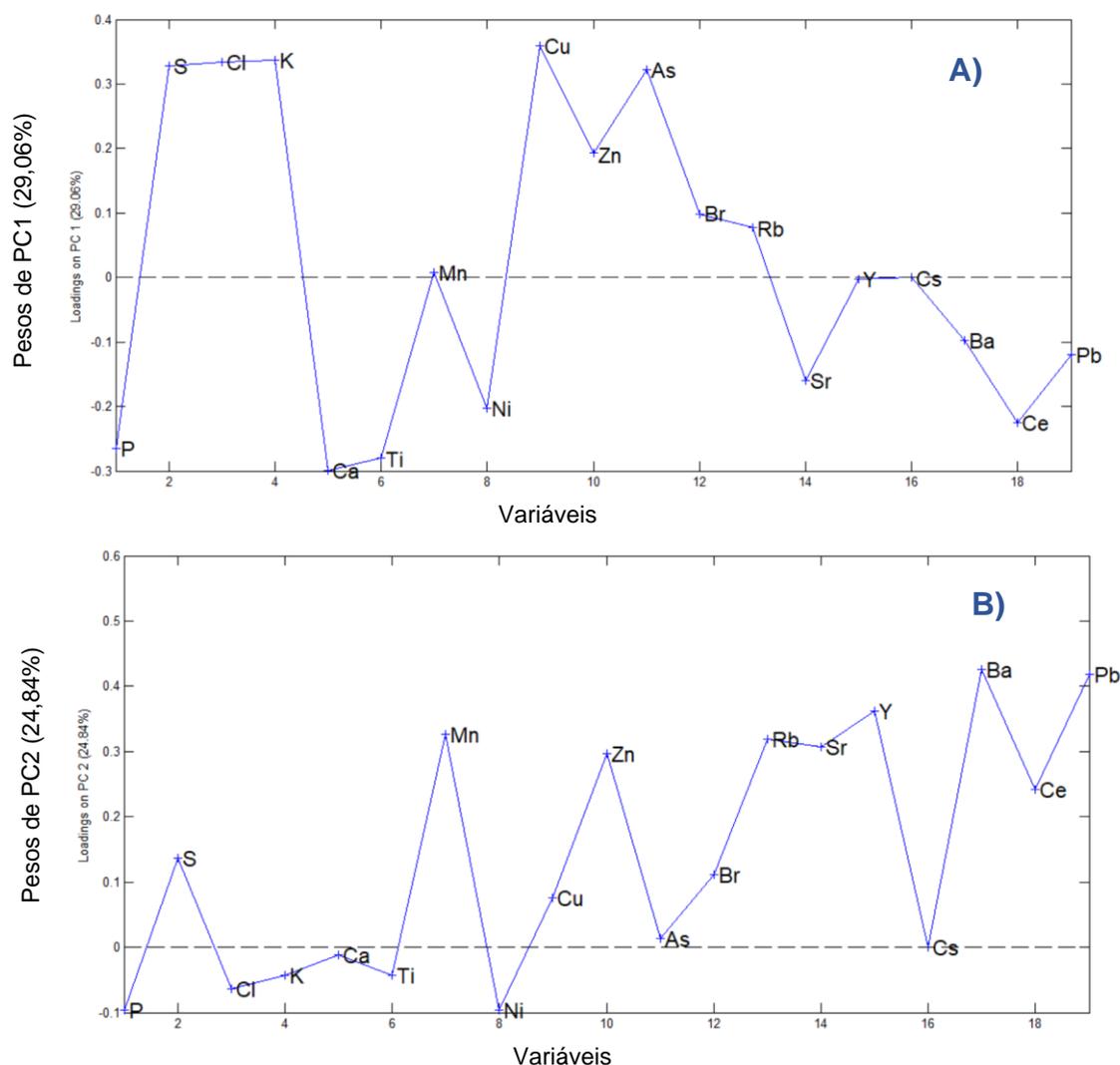


Figura 36. Gráficos de pesos de a) PC1 e b) PC2 do modelo contendo dados de TXRF apenas com amostras de *Hypericum perforatum*.

3.4.3 Fusão de dados

Com o intuito de se obter um conhecimento mais completo sobre as amostras analisadas, avaliando a sinergia entre dados moleculares e atômicos, foi construído um modelo de fusão dos dados de PS-MS com os de TXRF. Foi adotada a estratégia mais simples e comum na literatura, a fusão de dados de baixo nível, ou seja, os dados foram simplesmente concatenados, devidamente pré-processados e modelados. Essa estratégia foi adotada, porque nas fusões de nível médio e alto há uma grande dificuldade na interpretação e análise dos pesos, já que os resultados do modelo final são expressos com relação às influências de cada componente principal original, e

não aos resultados de cada técnica em si. Portanto, as variáveis referentes a cada técnica foram tratadas individualmente e, após a fusão dos dados, todas as variáveis foram autoescaladas a fim de compensar os efeitos das diferentes naturezas das variáveis fundidas.

Inicialmente, foi verificado a possível presença de amostras anômalas (*outliers*) através do gráfico de T^2 de Hotelling *versus* resíduos Q, com 95% de confiança. Como pode ser observado na Figura 37, nenhuma amostra se encontrou no quadrante superior direito e, portanto, nenhuma amostra foi considerada *outlier*.

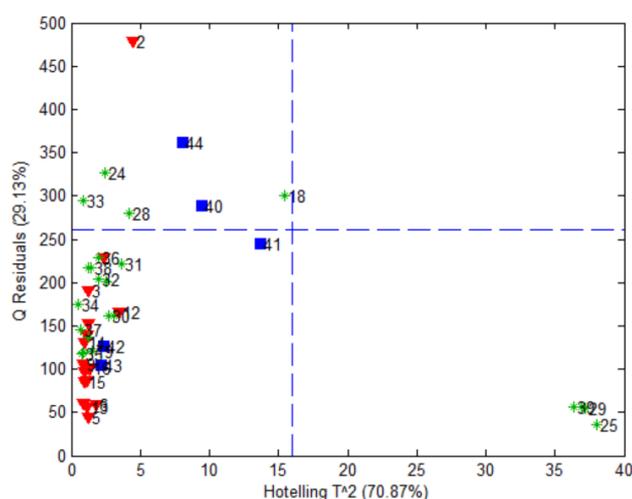


Figura 37. Gráfico de T^2 de Hotelling x resíduos Q.

Foi construído, portanto, um modelo PCA que explicou 55,92% da variância total dos dados, com duas componentes principais. As demais PCs não apresentaram resultados relevantes e por isso não foram utilizadas. O gráfico dos escores de PC1 *versus* PC2 está apresentado na Figura 38.

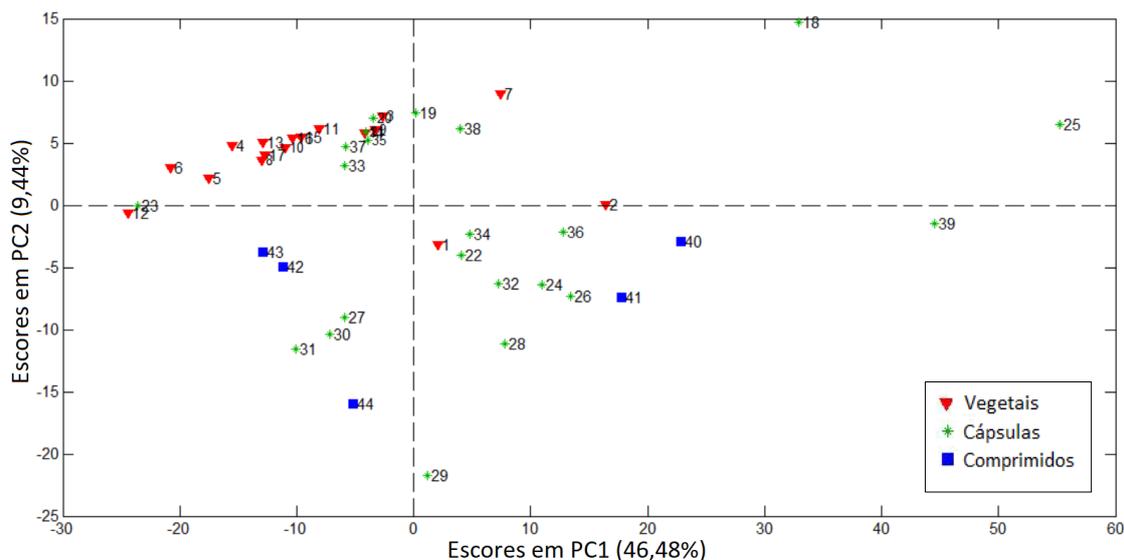


Figura 38. Escores de PC1xPC2 dos dados obtidos a partir de um modelo PCA de fusão de dados de PS-MS e TXRF.

Em PC1, que explica 46,48% da variância do modelo, ocorreu, basicamente, a discriminação de 3 amostras de cápsulas, no lado positivo, em relação às demais amostras. Dessas 3 amostras, uma (amostra 18) é considerada autêntica, ou seja, contém apenas *Hypericum perforatum*, uma amostra é considerada adulterada (amostra 39) por conter *Ageratum conyzoides* em sua formulação, e a amostra 25 havia sido retirada do modelo PCA anterior (com dados de PS-MS), por ser um *outlier*, mas pelo espectro de massas ela é considerada uma amostra autêntica. Pode-se observar também uma aglomeração de amostras no quadrante superior esquerdo, semelhante ao que ocorreu no modelo apenas com dados de PS-MS, referente a amostras consideradas adulteradas. Com relação à localização geográfica de produção de cada uma dessas amostras, de acordo com os rótulos, a amostra 25 foi produzida nos EUA, a 39 no estado de São Paulo e para a amostra 18 não há informação.

Em PC2, ocorreu principalmente uma discriminação entre as amostras 18, no lado positivo, e amostra 29, no lado negativo. Como mencionado anteriormente, a amostra 18 é considerada autêntica, e a amostra 29, que também havia sido retirada do modelo anterior (com dados de PS-MS) por ser um *outlier*, é considerada autêntica. A amostra 18 não contém informação do local de produção, como já mencionado, e a amostra 29 foi produzida em Belo Horizonte.

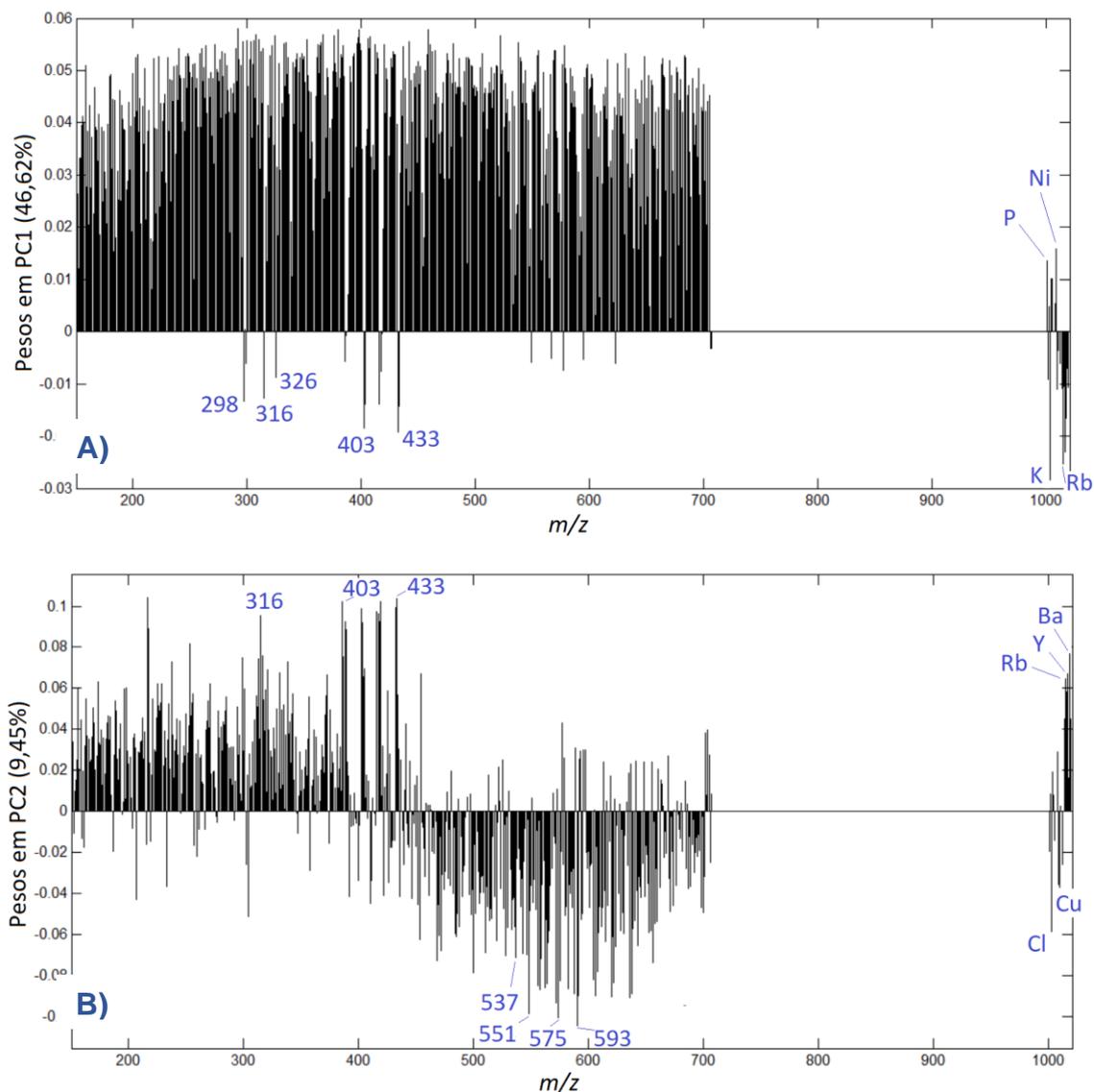


Figura 39. Gráficos de pesos de a) PC1 e b) PC2 para o modelo PCA obtido por fusão de dados.

Na Figura 39 estão apresentados os gráficos dos pesos da PCA. Como as variáveis tiveram de ser autoescaladas após a fusão, os sinais de massas perderam a proporção entre os sinais de maior intensidade com relação ao ruído. Porém, ainda assim, foi possível observar as variáveis que mais contribuíram para as discriminações das amostras. Em PC1, é possível observar que houve uma contribuição negativa das variáveis de m/z 298 e 326, características da *Senna spectabilis*, e de m/z 316, 403 e 433, características da *Ageratum conyzoides*, juntamente com os elementos K e Rb, em oposição aos demais sinais de massas e aos elementos P e Ni. Já em PC2, houve uma contribuição positiva dos sinais de m/z

316, 403 e 433, junto com os elementos Rb, Y e Ba, e contribuição negativa dos sinais de m/z 537, 551, 575 e 593, somados aos elementos Cl e Cu.

A partir desses resultados, pode-se notar que a fusão de dados contribuiu para melhor visualizar a discriminação das amostras e deverá ser ainda mais útil quando o modelo for complementado com um número maior de amostras.

3.5 Conclusões parciais

Esta parte da tese teve como objetivo analisar amostras de *Hypericum perforatum* L. adquiridas em comércios de diversas cidades brasileiras e em outros países, por PS-MS e TXRF. Portanto, nesse contexto, 43 amostras (vegetais, cápsulas e comprimidos) comercializadas como erva de São João foram analisadas juntamente com uma amostra previamente conhecida como *Ageratum conyzoides*, que, assim como a *Hypericum perforatum*, também possui o nome popular de erva de São João no Brasil.

Pelas análises por PS-MS foi possível identificar amostras que continham diferentes princípios ativos, além do *Hypericum perforatum*, como a mistura desse vegetal com o *Ageratum conyzoides*, além de amostras que continham apenas o *Ageratum conyzoides* e ainda amostras com uma terceira espécie, o *Senna spectabilis*. O modelo PCA discriminou os grupos de amostras com relação aos vegetais presentes. Todas essas identificações foram possíveis devido aos sinais característicos de metabólitos dessas espécies.

Pelas análises por TXRF foi possível identificar e quantificar 19 elementos presentes nas amostras. Em algumas amostras, os metais tóxicos Pb e Ni estavam presentes em níveis elevados. Através de um modelo PCA foi possível observar uma tendência de discriminação das amostras com relação às suas localizações geográficas.

Foi testada a estratégia de fusão de dados das técnicas PS-MS e TXRF para a construção de um novo modelo PCA. Nesse modelo, foi observado uma tendência de discriminação das amostras com relação às espécies presentes, como no modelo com dados do PS-MS, e ainda, dentro desses agrupamentos, ocorreu a discriminação com relação aos elementos presentes nas amostras.

4 AVALIAÇÃO DE AUTENTICIDADE DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE LYCIUM BARBARUM (GOJI BERRY)

4.1 Introdução

Alguns alimentos apresentam elevado valor nutricional por conter uma grande quantidade de nutrientes, como vitaminas, minerais, fibras e proteínas, sendo muito benéficos à saúde e capazes de prevenir doenças. Esses alimentos, que podem ser popularmente conhecidos em alguns países como “superalimentos”, estão sendo cada vez mais consumidos atualmente, devido à grande procura por produtos naturais como substitutos de medicamentos de origem sintética. Um exemplo de alimento conhecido por seu elevado valor nutricional é o fruto de Goji berry (*Lycium barbarum* L.) (Figura 40), que pode ser consumido como fruta, matéria-prima de alimentos, chá ou suplemento alimentar (Liu *et al.*, 2021). *Lycium barbarum* L., também conhecido como *wolfberry*, *lycii fructus* ou *goji*, é um arbusto de folha caduca solanácea, pertencente à família das *Solanaceae*, com frutos de 1 - 2 cm de comprimento, de cor vermelho-alaranjada (Donno *et al.*, 2015).



Figura 40. Frutos de *Lycium barbarum*.

Apesar dos frutos de goji berry estarem sendo mais consumidos ao redor do mundo nos últimos anos, devido ao crescente conhecimento de seus diversos benefícios, ela é uma planta muito tradicional na medicina chinesa, utilizada há milhares de anos. Os frutos secos de *Lycium barbarum* são frequentemente utilizados para melhoria do sistema imunológico, prevenção de câncer, propriedades antioxidantes, além de serem utilizados como matéria-prima de suplementos alimentares e fonte de vitamina C (Wu *et al.*, 2018). Além disso, há estudos que indicam seus efeitos no metabolismo, envelhecimento, fadiga, controle da glicose em

diabéticos, fortalecimento dos rins, do fígado, entre outros (Yang *et al.*, 2022). A bioatividade dos frutos de *L. barbarum* está intimamente associada aos seus componentes fitoquímicos, como polissacarídeos, polifenóis, carotenoides, ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos graxos, aminoácidos, minerais e vitaminas (Wu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2022). Além disso, estudos indicam a presença de espermidinas, grupo de amins de ácido hidroxicinâmico aciladas, que são responsáveis por diversos benefícios da goji berry (Ahad *et al.*, 2020; Inbaraj *et al.*, 2008). Alguns dos compostos presentes no *Lycium barbarum* relatados na literatura estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Alguns dos compostos presentes no *Lycium barbarum* L.

Componentes	Exemplos	Referências
Polissacarídeos		(Wang, Chang e Chen, 2009)
Polifenóis / flavonoides / Ácidos fenólicos	Ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, rutina, quercetina, kaempferol, ácido p-cumárico	(Zhu <i>et al.</i> , 2017) (Magiera e Zaręba, 2015) (Inbaraj <i>et al.</i> , 2010)
Carotenoides	Zeaxantina, neoxantina, β -criptoxantina, β -caroteno, luteína	(Inbaraj <i>et al.</i> , 2008)
Aminoácidos	Isoleucina, triptofano	(Appoloni, 2015)
Vitaminas	Vitaminas C, E, B1, B2, B6	(Appoloni, 2015)
Espermidinas	N,N',N''-tris-hidroxicinamoil espermidina, dicafeoil espermidina	(Ahad <i>et al.</i> , 2020) (Xiao <i>et al.</i> , 2019)

Os compostos fenólicos estão presentes em uma grande variedade de vegetais e frutas, sendo muito benéficos à saúde, pois possuem inúmeras atividades funcionais e biológicas, como antioxidantes, antienvelhecimento, além de auxiliarem no controle de glicose e colesterol (Zhao *et al.*, 2019; Appoloni, 2015). Outros compostos muito comuns são os carotenoides, que também possuem ação antioxidante e são encontrados em diversos vegetais, podendo ser benéfico ao combate de várias doenças, principalmente relacionadas a visão e osteoporose (Appoloni, 2015). As espermidinas, por sua vez, são encontradas principalmente na família das *Solanaceae*, e de acordo com estudos, dentre seus inúmeros benefícios à saúde pode-se destacar a excelente atividade antioxidante e baixa toxicidade de seus

compostos, redução de patologias cardiovasculares e suas comorbidades, como obesidade, diabetes e problemas renais (Ahad *et al.*, 2020).

Porém, apesar de diversos estudos comprovarem os benefícios do consumo de goji berry, seus possíveis efeitos tóxicos e adversos não são muito bem conhecidos. Por essa razão, em 2015 a ANVISA havia orientado o consumo moderado dos frutos de goji, alegando a falta de conhecimento suficiente sobre os efeitos provocados pela sua ingestão em altas quantidades (ANVISA, 2015). Posteriormente, em 2018, foi publicado o novo marco regulatório dos suplementos alimentares, no qual se enquadram os frutos de *Lycium barbarum* no país. As novas regras passaram a exigir requisitos sanitários e comprovação de segurança para os suplementos alimentares, além da obrigação de informações nos rótulos dos produtos, como listas de constituintes e limites de uso (mínimo e máximo) (ANVISA, 2018).

4.1.1 Análise e identificação dos compostos de Goji berry

Na literatura, há diversos trabalhos que utilizam técnicas analíticas para identificar, caracterizar ou quantificar os compostos característicos da *Lycium barbarum*. Os métodos mais comuns incluem cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia em camada delgada (TLC) ou cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC), espectroscopia de absorção no infravermelho (IR), cromatografia gasosa (GC) e eletroforese capilar (CE), além de técnicas de espectrometria de massa (MS) e análise de imagens hiperespectrais em conjunto com a quimiometria (Yao *et al.*, 2018).

Inbaraj *et al.* (2010) utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-DAD-ESI-MS) para identificar e quantificar 52 ácidos fenólicos e flavonoides em frutos de *Lycium barbarum*. Dentre os compostos determinados nas amostras analisadas, estavam presente em maior fração de massa: quercetina-ramno-di-hexosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo, isômeros do ácido dicafeoilquínico, ácido clorogênico, kaempferol-3-O-rutinosídeo, ácido p-cumárico, ácido cafeico e ácido vanílico.

Xu *et al.* (2021) utilizaram cromatografia de ultra eficiência com espectrometria de massas (UHPLC-QTRAP-MS/MS) para hidrolisar polissacarídeos isolados de

Lycium barbarum. Os resultados mostraram que tais polissacarídeos eram compostos por 7 monossacarídeos: galactose, arabinose, manose, ramnose, xilose, ribose e glicose. Através desses dados, os autores puderam avaliar a qualidade das amostras de *Lycium barbarum* nas diferentes regiões da China, e ainda discriminar as amostras dependendo da composição das plantas por localização geográfica, utilizando técnicas quimiométricas.

Zhu *et al.* (2017) determinaram polifenóis em folhas de *Lycium barbarum* por HPLC-MS. Ao todo foram determinados e quantificados 20 compostos, incluindo ácidos clorogênicos, flavonoides e ácidos fenólicos. Alguns deles, como ácido neoclorogênico, ácido criptoclorogênico, ácidos isoclorogênicos A, B e C, foram identificados em folhas de *Lycium barbarum* cultivadas na China pela primeira vez.

Ahad *et al.* (2020) determinaram espermidinas em frutos de goji berry por cromatografia de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas (UPLC-Q-TOF/MS). Nesse trabalho, foi possível a caracterização de 41 espermidinas, das quais 26 foram relatadas pela primeira vez em *Lycium barbarum*. Além disso, os autores puderam identificar as substâncias pelos espectros MS² das espermidinas, encontrando uma correlação entre os íons dos fragmentos para distinção de isômeros.

Apesar dos diversos trabalhos de identificação de compostos presentes em *Lycium barbarum*, há poucas publicações relacionadas a controle de qualidade e possíveis adulterações dos produtos comerciais. Um dos únicos trabalhos visando detectar a adulteração das amostras foi de Ningqiu *et al.* (2022), que desenvolveram um método para diferenciar amostras autênticas e adulteradas de *Lycium barbarum* por tecnologia de imagem hiperespectral, focando principalmente na adulteração por adição de substâncias e corantes.

No Brasil, não há relatos de estudos sobre os produtos comercializados à base de *Lycium barbarum*, pois além da fruta *in natura* e desidratada, também é comum encontrar cápsulas e outros produtos processados. Porém, uma característica das formulações a base de goji berry é a grande diferença de preço entre marcas. Por exemplo, frascos de cápsulas de goji berry podem variar entre aproximadamente R\$20,00 até mais de R\$100,00 contendo as mesmas quantidades, o que gera um alerta sobre a qualidade desses produtos.

4.1.1.1 Extração dos compostos

Em grande parte dos trabalhos sobre análise de goji berry são realizados estudos sobre as melhores condições de extração dos compostos de interesse, já que pode haver diferença no preparo de amostra com relação às substâncias que se deseja extrair, além da parte da planta utilizada. De maneira geral, são utilizados como solventes metanol ou etanol, e a extração é realizada com sonicação ou banho-maria. A Tabela 10 apresenta algumas condições relatadas na literatura.

Um protocolo para identificação e quantificação de antioxidantes em frutos de *Lycium barbarum* por HPLC-MS empregou 30 g de amostra de frutos moídos e a extração foi realizada com 600 mL de etanol (95% (v/v) em banho-maria por 2 h (Le, Chiu e Ng, 2007). Ahad *et al.* (2020) identificaram e caracterizaram espermidinas em goji berry, realizando a extração com 0,5 g de amostra, 50 mL de etanol 90% (v/v) e sonicação por 3h, e análise por UPLC-QTOF/MS/MS. Em um trabalho com o objetivo de diferenciar as plantas de acordo com a localização geográfica, foi realizada a extração utilizando 0,5 g de amostra com 4,0 mL de etanol 80% (v/v) e sonicação por 30 min. Em seguida, foi feita a centrifugação da mistura e o sobrenadante foi novamente extraído em acetonitrila 50% (v/v) e sonicação por 5 min, com posterior análise por UPLC-MS (Lu *et al.*, 2014). Mocan *et al.* (2018) tiveram como objetivo caracterizar substâncias oxidantes e enzimas de *Lycium barbarum* cultivadas em dois locais diferentes. Para isso, eles realizaram a extração de 2,0 g de amostra com 20 mL de etanol 70% (v/v) e sonicação por 1 h, antes da análise por UHPLC-QTOF-MS.

As diferentes condições de extração utilizadas pelos autores estão relacionadas às diferentes substâncias que se desejava extrair em cada estudo, assim como às diferentes partes das plantas utilizadas. Mas de maneira geral, os métodos apresentados utilizam uma quantidade considerável de solventes e realizaram as extrações em tempos relativamente longos, dependendo da quantidade de amostras analisadas.

Tabela 10. Condições de extração de Goji berry relatadas na literatura.

Referências	Preparo de amostra
(Le, Chiu e Ng, 2007)	30,0 g amostra + 600 mL etanol (95%) + banho-maria (90°C por 2h)
(Ahad <i>et al.</i> , 2020)	5,0 g amostra + 50 mL metanol (90%) + sonicação (3 h)
(Lu <i>et al.</i> , 2014)	Etapa 1: 0,5 g amostra + 4 mL etanol (80%) + sonicação (30 min) Etapa 2: Sobrenadante + 1 mL acetonitrila (50%) + sonicação (5 min)
(Mocan <i>et al.</i> , 2018)	2,0 g amostra + 20 mL metanol (70%) + sonicação (1 h)

4.2 Objetivos

O objetivo desse capítulo foi avaliar o desempenho da técnica espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS), como uma técnica rápida, simples e de baixo custo, para avaliação de autenticidade de amostras comerciais de *Lycium barbarum*.

De forma complementar, foi utilizado o método quimiométrico análise de componentes principais (PCA), a fim de identificar grupos de amostras que possuem composição química similar.

4.3 Metodologia

4.3.1 Amostras

Um total de 28 amostras de Goji berry em cápsulas foram adquiridas no comércio local da cidade de Belo Horizonte ou pela internet, como apresentado na Tabela 11. As fotos das embalagens de três dessas amostras estão apresentadas na Figura 41.

Tabela 11. Marca e origem das amostras comerciais de Goji berry analisadas.

Amostras		
Marca	Local de aquisição	Produzido / Embalado
Alterative Pharma	Internet	Descalvado – SP
Apisnutri	Internet	Mandaguari – PR
Bio Vitta's	Belo Horizonte – MG	n.e.
BioNutri / VR Suplementos	Internet	Bragança Paulista - SP
BS Pharma	Internet	Belo Horizonte – MG
Chá Mais / Hilê	Internet	Xanxerê – SC
Denature	Internet	Marataízes – ES
DUOM	Internet	Colombo – PR
Embras Flora	Internet	n.e.
Erva Nativa – Produtos naturais	Internet	Itapemirim – ES
Erva Nativa – Produtos naturais	Belo Horizonte – MG	Itapemirim – ES
FarmaSantos	Internet	Santo André - SP
Fitoplant	Internet	Feira de Santana – BA
FitoWay	Internet	Tarumã – SP
Flora Nativa do Brasil	Internet	Itapemirim – ES
Fortaleza – Saúde Total	Belo Horizonte – MG	n.e.
Fortaleza – Saúde total	Internet	n.e.
Katiguá / Natu Bell	Internet	Extrema – MG
MaxiNutri	Internet	Arapongas – PR
Natuviva	Internet	n.e.
Nutrends	Internet	Varginha – MG
Recover Farma	Internet	Itu – SP
Rei Terra	Internet	Boa Esperança - ES
Unilife Vitamins	Internet	Maringá – PR
Vida Real – Suplementos naturais	Internet	n.e.
Vital Natus	Internet	Salto – SP
Vitaminlife / LP Farmacêutica	Internet	Matão – SP
W Vegan / Herbasalve	Internet	São Paulo – SP

n.e.: Informação não encontrada



Figura 41. Imagens de algumas amostras comerciais de Goji berry em cápsulas analisadas nesse trabalho.

Além das amostras apresentadas na Tabela 11, duas amostras de frutos de Goji berry desidratados (Figura 42), adquiridas na cidade de Belo Horizonte, foram utilizadas como referência, consideradas amostras autênticas.



Figura 42. Imagem de amostra de frutos secos de Goji berry utilizada como referência.

As amostras de frutas foram moídas em um moinho de bolas CryoMill da marca Retsch (Alemanha), utilizando nitrogênio líquido durante a moagem. Para isso, foi utilizada frequência de 20 Hz em um tempo de 2 min. Após a moagem, as amostras pulverizadas foram armazenadas em frascos secos e mantidas à temperatura ambiente. As amostras de cápsulas, por já se apresentarem pulverizadas, foram apenas homogeneizadas e armazenadas, mantidas à temperatura ambiente.

4.3.2 Espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS)

4.3.2.1 Reagentes e instrumentação

Para o procedimento de extração foi utilizado etanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA), e processador ultrassônico modelo VCX 550 (Sonics, Newtown, CT, EUA) com o acessório *cup horn*. Uma centrífuga (AWEL, modelo MF 20-R, França) foi utilizada na centrifugação das amostras e um agitador vortex (Marconi, MA – 162, Brasil) para a homogeneização. Para pesagem das amostras foi utilizada uma balança analítica (Shimadzu, AUW220D, Brasil).

Foi utilizado metanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA) como solvente para as análises por PS-MS. Como substrato para aplicação das amostras foi utilizado papel cromatográfico número 1 da Whatman, cortado na forma de triângulos equiláteros com dimensões de 1,5 cm utilizando uma tesoura convencional previamente higienizada com uma solução metanol/água 50:50.

As medidas foram realizadas em um espectrômetro de massas Thermo Fisher LCQ-Fleet com analisador de massas de baixa resolução do tipo *Ion Trap* (San Jose, Califórnia, USA). A fonte de ionização *paper spray* foi construída utilizando um clipe metálico do tipo jacaré, mantido em um suporte universal, o qual permite movimentação manual nos planos x, y e z, ajustando o posicionamento do papel à entrada do espectrômetro.

As condições do equipamento foram otimizadas, e os parâmetros utilizados foram os seguintes: temperatura do capilar: 275°C; potencial do *paper spray* no modo positivo: 4,5 kV; volume de amostra: 10 µL; volume de solvente no papel: 15 µL; e distância entre o papel e a entrada do espectrômetro de massas: 0,5 cm.

4.3.2.2. Procedimento de extração

Foi realizado um procedimento de extração em etanol, utilizando um processador ultrassônico com o acessório *cup horn*. Para encontrar as condições ideais, foi realizado um planejamento fatorial 2² com triplicata no ponto central para avaliar os efeitos das variáveis: amplitude de vibração (25; 50; 75%) e tempo (30; 60; 90 min) na eficiência da extração. O objetivo era avaliar a condição que resultasse nos sinais mais intensos das substâncias estudadas.

Para este estudo, 100,0 mg de amostras de Goji berry (frutas) previamente moídas foram transferidas para tubos Eppendorf, nos quais foi adicionado 2,0 mL de etanol.

Tabela 12. Condições do planejamento experimental 2² com triplicata no ponto central para o procedimento de extração.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Amplitude (%)	25	50	75
Tempo (min)	30	60	90

Após o procedimento de extração, as soluções foram centrifugadas, e 990 µL do extrato foram adicionados a 10 µL do padrão interno Midazolam ([M+H]⁺ *m/z* 326), de forma que a concentração final do PI na solução fosse de 3,0 mg L⁻¹.

Para o tratamento dos dados, os valores de abundância absoluta dos íons de interesse foram divididos pelos valores do PI e, posteriormente, foi utilizado o cálculo de resposta múltipla conforme explicado anteriormente (no capítulo de *Hypericum perforatum*).

4.3.2.3 Tratamento dos dados

O planejamento experimental foi realizado utilizando o *software* STATISTICA® versão 10.0. Os modelos foram obtidos com nível de confiança de 95%.

Os modelos PCA foram construídos no *software* MATLAB, versão 7.9.0.529 (The MathWorks, Natick, MA, EUA) utilizando o pacote PLS_Toolbox, versão 5.2.2 (Eigenvector Research, Manson, WA, EUA). Para os modelos PCA utilizando os dados de PS-MS foi utilizado como pré-processamento a centragem dos dados na média.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Processamento das amostras

Inicialmente, as cápsulas de Goji berry de cada amostra foram abertas e o pó misturado para homogeneização. Com isso, foi possível notar uma grande diferença de cores e texturas entre as amostras, como mostrado na Figura 43. Da mesma forma, os extratos também apresentaram colorações diferentes (Figura 44), o que poderia ser um indicativo de mistura de substâncias ou até mesmo adulteração dos produtos.



Figura 43. Imagem do conteúdo de algumas cápsulas de Goji berry.



Figura 44. Imagem de alguns dos extratos das amostras comerciais de Goji berry.

As amostras de frutas secas de Goji berry foram utilizadas como referência, consideradas autênticas. Alguns dos íons dos metabólitos de referência da *Lycium barbarum* estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Íons dos metabólitos de referência da *Lycium barbarum*.

[M+H]⁺ (m/z)	Identificação pela literatura	Referências
300	A5 (derivados de cafeoil-tiramina)	XIAO <i>et al.</i>
472	N1-dhc-N3-cafeoil-espermidina	AHAD <i>et al.</i> ; XIAO <i>et al.</i>
474	N1,N3-bis-dhc-espermidina	AHAD <i>et al.</i> ; XIAO <i>et al.</i>
512	-	AHAD <i>et al.</i>
569	9-zeaxantina ou trans-zeaxantina	INBARAJ <i>et al.</i>
634	Isômero de licibarbarspermidina B	XIAO <i>et al.</i>
796	Isômero de licibarbarspermidina F	XIAO <i>et al.</i>
798	Isômero de licibarbarspermidina M	XIAO <i>et al.</i>
807	Monopalmitato de zeaxantina	INBARAJ <i>et al.</i>

A partir das informações dos metabólitos de interesse, foi realizado o planejamento fatorial 2² com triplicata no ponto central para avaliar os efeitos das variáveis: amplitude (25; 50; 75%) e tempo (30; 60; 90 min) no processador ultrassônico, com o intuito de encontrar a condição de extração que resultaria em extratos mais puros em relação a essas substâncias. Os valores de resposta múltipla para cada ensaio estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Resultado do planejamento fatorial 2² com triplicata no ponto central para o procedimento de extração.

Ensaio	Amplitude (%)	Tempo (min)	Resposta múltipla
1	25	30	0,5983
2	75	30	0,9170
3	25	90	1,1232
4	75	90	0,3841
5	50	60	0,3095
6	50	60	0,2832
7	50	60	0,4332

A partir desses dados foi construído um diagrama de Pareto que não considerou nenhum dos efeitos significativos (Figura 12A do Apêndice). Porém, a partir dos resultados, pode-se observar que os maiores valores de resposta múltipla foram obtidos utilizando a menor amplitude e o maior tempo (25% e 90 min), assim

como também a condição de maior amplitude e o menor tempo (75% e 30 min). Dessa forma, com o objetivo de diminuir o tempo de cada extração, foi realizado um novo experimento, utilizando a amplitude de 75% e o tempo de 20 min, que gerou bons resultados, assim como no tempo de 30 min. Portanto, a condição da extração escolhida para as amostras foi amplitude de 75% e tempo de 20 min.

Foi utilizado para extração um aparato com capacidade de 6 tubos eppendorf por rodada (Figura 45). Fazendo a extração de cada amostra em duplicata, e cada rodada com tempo de 20 min, em menos de 4 horas foi possível realizar a extração das 28 amostras. Destaca-se as vantagens do método de extração proposto, em relação aos trabalhos descritos na literatura: pequeno volume de solvente extrator e alta frequência analítica, com um tempo de extração bem menor.



Figura 45. Imagem das amostras em etanol no processador ultrassônico com o acessório *cup horn*.

4.4.2 Análise das amostras

Após o ajuste das condições de extração e de ionização na fonte *paper spray*, foram obtidos, em duplicata, os espectros PS-MS dos extratos na faixa de 100 – 1000 m/z.

Os espectros de massas foram obtidos inicialmente nos modos positivo e negativo, porém constatou-se que no modo positivo os íons obtidos apresentavam

maior intensidade, e os espectros eram menos ruidosos. Portanto, todos os espectros de massas foram obtidos somente no modo positivo.

O espectro da amostra de Goji berry utilizada como referência (fruta seca) é apresentado na Figura 46. Dentre as substâncias disponíveis que poderiam ser utilizadas como padrão interno (PI), foi escolhido o Midazolam (m/z $[M+H]^+$ 326), por possuir uma razão massa/carga dentro da faixa requerida pelo equipamento (150 – 2000 m/z), por apresentar o íon protonado com uma boa intensidade, além de haver uma baixa probabilidade de ser encontrado em amostras de Goji berry. Para confirmação, foi realizada a fragmentação do íon de m/z 326, a qual foi comparada com a fragmentação do Midazolam descrita na literatura. De acordo com Link *et al.*, os íons filhos do íon $[M+H]^+$ do Midazolam são de m/z 291 e m/z 244, o que foi compatível com a fragmentação da substância utilizada como PI, conforme o espectro apresentado no Apêndice 13A. (Link *et al.*, 2007)

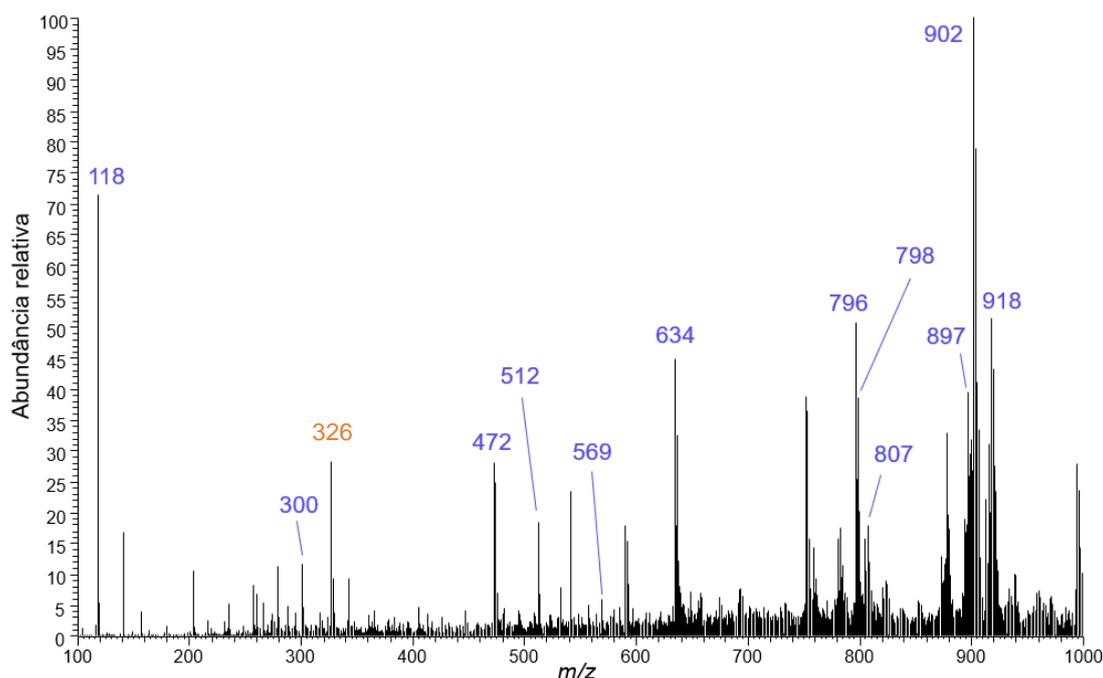


Figura 46. Espectro representativo obtido por PS(+)-MS da amostra de Goji berry utilizada como referência (fruta seca).

Assim como descrito na literatura (Tabela 13), o espectro da amostra da fruta seca de Goji berry apresentou os íons de m/z 300, 472, 512, 569, 634, 796, 798 e 807,

referentes aos íons protonados dos metabólitos de interesse de *Lycium barbarum*, além do íon de m/z 118 e sinais na região entre m/z 850 – 920.

Para confirmação dos resultados, os espectros de massas MS^2 dos íons de interesse na amostra de referência foram obtidos, com energias de colisão variando entre 30 – 40 eV, e comparados com a literatura. De acordo com Ahad *et al.* e Xiao *et al.*, o íon de m/z 472 apresenta fragmentos de m/z 310, 293, 220, 163 e 72, e o íon de m/z 474 apresenta fragmentos de m/z 310, 293, 222, 165 e 123. A fragmentação desses íons na amostra de referência condiz com os resultados apresentados na literatura, sendo que no espectro MS^2 do íon m/z 472 foram observados fragmentos de m/z 310, 293, 220 e 163 (Figura 14A do Apêndice) e para o íon de m/z 474 foram observados fragmentos de m/z 310, 293, 222 e 165 (Figura 15A do Apêndice). Além desses, o íon de m/z 634 também foi fragmentado e comparado com a literatura. De acordo com Xiao *et al.*, seus fragmentos são de m/z 472, 310, 220 e 163. Os resultados encontrados na amostra de referência foram condizentes, com fragmentos de m/z 472, 383, 310 e 220 (Figura 16A do Apêndice). Também foi possível fragmentar e comparar os íons de m/z 796 e 798. De acordo com Xiao *et al.*, o íon de m/z 796 apresenta fragmentos de m/z 634, 472, 310, 220 e 163. Esse íon na amostra de referência apresentou os fragmentos de m/z 634, 540, 472 e 310 (Figura 17A do Apêndice). E o íon de m/z 798 apresentou fragmentos de m/z 636, 474, 384, 222 e 165, enquanto o espectro MS^2 da amostra apresentou os íons de m/z 636, 520, 474 e 384 (Figura 18A do Apêndice) (Ahad *et al.*, 2020; Xiao *et al.*, 2019).

Com relação às amostras comerciais, a Figura 47 apresenta dois espectros obtidos por PS-MS das amostras analisadas.

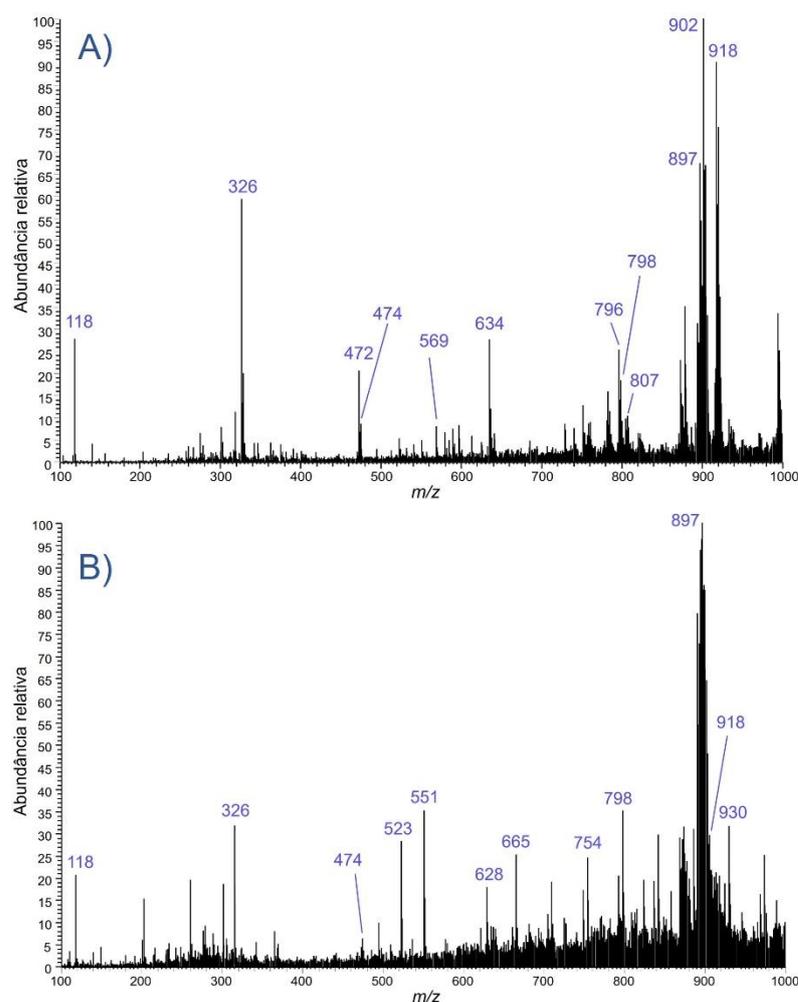


Figura 47. Espectros representativos obtidos por PS(+)-MS de duas amostras comerciais de Goji berry.

Em ambas as figuras, é possível observar a presença de alguns dos íons característicos de *Lycium barbarum*. O espectro da Figura 47a apresenta os íons de m/z 472, 474, 569, 634, 796, 798 e 807, conforme a literatura, e os íons de m/z 118 e 897, apresentados no espectro da planta autêntica. O espectro da Figura 47b apresenta os íons de m/z 118, 474, 798, 897 e 918. (Ahad et al., 2020; Inbaraj et al., 2008; Xiao et al., 2019) Isso indica que há, pelo menos em uma quantidade significativa de *Lycium barbarum* nessas amostras. Além desses, outros íons foram observados em ambos os espectros. Esses íons podem ser oriundos de excipientes acrescentados nas amostras em cápsulas, o que não permite comparação com o padrão, já que ele era a fruta *in natura*, assim como podem ser também substâncias adulterantes ou ainda corantes utilizados para dar cor aos pós, já que foi observado

uma grande diferença de cor entre as amostras. Portanto, não é possível afirmar que essas amostras são autênticas, apenas que há indícios que elas contenham *Lycium barbarum* na composição. Alguns dos corantes que podem estar presentes nessas amostras, pois são citados nos rótulos de alguns produtos, são azul brilhante (massa nominal 792,85 g.mol⁻¹), vermelho 40 (massa nominal 496,43 g.mol⁻¹), amarelo de quinoleína (massa nominal 477,38 g.mol⁻¹) e azorrubina (massa nominal 502,43 g.mol⁻¹).

A Figura 48 apresenta os espectros de outras quatro amostras comerciais.

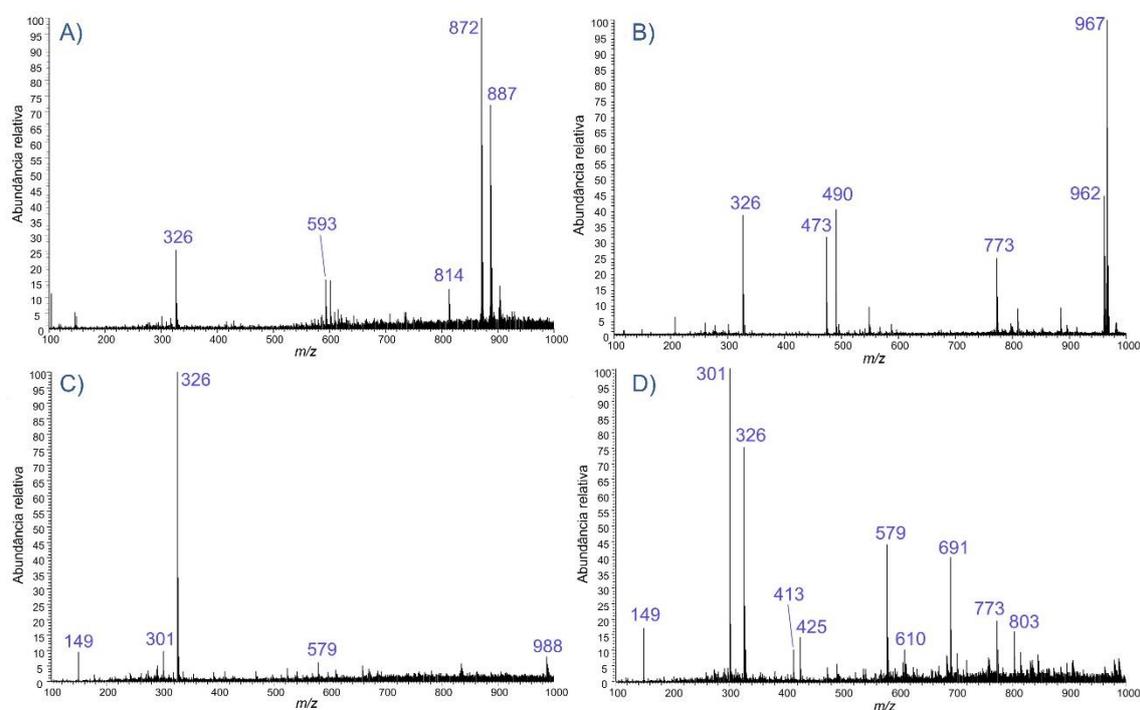


Figura 48. Espectros representativos obtidos por PS(+)-MS de quatro amostras comerciais de Goji berry.

A partir desses espectros é possível observar que eles apresentam perfis diferentes entre si, e ainda, diferentes dos espectros correspondentes às amostras que contêm *Lycium barbarum*, pois não há nenhum íon correspondente ao princípio ativo nos espectros da Figura 48. A amostra da Figura 48a apresenta íons em m/z 593, 814, 872 e 887. O íon em m/z 593 pode ser característico da linarina, um glicosídeo flavonóide encontrado em várias frutas e vegetais. Os demais íons não puderam ser identificados. A amostra da Figura 48b apresenta íons em m/z 473, 490,

773, 962 e 967. A amostra da Figura 48c apresenta íons em m/z 149, 301, 579 e 988. Deve-se destacar que nesse espectro como o íon do PI Midazolam (m/z 326) apresentou sinal com alta intensidade, essa amostra foi analisada novamente sem a adição do PI para uma melhor visualização dos demais sinais. Porém, o espectro obtido apresentou apenas íons com intensidade a nível de ruído. Por fim, a amostra da Figura 48d apresentou diversos sinais que, assim como nos espectros anteriores, não eram característicos de *Lycium barbarum*. Entretanto, tais íons não puderam ser identificados pela literatura. Esses resultados podem indicar adulterações nas formulações, seja pela falta de princípio ativo, ou pela substituição por outros vegetais.

Das 28 amostras analisadas, apenas 10 apresentaram um perfil semelhante aos da Figura 47, ou seja, amostras que aparentemente contêm *Lycium barbarum*. É importante destacar que os espectros dessas 10 amostras, apesar de conterem alguns dos íons característicos, apresentam outros íons, como citado anteriormente, íons esses bastante diversos, resultando em perfis diferentes. Mas, avaliando os íons característicos que foram fragmentados e comparados, há um indicativo de haver *Lycium barbarum* nessas amostras. Além dessas, as 18 amostras restantes apresentaram perfis semelhantes aos da Figura 48, ou seja, não apresentaram nenhum íon característico de *Lycium barbarum*, podendo ser consideradas amostras falsificadas, comercializadas como Goji berry, mas com ausência do princípio ativo.

É importante destacar também que no capítulo anterior, em que foram analisadas amostras comercializadas como Erva de São João (*Hypericum perforatum*), poderia haver uma confusão na venda do produto, já que há outra planta com o mesmo nome popular, o que não acontece com a Goji berry, indicando que as adulterações são intencionais neste caso. Além disso, no caso da Erva de São João, algumas amostras foram adquiridas como plantas secas, sem rótulos e, portanto, sem qualquer informação de embalagem. No caso da Goji berry, todas as amostras foram adquiridas em embalagens fechadas e rotuladas como tal.

4.4.3 Análise de componentes principais (PCA)

Os dados relativos aos espectros de massas foram organizados em uma matriz de 28 linhas por 900 colunas para a análise por PCA. Como pré-processamento foi feita a centragem dos dados na média.

Inicialmente, foi verificada a possível presença de amostras anômalas (*outliers*) através do gráfico de T^2 de Hotelling *versus* resíduos Q, com 95% de confiança (Figura 49). Como nenhuma amostra ficou localizada no quadrante superior direito (com resíduo elevado e simultaneamente alta influência para o modelo), não foi detectado nenhum *outlier*, e por isso, o modelo foi construído com todas as 28 amostras originais.

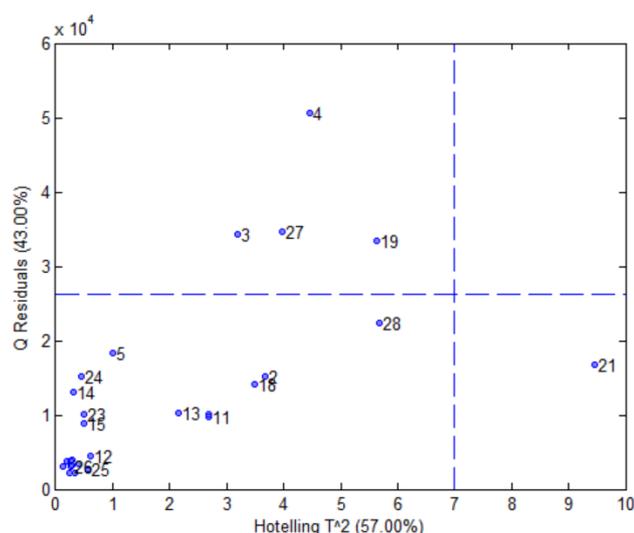


Figura 49. Gráfico de T^2 de Hotelling x resíduos Q.

O modelo PCA explicou 57,01% da variância total dos dados utilizando duas componentes principais. As demais componentes principais não continham informações relevantes para a separação dos agrupamentos e, portanto, foram desprezadas.

Na Figura 50 está apresentado o gráfico de escores de PC1 *versus* PC2. É possível observar a formação de dois agrupamentos no lado negativo de PC1, enquanto no lado positivo as amostras ficaram mais dispersas. O agrupamento em azul é composto pelas 3 amostras que apresentaram espectros similares entre si e com características semelhantes ao da Figura 48b (amostras consideradas falsificadas). O agrupamento em vermelho é composto pelas demais amostras consideradas falsificadas, sem a presença dos íons de *Lycium barbarum*. Portanto, é possível observar que o modelo PCA não discriminou os demais perfis de adulteração além desse descrito. Já as amostras no lado positivo de PC1, além da amostra 5, apresentam íons característicos de *Lycium barbarum*. Como citado anteriormente, esses espectros não apresentaram perfis muito semelhantes entre si, e isso pode

explicar a grande dispersão das amostras no gráfico. Em PC2, é possível observar basicamente a discriminação de algumas das amostras que continham *Lycium barbarum*. No lado positivo de PC2 são observadas as amostras 4, 27 e 28, e no lado negativo as amostras 2 e 18.

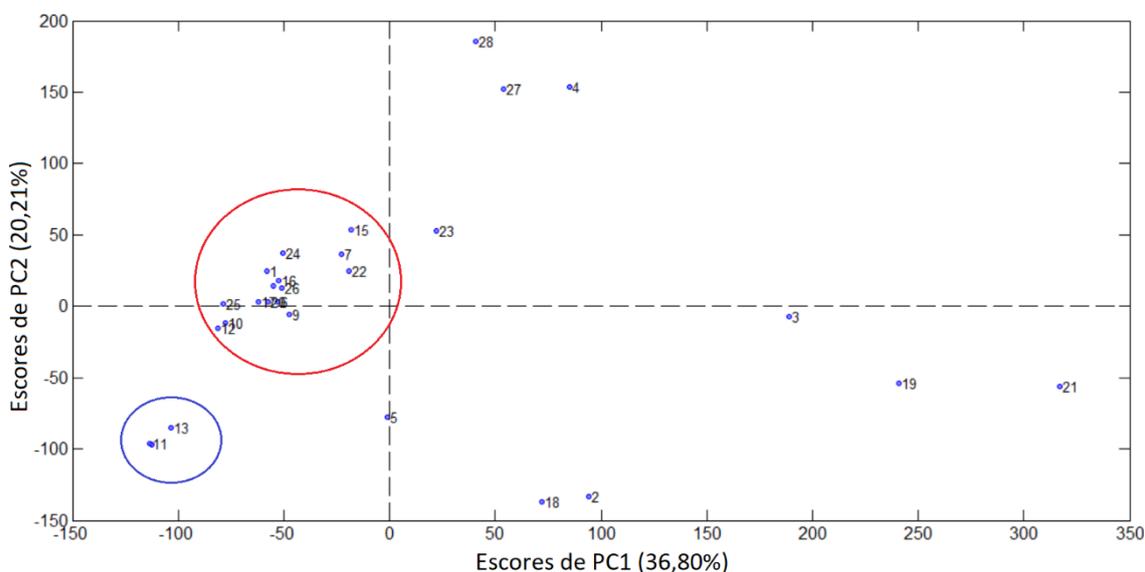


Figura 50. Gráficos de escores de PC1xPC2 dos dados obtidos de análise de Goji berry por PS-MS.

Os pesos das duas primeiras PCs estão ilustrados na Figura 51. Na Figura 51a são apresentados os pesos de PC1, e na figura 51b os pesos de PC2.

Na Figura 51a é possível observar os pesos que explicam a dispersão das amostras em PC1. No lado positivo de PC1, que discrimina as amostras contendo *Lycium barbarum*, é possível observar que os íons responsáveis por essa separação foram os característicos da planta, como os de m/z 634 e 798, além dos íons presentes na região acima de m/z 800. Mas além desses, outros íons presentes nessas amostras (que podem ser característicos de outras plantas utilizadas, corantes ou excipientes) também contribuíram para a separação. E no lado negativo de PC1 houve influência de poucos íons, como os de m/z 301 e 968.

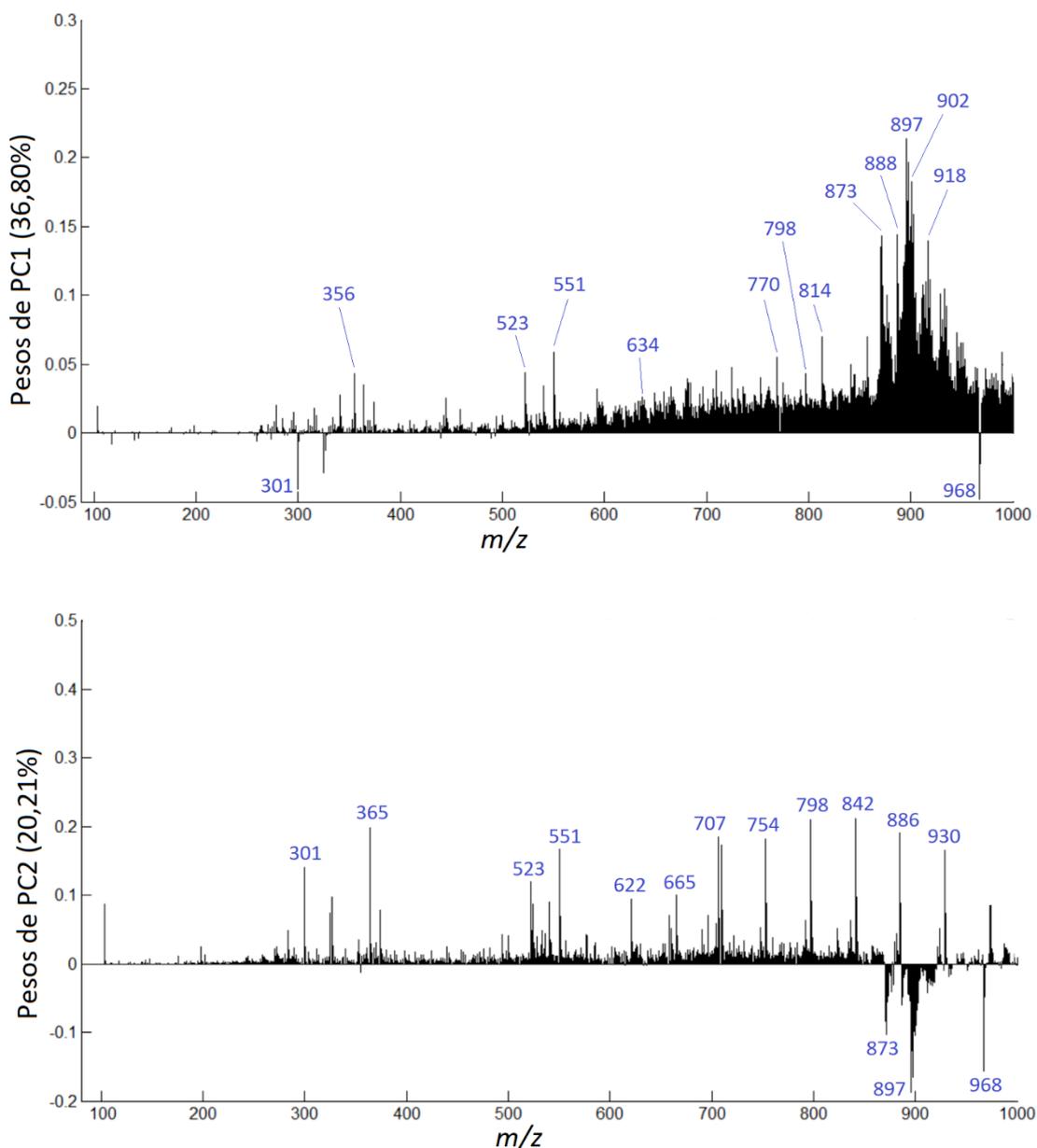


Figura 51. Gráficos de pesos (dados de Goji berry) de a) PC1 e b) PC2.

Na Figura 51b são observados os íons responsáveis pela separação das amostras em PC2. Algumas das amostras que continham *Lycium barbarum* foram discriminadas por esta componente principal. No lado positivo, houve uma maior contribuição dos íons de m/z 301, 365, 523, 551, 622, 665, 707, 754, 798, 842, 886 e 930, enquanto no lado negativo houve uma maior contribuição dos íons de m/z 873, 897 e 968, e demais íons na região de m/z acima de 900.

4.5 Conclusões parciais

Este capítulo da tese teve como objetivo analisar amostras de *Lycium barbarum* adquiridas pela internet e no comércio local de Belo Horizonte. Com isso, 28 amostras comercializadas como Goji berry foram analisadas por PS-MS, e, de acordo com os resultados, foi possível concluir que apenas 10 amostras apresentavam ao menos alguma quantidade do princípio ativo, enquanto o restante delas não continha quantidades significativas de *Lycium barbarum*, sendo certamente amostras falsificadas. Essas amostras apresentaram, basicamente, 4 perfis de espectros de massas, indicando que diversos produtos podem estar sendo comercializados como se fossem Goji berry. Através de um modelo PCA, observou-se uma tendência de discriminação das amostras com relação aos diferentes perfis dos seus espectros de massas.

5 CONCLUSÕES

Esta tese teve como objetivo analisar amostras comerciais de Erva de São João e de Goji berry, vendidas como medicamento natural e suplemento alimentar, respectivamente. As amostras de Erva de São João (*Hypericum perforatum*) foram analisadas por PS-MS e TXRF, enquanto as amostras de Goji berry (*Lycium barbarum*) foram analisadas apenas por PS-MS.

Nesse contexto, 43 amostras (vegetais, cápsulas e comprimidos) comercializadas como erva de São João foram analisadas, juntamente com uma amostra previamente conhecida como *Ageratum conyzoides*, que, assim como a *Hypericum perforatum*, também possui o nome popular de erva de São João no Brasil. Através das análises por PS-MS foi possível identificar amostras que continham diferentes princípios ativos, além do *Hypericum perforatum*, como a mistura desse vegetal com o *Ageratum conyzoides*, além de amostras que continham apenas o *Ageratum conyzoides*, e ainda amostras contendo uma terceira espécie, o *Senna spectabilis*. O modelo PCA discriminou os grupos de amostras com relação aos vegetais presentes. Todas essas identificações foram possíveis devido aos sinais característicos de metabólitos dessas espécies. Pelas análises por TXRF foi possível identificar e quantificar 17 elementos presentes nas amostras, como Pb e Ni, os quais estavam em concentrações elevadas em algumas amostras. Através do modelo PCA, observou-se uma tendência de discriminação das amostras de *Hypericum perforatum* com relação às suas localizações geográficas. Foi testada a estratégia de fusão de dados das técnicas PS-MS e TXRF para a construção de um novo modelo PCA. Nesse modelo, foi observada uma tendência de separação das amostras com relação às espécies presentes, como no modelo com dados do PS-MS, e ainda, dentro desses agrupamentos, ocorreu a discriminação com relação aos elementos presentes nas amostras.

Com relação à Goji berry, foram analisadas 28 amostras comerciais que foram comparadas com uma amostra da fruta seca, utilizada como referência. Através dos espectros de massas foi possível observar que em 10 amostras os íons característicos da *Lycium barbarum* foram detectados, fornecendo indícios da presença do princípio ativo em quantidades significativas. Porém, isso não foi suficiente para comprovar que tais amostras são autênticas, ou seja, que não houve mistura de outros compostos

nas formulações. As 18 amostras restantes foram consideradas falsificadas, pois não apresentaram os íons característicos do *Lycium barbarum*. Um modelo PCA discriminou os grupos de amostras com relação às substâncias presentes.

Por meio desses resultados, é demonstrada a necessidade de maior controle de qualidade de fitoterápicos e suplementos no Brasil, pois os consumidores podem estar adquirindo produtos naturais falsificados, contendo princípios ativos diversos ou outras substâncias desconhecidas, ou ainda, produtos contaminados por metais pesados. A falta de controle de qualidade dos produtos somado a um consumo excessivo da população coloca a saúde dos consumidores em grande risco. Vale ressaltar ainda a simplicidade e praticidade dos métodos propostos para as análises, que possibilitaram reduzir a quantidade de solventes, tempo de extração e análises por PS-MS, não necessitando de técnicas cromatográficas.

REFERÊNCIAS

ABDELHAFEZ, O. H.; OTHMAN, E. M.; FAHIM, J. R.; DESOUKEY, S. Y.; PIMENTEL-ELARDO, S. M.; NODWELL, J. R.; SCHIRMEISTER, T.; TAWFIKE, A.; ABDELMOHSEN, U. R. Metabolomics analysis and biological investigation of three Malvaceae plants. **Phytochemical Analysis**, v. 31, p. 204–214, 2019.

AGAPOUDA, A.; BOOKER, A.; KISS, T.; HOHMANN, J.; HEINRICH, M.; CSUPOR, D. Quality control of *Hypericum perforatum* L. analytical challenges and recent progress. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, p. 15–37, 2019.

AHAD, H.; JIN, H.; LIU, Y.; WANG, J.; SUN, G.; LIANG, X.; AISA, H. A. Chemical profiling of spermidines in goji berry by strong cation exchange solid-phase extraction (SCX-SPE) combined with ultrahigh-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS/MS). **Journal of Chromatography B**, v. 1137, p. 121923, 2020.

ANVISA. **Informe Técnico nº 66: Esclarecimentos sobre a avaliação de segurança da espécie vegetal *Lycium barbarum*, também conhecida como goji berry**, 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+%0AInteresse/Informes+Tecnicos>>. Acesso em: 14 out. 2022.

ANVISA. **Publicadas novas regras para suplementos alimentares**, 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/publicadas-novas-regras-para-suplementos-alimentares>>. Acesso em: 14 out. 2022.

ANVISA. (2020). *Suplementos alimentares: Anvisa publica instrução normativa*. <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-76-de-5-de-novembro-de-2020-287508490>

BRASIL. (1998). *LEI Nº 9.677, DE 2 DE JULHO DE 1998*. https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9677.htm

de Melo, D. B., de Macedo, L. M., de Almeida, I. O., Pereira, T. dos R. S., da Silva, T. M., Leal, M. M. T., Melo, G. A., & de Santana, L. L. B. (2021). Intoxicação por plantas no Brasil: uma abordagem cienciométrica. *Brazilian Journal of Development*, 7, 40919–40937.

INMETRO. (2020). *Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008*.

Oliveira, I., & Costa, A. G. (2022). *Entenda os perigos de ‘erva de emagrecimento’ que causou morte de mulher em SP*. CNN Brasil. <https://www.cnnbrasil.com.br/saude/entenda-os-perigos-de-erva-de-emagrecimento-que-causou-morte-de-mulher-em-sp/>

Yoneda, Y., & Horiuchi, T. (1971). Optical Flats for Use in X-Ray Spectrochemical Microanalysis. *Review of Scientific Instruments*, 42, 1069–1070.

APPOLONI, M. C. **Estudo dos compostos bioativos da Lycium barbarum**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

ARCEUSZ, A.; RADECKA, I.; WESOLOWSKI, M. Identification of diversity in elements content in medicinal plants belonging to different plant families. **Food Chemistry**, v. 120, p. 52–58, 2010.

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1–40, 2011.

BIANCOLILLO, A.; BUCCI, R.; MAGRÌ, A. L.; MAGRÌ, A. D.; MARINI, F. Data-fusion for multiplatform characterization of an italian craft beer aimed at its authentication. **Analytica Chimica Acta**, v. 820, p. 23–31, 2014.

BORRÀS, E.; FERRÉ, J.; BOQUÉ, R.; MESTRES, M.; ACEÑA, L.; BUSTO, O. Data fusion methodologies for food and beverage authentication and quality assessment – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 891, p. 1–14, 2015.

BRUKER. Picofox: User Manual, 2012, p. 118.

BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Química Nova**, v. 8, p. 99–105, 1985.

BUTTON, S. T. Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados, 2016, p. 88.

CALAHAN, J.; HOWARD, D.; ALMALKI, A. J.; GUPTA, M. P.; CALDERÓN, A. I. Chemical Adulterants in Herbal Medicinal Products: A Review. **Planta Medica**, v. 82, p. 505–515, 2016.

CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L.; CRUZ, P. L. R.; SOUZA, A. R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES MARINA, F. M. Metabolômica: Definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, p. 75–91, 2018.

CARVALHO, A. C. B.; BRANCO, P. F.; FERNANDES, L. A.; MARQUES, R. F. DE O.; CUNHA, S. C.; PERFEITO, J. P. S. Regulação Brasileira em Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 7, p. 5–16, 2012.

CASTILLO-PEINADO, L. S.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Present and foreseeable future of metabolomics in forensic analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 925, p. 1–15, 2016.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, p. 287–292, 2006.

DE MELO, D. B.; DE MACEDO, L. M.; DE ALMEIDA, I. O.; PEREIRA, T. DOS R. S.; DA SILVA, T. M.; LEAL, M. M. T.; MELO, G. A.; de Santana, L. L. B. **Intoxicação por plantas no Brasil: uma abordagem cienciométrica**. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, p. 40919–40937, 2021.

DENG, J.; YANG, Y. Chemical fingerprint analysis for quality assessment and control of Bansa herbal tea using paper spray mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 785, p. 82–90, 2013.

DHARA, S.; MISRA, N. L.; THAKUR, U. K.; SHAH, D.; SAWANT, R. M.; RAMAKUMAR, K. L.; AGGARWAL, S. K. A total reflection X-ray fluorescence method for the determination of chlorine at trace levels in nuclear materials without sample dissolution. **X-Ray Spectrometry**, v. 41, p. 316–320, 2012.

DONNO, D.; BECCARO, G. L.; MELLANO, M. G.; CERUTTI, A. K.; BOUNOUS, G. Goji berry fruit (*Lycium* spp.): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1070–1085, 2015.

ESPY, R. D.; MULIADI, A. R.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Spray mechanism in paper spray ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 325–327, p. 167–171, 2012.

FAQUETI, L. G. **Quantificação por cromatografia líquida de ultra eficiência de marcadores presentes no extrato aquoso de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae)**. UFSC, 2016.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. **Science**, v. 246, p. 64–71, 1989.

FERREIRA, M. M. C. Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações. *Em*: UNICAMP (1ª Ed.). Campinas: Editora da Unicamp.

FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. DA S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, p. 1605–1609, 2013.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. DE M. B. Quimiofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. *Em*: **Farmacognosia: da planta ao medicamento. Parte I: Biodiversidade e matérias-primas farmacêuticas**. 3ª ed. Rev. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. p. 77–90.

HAMID, A. M.; JARMUSCH, A. K.; PIRRO, V.; PINCUS, D. H.; CLAY, B. G.; GERVASI, G.; COOKS, R. G. Rapid discrimination of bacteria by paper spray mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 7500–7507, 2014.

HEINE, R. TER; HILLEBRAND, M. J. X.; ROSING, H.; GORP, E. C. M. VAN; MULDER, J. W.; BEIJNEN, J. H.; HUITEMA, A. D. R. Identification and Profiling of Circulating Metabolites of Atazanavir, a HIV Protease Inhibitor. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, p. 1826–1840, 2009.

HENRIQUE, J. R.; VENDRAMINI, E. DE A.; REIS, R. D.; MARQUES, L. C.; MARCUCCI, M. C. Controle de qualidade de fitoterápicos no Brasil: avaliação diagnóstica e propostas de intervenção. **Revista de Fitoterapia**, v. 14, p. 129–236, 2014.

HOBAN, C. L.; MUSGRAVE, I. F.; COGHLAN, M. L.; POWER, M. W. P.; BYARD, R. W.; NASH, C.; FARRINGTON, R.; MAKER, G.; CRIGHTON, E.; TRENGOVE, R.; BUNCE, M. Adulterants and Contaminants in Psychotropic Herbal Medicines Detected with Mass Spectrometry and Next-Generation DNA Sequencing. **Pharmaceutical Medicine**, v. 32, p. 429–444, 2018.

HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry – Principles and applications. *Em*: JOHN WILEY & SONS INC (3^a Ed.). Chichester: John Wiley & Sons Ltd.

INBARAJ, B. S.; LU, H.; HUNG, C. F.; WU, W. B.; LIN, C. L.; CHEN, B. H. Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 812–818, 2008.

INBARAJ, B. S.; LU, H.; KAO, T. H.; CHEN, B. H. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC–DAD–ESI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 549–556, 2010.

KLOCKENKÄMPER, R.; BOHLEN, A. VON. Elemental Analysis of Environmental Samples by Total Reflection X-Ray Fluorescence: a Review. **X-Ray Spectrometry**, v. 25, p. 156–162, 1996.

KLOCKENKÄMPER, R.; BOHLEN, A. VON. Total-reflection X-ray fluorescence moving towards nanoanalysis: a survey. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 56, p. 2005–2018, 2001.

KOYU, H.; HAZNEDAROGLU, M. Z. Investigation of impact of storage conditions on *Hypericum perforatum* L. dried total extract. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p. 545–551, 2015.

LA CALLE, I. DE; CABALEIRO, N.; ROMERO, V.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Sample pretreatment strategies for total reflection X-ray fluorescence analysis: A tutorial review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 90, p. 23–54, 2013.

LE, K.; CHIU, F.; NG, K. Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 353–363, 2007.

LINK, B.; HASCHKE, M.; WENK, M.; KRÄHENBÜHL, S. Determination of midazolam and its hydroxy metabolites in human plasma and oral fluid by liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 1531–1540, 2007.

LIU, J.; WANG, H.; MANICKE, N. E.; LIN, J.-M.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Development, Characterization, and Application of Paper Spray Ionization. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 2463–2471, 2010.

LIU, W.; XIA, M.; BAI, J.; YANG, L.; WANG, Z.; WANG, R.; SHI, Y. Chemical characterization and 5 α -reductase inhibitory activity of phenolic compounds in goji berries. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 201, p. 114119, 2021.

LU, W.; JIANG, Q.; SHI, H.; NIU, Y.; GAO, B.; YU, L. Partial Least-Squares-Discriminant Analysis Differentiating Chinese Wolfberries by UPLC–MS and Flow

Injection Mass Spectrometric (FIMS) Fingerprints. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 9073–9080, 2014.

MAGIERA, S.; ZAREBA, M. Chromatographic Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Lycium barbarum* L. and Evaluation of Antioxidant Activity. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 2665–2674, 2015.

MAURI, P.; PIETTA, P. High performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry of *Hypericum perforatum* extracts. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14, p. 95–99, 2000.

MILEVSKAYA, V. V.; STATKUS, M. A.; TEMERDASHEV, Z. A.; KISELEVA, N. V.; BUTYL'SKAYA, T. S.; SHIL'KO, E. A. Extraction and determination of biologically active components of St. John's wort and its pharmaceutical preparations. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 71, p. 741–747, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC N° 26.**

MOCAN, A.; MOLDOVAN, C.; ZENGIN, G.; BENDER, O.; LOCATELLI, M.; SIMIRGIOTIS, M.; ATALAY, A.; VODNAR, D. C.; ROHN, S.; CRISAN, G. UHPLC-QTOF-MS analysis of bioactive constituents from two Romanian Goji (*Lycium barbarum* L.) berries cultivars and their antioxidant, enzyme inhibitory and real-time cytotoxicological evaluation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 115, p. 414–424, 2018.

MOMESSO, L. S.; MOURA, R. M. X. DE; CONSTANTINO, D. H. J. Atividade antitumoral do *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 660–663, 2009.

NINGQIU, T.; JUN, S.; MIN, X.; KUNSHAN, Y.; YAN, C.; DENGJIE, L. Identification of fumigated and dyed *Lycium barbarum* by hyperspectral imaging technology. **Journal of Food Process Engineering**, v. 45, p. e13950, 2022.

Oliveira, I.; Costa, A. G. **Entenda os perigos de 'erva de emagrecimento' que causou morte de mulher em SP**, 2022. CNN Brasil. Disponível em: <<https://www.cnnbrasil.com.br/saude/entenda-os-perigos-de-erva-de-emagrecimento-que-causou-morte-de-mulher-em-sp/>> Acesso em: 24 jan. 2023.

OWEN, J. D.; EVANS, S. J.; GUIRGUIS, A.; KELLETT, K.; STAIR, J. L. Method development for the determination of elements in *Hypericum perforatum* L. (St John's wort) herb and preparations using inductively coupled plasma–optical emission spectroscopy and microwave digestion. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, p. 38–45, 2019.

OWEN, J. D.; KIRTON, S. B.; EVANS, S. J.; STAIR, J. L. Elemental fingerprinting of *Hypericum perforatum* (St John's Wort) herb and preparations using ICP-OES and chemometrics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 125, p. 15–21, 2016.

PAULA, C. C. A. DE. **Aplicação da espectrometria de massas com ionização paper spray em análises de cunho forense e no monitoramento e aceleração de reações químicas**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.

PAVLOVA, D.; KARADJOVA, I.; KRASTEVA, I. Essential and toxic element concentrations in *Hypericum perforatum*. **Australian Journal of Botany**, v. 63, p. 152, 2015.

PEREIRA, H. V. **Espectrometria de massas com ionização por paper spray combinada a métodos quimiométricos para identificação de falsificações em cervejas**. UFMG, 2016.

PIVATTO, M.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; REZENDE, A. DE; VIEGAS JR., C.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Electrospray ionization mass spectrometry screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) extracts: fast identification of new constituents and co-metabolites. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1431–1438, 2005.

PORZEL, A.; FARAG, M. A.; MÜLBRADT, J.; WESSJOHANN, L. A. Metabolite profiling and fingerprinting of *Hypericum species*: a comparison of MS and NMR metabolomics. **Metabolomics**, v. 10, p. 574–588, 2014.

POSADZKI, P.; WATSON, L.; ERNST, E. Contamination and adulteration of herbal medicinal products (HMPs): an overview of systematic reviews. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 69, p. 295–307, 2013.

RACLARIU, A. C.; PALTINEAN, R.; VLASE, L.; LABARRE, A.; MANZANILLA, V.; ICHIM, M. C.; CRISAN, G.; BRYSTING, A. K.; BOER, H. DE. Comparative authentication of *Hypericum perforatum* herbal products using DNA metabarcoding, TLC and HPLC-MS. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1291, 2017.

RESENDE, S. F.; TEODORO, J. A. R.; BINATTI, I.; GOUVEIA, R. L.; OLIVEIRA, B. S.; AUGUSTI, R. On-surface photocatalytic degradation of methylene blue: In situ monitoring by paper spray ionization mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 418, p. 107–111, 2017.

ROBERTS, L. D.; SOUZA, A. L.; GERSZTEN, R. E.; CLISH, C. B. Targeted Metabolomics. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 98, p. 30.2.1-30.2.24, 2012.

SANTOS, E. S.; GAMA, E. M.; FRANÇA, R. S.; SOUZA, A.; SANTOS; MATOS, R. P. Espectrometria de Fluorescência de raios-X na determinação de espécies químicas. **Enciclopédia Biosfera - Centro Científico Conhecer**, v. 9, p. 3413–3432, 2013.

SARKER, MD. M. R. Adulteration of herbal medicines and dietary supplements with undeclared synthetic drugs: Dangerous for human health. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 1–2, 2014.

SCOGNAMIGLIO, M.; GRAZIANI, V.; TSAFANTAKIS, N.; ESPOSITO, A.; FIORENTINO, A.; D'ABROSCA, B. NMR-based metabolomics and bioassays to study phytotoxic extracts and putative phytotoxins from Mediterranean plant species. **Phytochemical Analysis**, v. 30, p. 512–523, 2019.

SCOTTI, F.; LÖBEL, K.; BOOKER, A.; HEINRICH, M. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) Products – How Variable Is the Primary Material? **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1973, 2019.

SHAHEEN, S.; RAMZAN, S.; KHAN, F.; AHMAD, M. **Adulteration in Herbal Drugs: A Burning Issue**. Gewerbestrasse: Springer, 2019.

SHEN, L.; ZHANG, J.; YANG, Q.; MANICKE, N. E.; OUYANG, Z. High throughput paper spray mass spectrometry analysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 420, p. 28–33, 2013.

SILVA, D. F. A.; PICCIN, E. **Aplicação da Espectrometria de Massas com Ionização por paper spray na Diferenciação de Amostras de Ginsengs e Quantificação de Adulterações Usando Calibração Multivariada**. UFMG, 2014.

SILVA, M. R.; FREITAS, L. G.; SOUZA, A. G.; ARAÚJO, R. L. B.; LACERDA, I. C. A.; PEREIRA, H. V.; AUGUSTI, R.; MELO, J. O. F. Antioxidant Activity and Metabolomic Analysis of Cagaitas (*Eugenia dysenterica*) using Paper Spray Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 1034–1044, 2019.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 618–626, 2008.

SNEHA, M.; DULAY, M. T.; ZARE, R. N. Introducing mass spectrometry to first-year undergraduates: Analysis of caffeine and other components in energy drinks using paper-spray mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 418, p. 156–161, 2017.

SPITERI, M.; DUBIN, E.; COTTON, J.; POIREL, M.; CORMAN, B.; JAMIN, E.; LEES, M.; RUTLEDGE, D. Data fusion between high resolution ¹H-NMR and mass spectrometry: a synergetic approach to honey botanical origin characterization. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 4389–4401, 2016.

TATSIS, E. C.; BOEREN, S.; EXARCHOU, V.; TROGANIS, A. N.; VERVOORT, J.; GEROTHANASSIS, I. P. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. **Phytochemistry**, v. 68, p. 383–393, 2007.

TEODORO, J. A. R.; PEREIRA, H. V.; SENA, M. M.; PICCIN, E.; ZACCA, J.; AUGUSTI, R. Paper spray mass spectrometry and chemometric tools for a fast and reliable identification of counterfeit blended Scottish whiskies. **Food Chemistry**, v. 237, p. 1058–1064, 2017.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338–350, 2006.

TEUNISSEN, S. F.; FEDICK, P. W.; BERENDSEN, B. J. A.; NIELEN, M. W. F.; EBERLIN, M. N.; COOKS, R. G.; ASTEN, A. C. VAN. Novel Selectivity-Based Forensic Toxicological Validation of a Paper Spray Mass Spectrometry Method for the Quantitative Determination of Eight Amphetamines in Whole Blood. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 28, p. 2665–2676, 2017.

TOLONEN, A.; UUSITALO, J.; HOHTOLA, A.; JALONEN, J. Determination of naphthodianthrones and phloroglucinols from *Hypericum perforatum* extracts by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, p. 396–402, 2002.

TSCHINKEL, P. F. S. *et al.* The Hazardous Level of Heavy Metals in Different Medicinal Plants and Their Decoctions in Water: A Public Health Problem in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–11, 2020.

USP. **Elemental Impurities—Limits, Published in USP 40–NF 35, First Supplement, Official December 1, 2017.**

VEROTTA, L.; APPENDINO, G.; BELLORO, E.; JAKUPOVIC, J.; BOMBARDELLI, E. Furohyperforin, a Prenylated Phloroglucinol from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 770–772, 1999.

WALKER, L.; SIRVENT, T.; GIBSON, D.; VANCE, N. Regional differences in hypericin and pseudohypericin concentrations and five morphological traits among *Hypericum perforatum* plants in the northwestern United States. **Canadian Journal of Botany**, v. 79, p. 1248–1255, 2001.

WANG, C. C.; CHANG, S. C.; CHEN, B. H. Chromatographic determination of polysaccharides in *Lycium barbarum* Linnaeus. **Food Chemistry**, v. 116, p. 595–603, 2009.

WANG, H.; LIU, J.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, p. 877–880, 2010.

WANG, H.; REN, Y.; MCLUCKEY, M. N.; MANICKE, N. E.; PARK, J.; ZHENG, L.; SHI, R.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Direct quantitative analysis of nicotine alkaloids from biofluid samples using paper spray mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 85, p. 11540–11544, 2013.

WECKWERTH, W. Metabolomics in Systems Biology. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 669–689, 2003.

WHO. **Depression and Other Common Mental Disorders**, 2017.

WU, D.-T.; GUO, H.; LIN, S.; LAM, S.-C.; ZHAO, L.; LIN, D.-R.; QIN, W. Review of the structural characterization, quality evaluation, and industrial application of *Lycium barbarum* polysaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, p. 171–183, 2018.

XIAO, X.; REN, W.; ZHANG, N.; BING, T.; LIU, X.; ZHAO, Z.; SHANGGUAN, D. Comparative Study of the Chemical Constituents and Bioactivities of the Extracts from Fruits, Leaves and Root Barks of *Lycium barbarum*. **Molecules**, v. 24, p. 1585, 2019.

XU, J.; WANG, R.; LIU, J.; CHENG, H.; PENG, D.; XING, L.; SHI, S.; YU, N. Determination of monosaccharides in *Lycium barbarum* fruit polysaccharide by an efficient UHPLC-QTRAP-MS/MS method. **Phytochemical Analysis**, v. 32, p. 785–793, 2021.

XU, M.; HUANG, B.; GAO, F.; ZHAI, C.; YANG, Y.; LI, L.; WANG, W.; SHI, L. Assessment of Adulterated Traditional Chinese Medicines in China: 2003-2017. **Frontiers Pharmacology**, v. 10, p. 1–8, 2019.

YANG, Q.; WANG, H.; MAAS, J. D.; CHAPPELL, W. J.; MANICKE, N. E.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using

mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 312, p. 201–207, 2012.

YANG, T.; HU, Y.; YAN, Y.; ZHOU, W.; CHEN, G.; ZENG, X.; CAO, Y. Characterization and Evaluation of Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Flavonoids from the Fruits of *Lycium barbarum*. **Foods**, v. 11, p. 306, 2022.

YAO, R.; HEINRICH, M.; WANG, Z.; WECKERLE, C. S. Quality control of goji (fruits of *Lycium barbarum* L. and *L. chinense* Mill.): A value chain analysis perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, p. 349–358, 2018. ANVISA. (2020). *Suplementos alimentares: Anvisa publica instrução normativa*. <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-76-de-5-de-novembro-de-2020-287508490>

BRASIL. (1998). *LEI Nº 9.677, DE 2 DE JULHO DE 1998*. https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19677.htm

de Melo, D. B., de Macedo, L. M., de Almeida, I. O., Pereira, T. dos R. S., da Silva, T. M., Leal, M. M. T., Melo, G. A., & de Santana, L. L. B. (2021). Intoxicação por plantas no Brasil: uma abordagem cienciométrica. *Brazilian Journal of Development*, 7, 40919–40937.

INMETRO. (2020). *Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008*.

OLIVEIRA, I., & COSTA, A. G. (2022). *Entenda os perigos de ‘erva de emagrecimento’ que causou morte de mulher em SP*. CNN Brasil. <https://www.cnnbrasil.com.br/saude/entenda-os-perigos-de-erva-de-emagrecimento-que-causou-morte-de-mulher-em-sp/>

YONEDA, Y., & HORIUCHI, T. (1971). Optical Flats for Use in X-Ray Spectrochemical Microanalysis. *Review of Scientific Instruments*, 42, 1069–1070.

ZHAO, X.; GUO, S.; YAN, H.; LU, Y.; ZHANG, F.; QIAN, D.; WANG, H.; DUAN, J. Analysis of phenolic acids and flavonoids in leaves of *Lycium barbarum* from different habitats by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 33, p. e4552, 2019.

ZHU, L.; PENG, Z.; ZHANG, X.; YANG, J.; LAI, X.; YANG, G. Determination of Polyphenols in *Lycium barbarum* Leaves by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Letters**, v. 50, p. 761–776, 2017.

ZIRAK, N.; SHAFIEE, M.; SOLTANI, G.; MIRZAEI, M.; SAHEBKAR, A. Hypericum perforatum in the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders: Current evidence and potential mechanisms of action. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, p. 8496–8508, 2019.

APÊNDICES

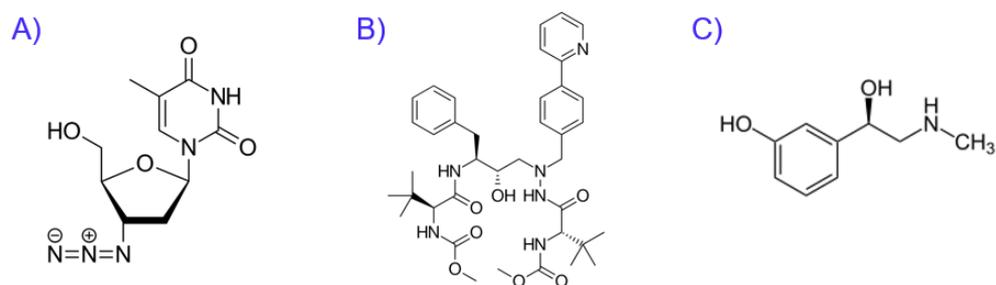


Figura 1A. Representação das moléculas de a) zidovudina, b) atazanavir, c) fenilefrina.

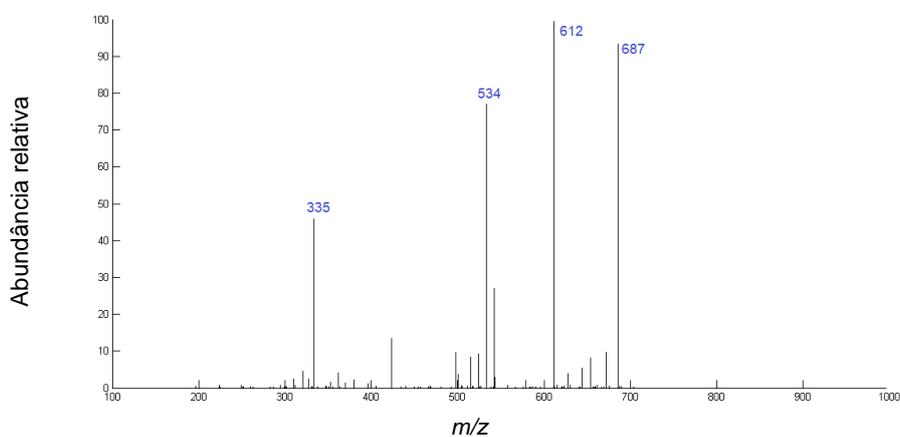


Figura 2A. Espectro MS² obtido do composto atazanavir.

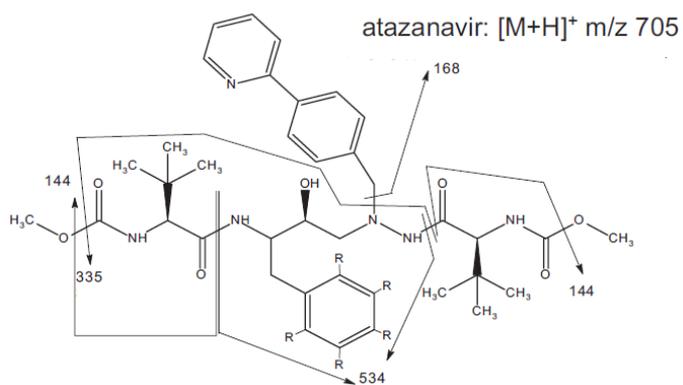


Figura 3A. Representação das fragmentações do composto atazanavir.
(Heine *et al.*, 2009)

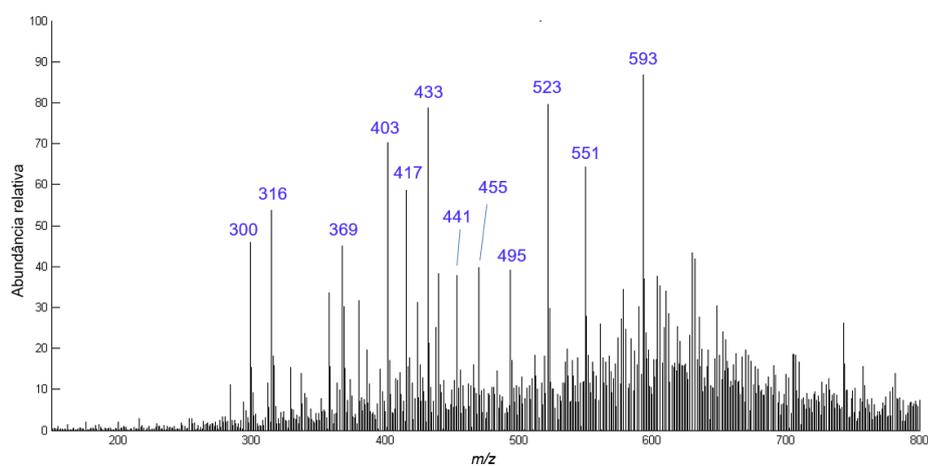


Figura 4A. Espectro representativo obtido por PS(+)-MS de amostra de Erva de São João utilizando extração por radiação micro-ondas.

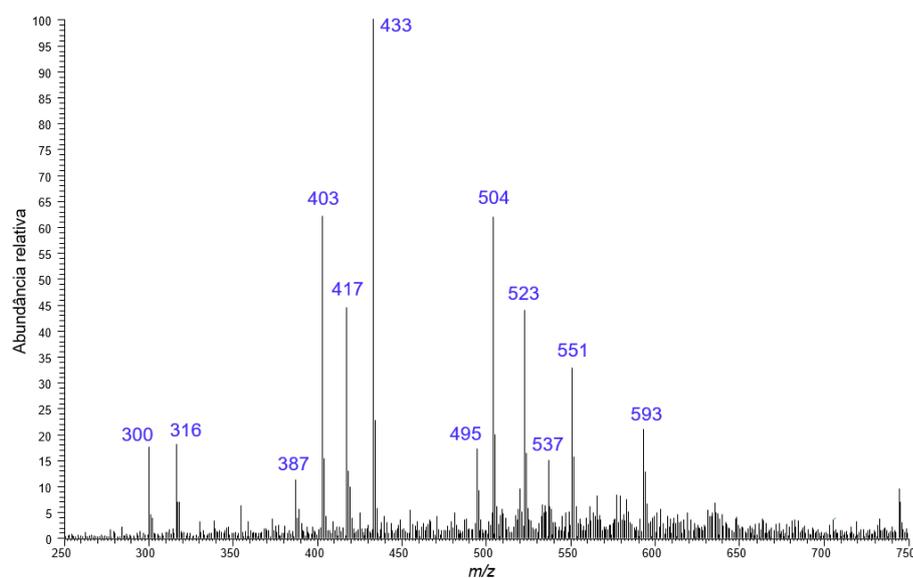


Figura 5A. Espectro representativo obtido por PS(+)-MS de amostra de Erva de São João utilizando extração sólido-líquido.

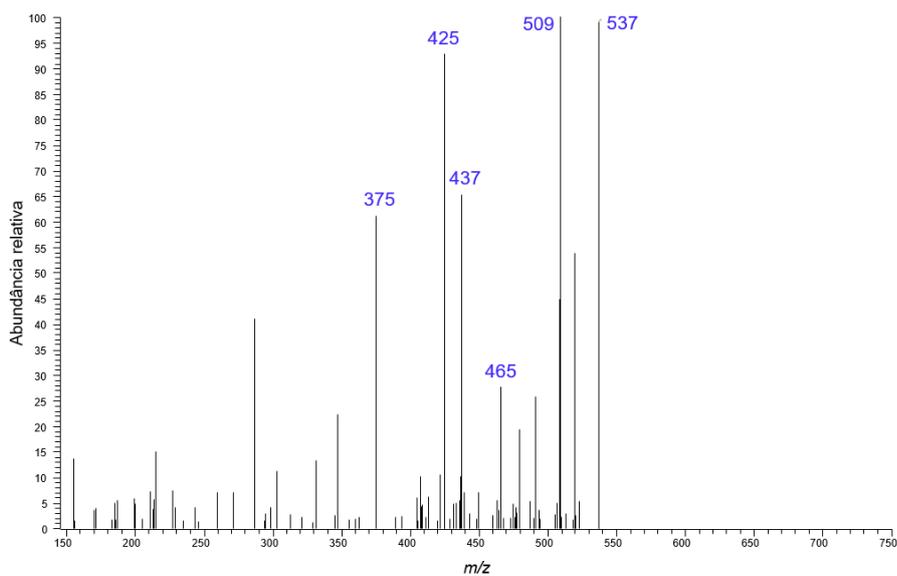


Figura 6A. Espectro PS(+)-MS² do íon em m/z 537 do padrão da Erva de São João.

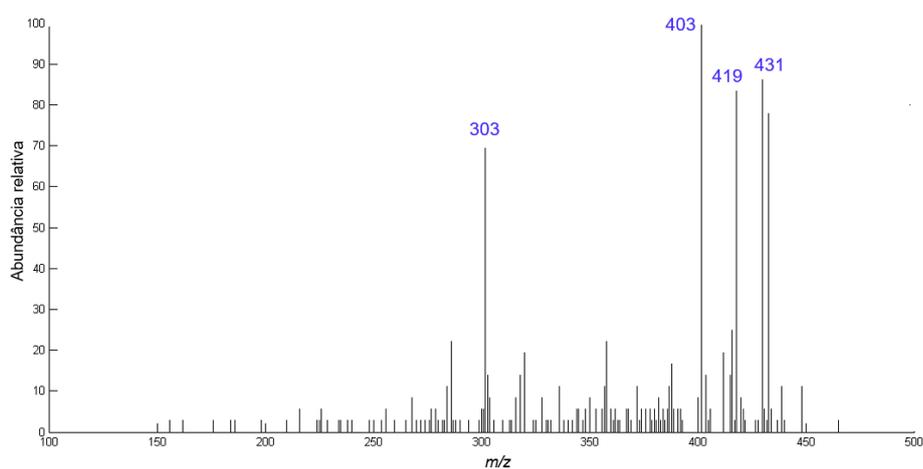


Figura 7A. Espectro PS(+)-MS² do íon em m/z 449 do padrão da Erva de São João.

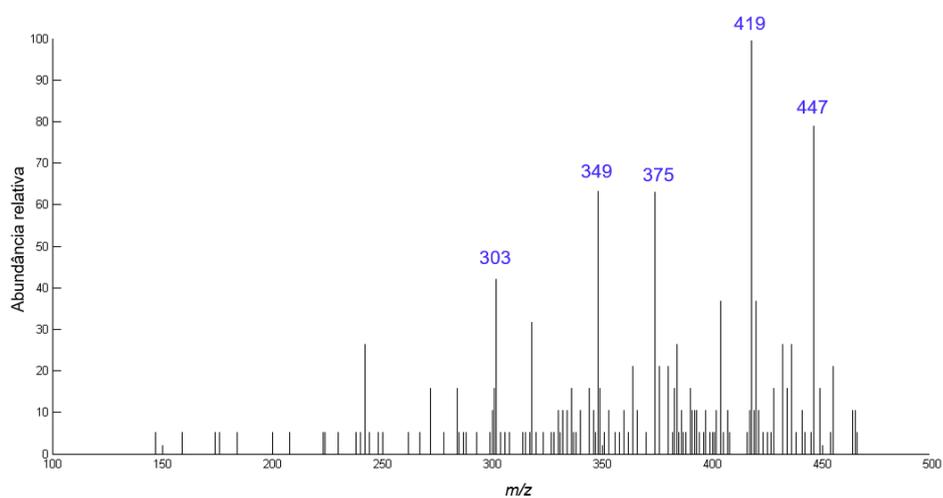
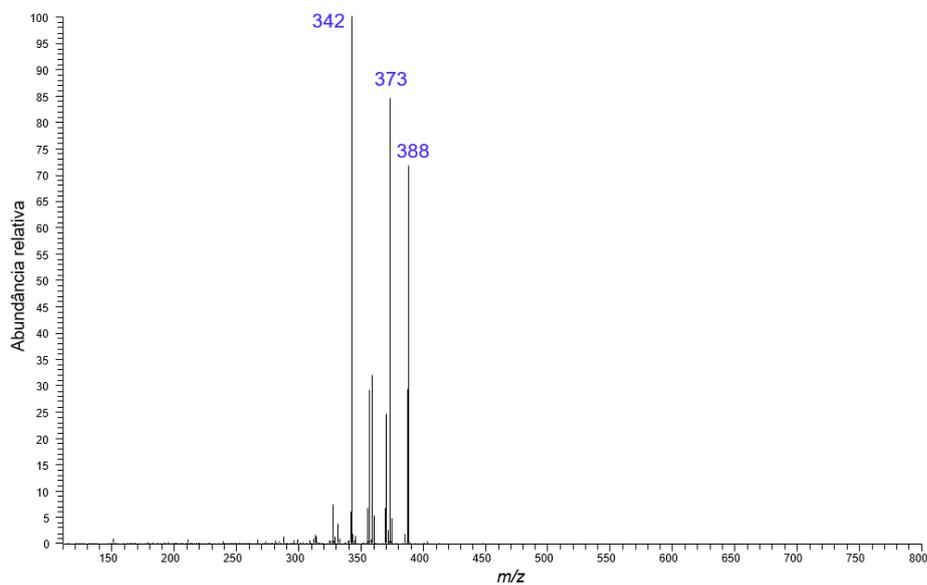
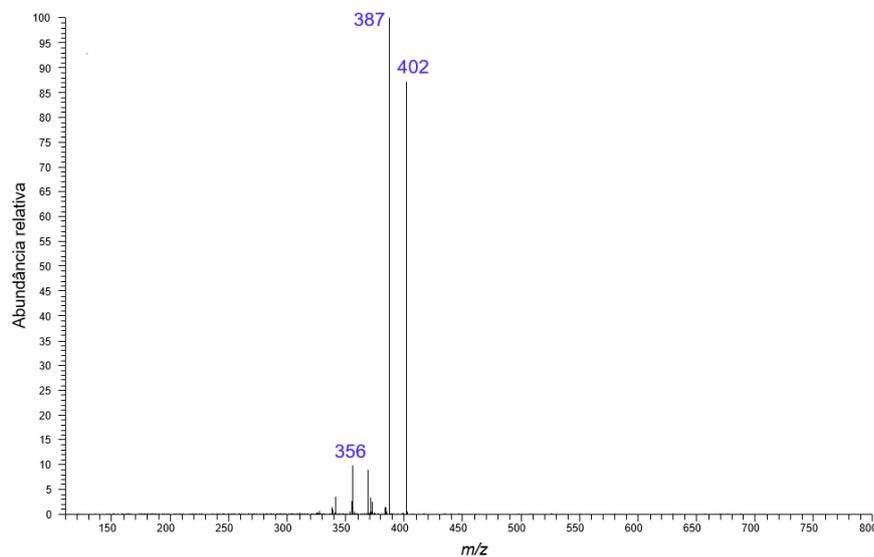


Figura 8A. Espectro PS(+)-MS² do íon em m/z 465 do padrão da Erva de São João.Figura 9A. Espectro PS(+)-MS² do íon em m/z 403 de amostra caracterizada como *Ageratum conyzoides*.Figura 10A. Espectro PS(+)-MS² do íon em m/z 417 de amostra caracterizada como *Ageratum conyzoides*.

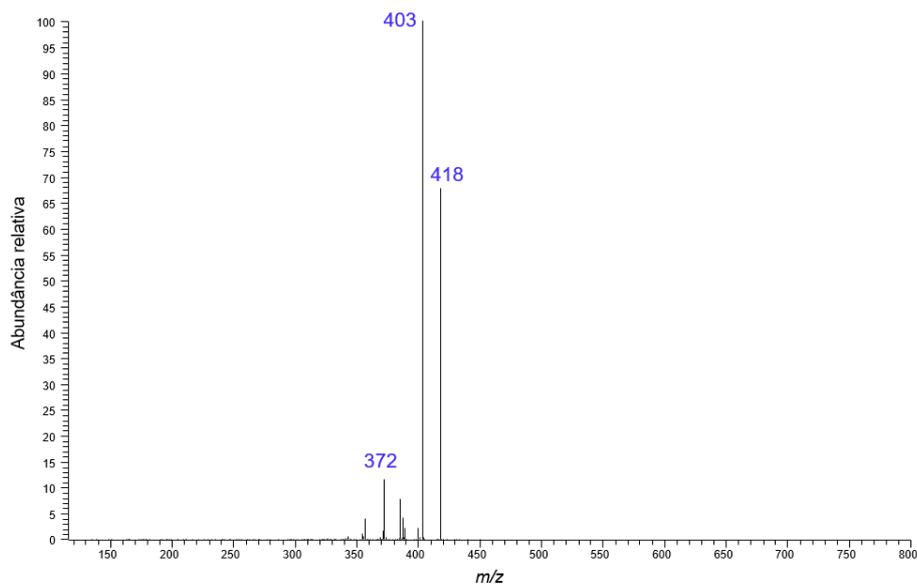


Figura 11A. Espectro PS(+)-MS² do íon em m/z 433 de amostra caracterizada como *Ageratum conyzoides*.

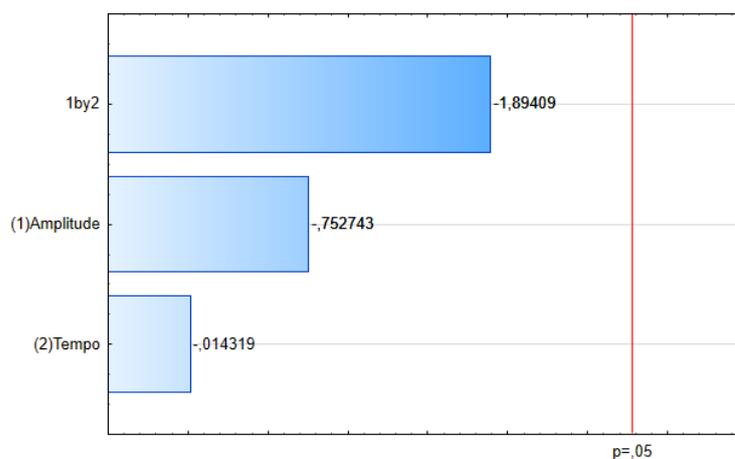


Figura 12A. Gráfico de Pareto com os dados obtidos a partir do planejamento fatorial 2² com triplicata no ponto central para o procedimento de extração de Goji Berry.

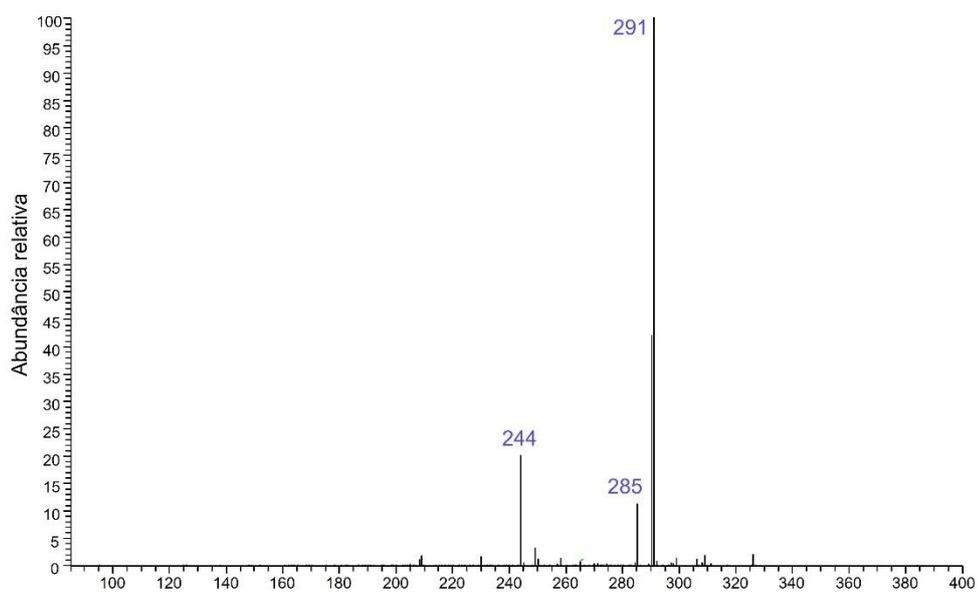


Figura 13A. Espectro PS(+)-MS² do íon em m/z 326 do PI midazolam.

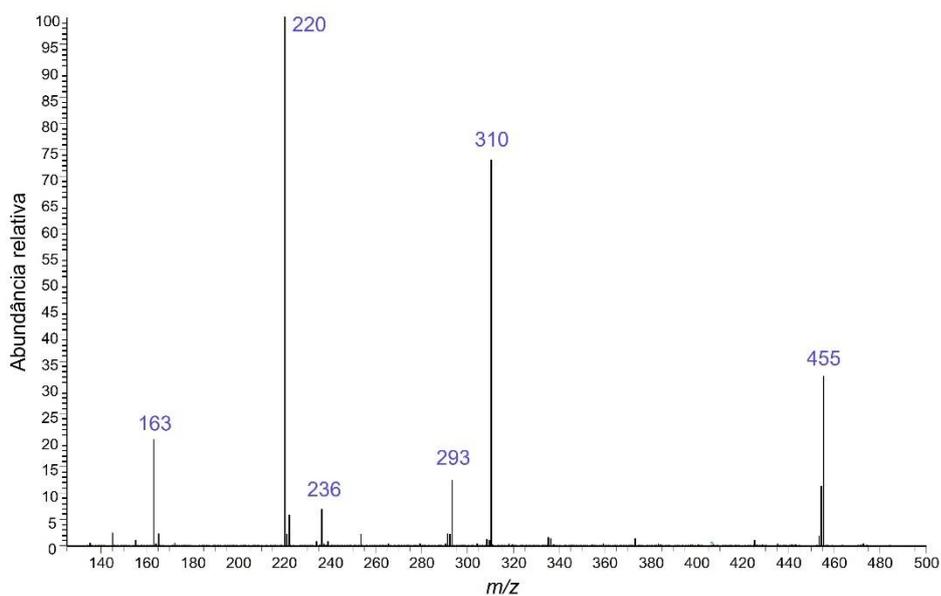


Figura 14A. Espectro PS(+)-MS² do íon em m/z 472 característico de *Lycium barbarum*.

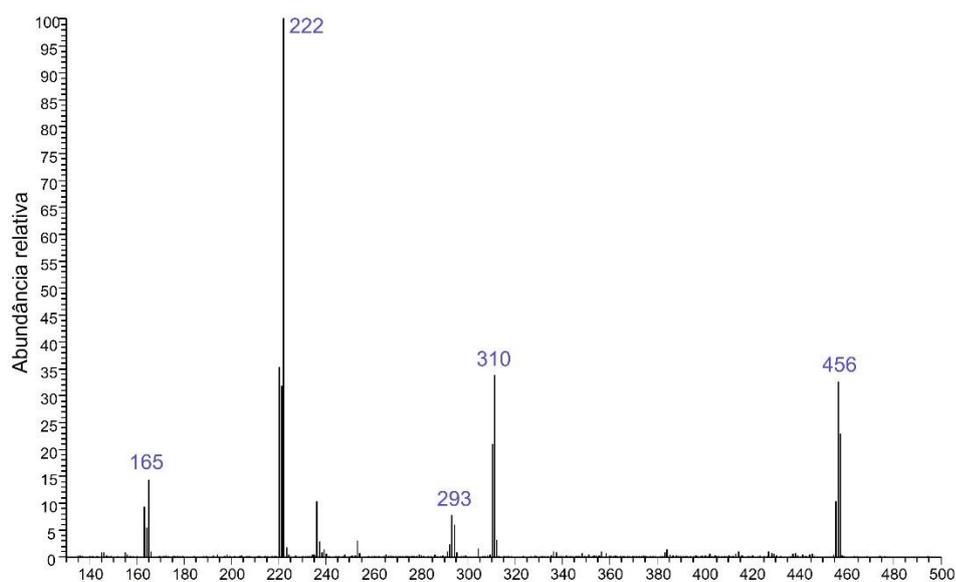


Figura 15A. Espectro PS(+)-MS² do íon em m/z 474 característico de *Lycium barbarum*.

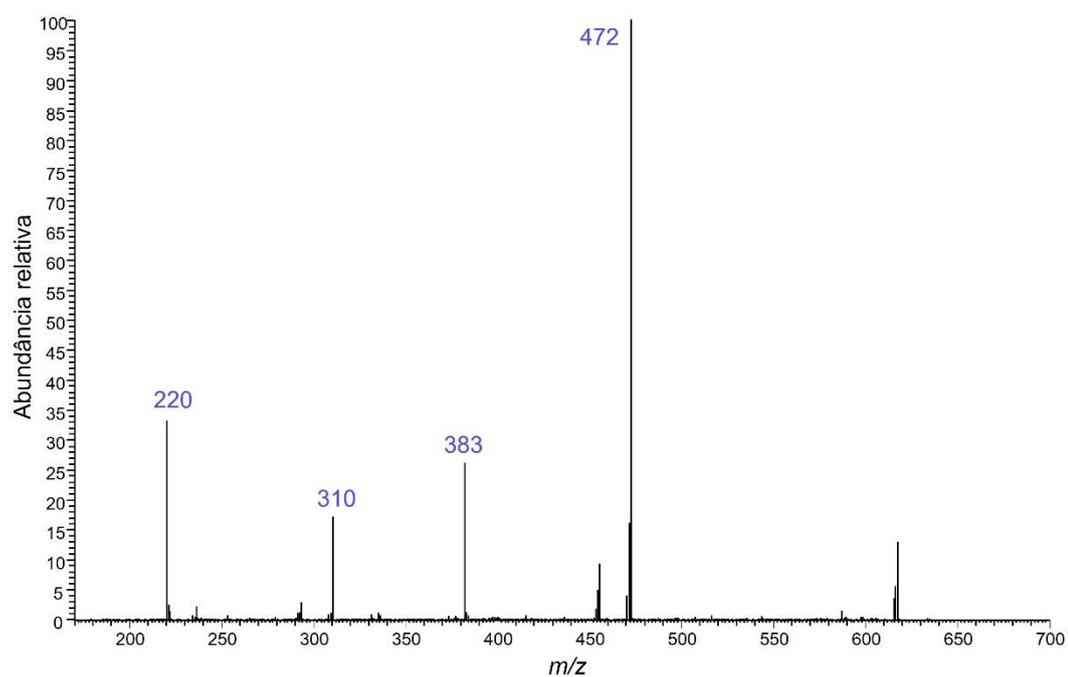


Figura 16A. Espectro PS(+)-MS² do íon em m/z 634 característico de *Lycium barbarum*.

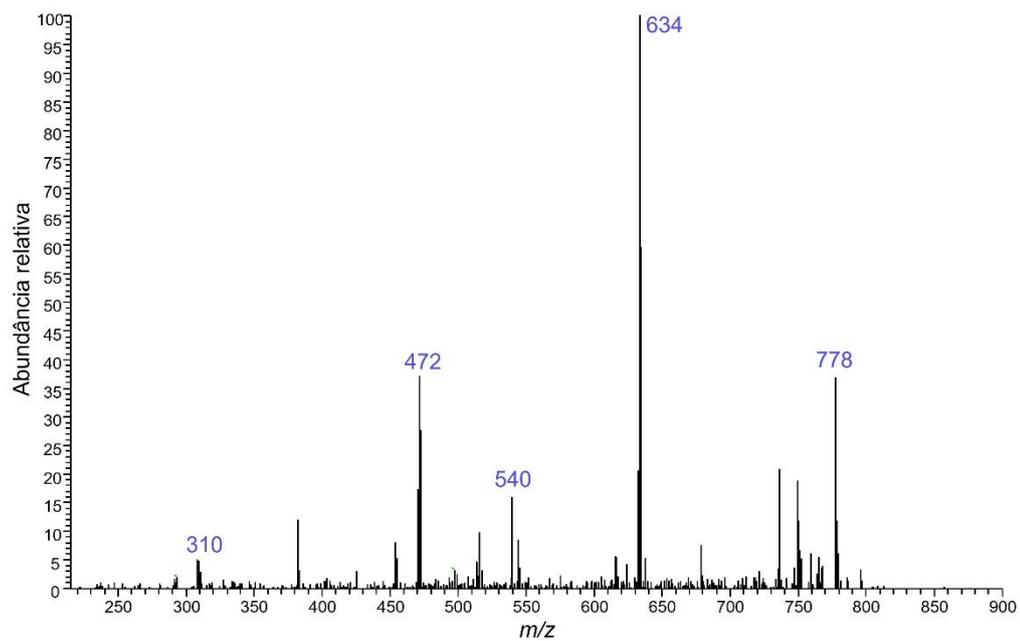


Figura 17A. Espectro PS(+)-MS² do íon em m/z 796 característico de *Lycium barbarum*.

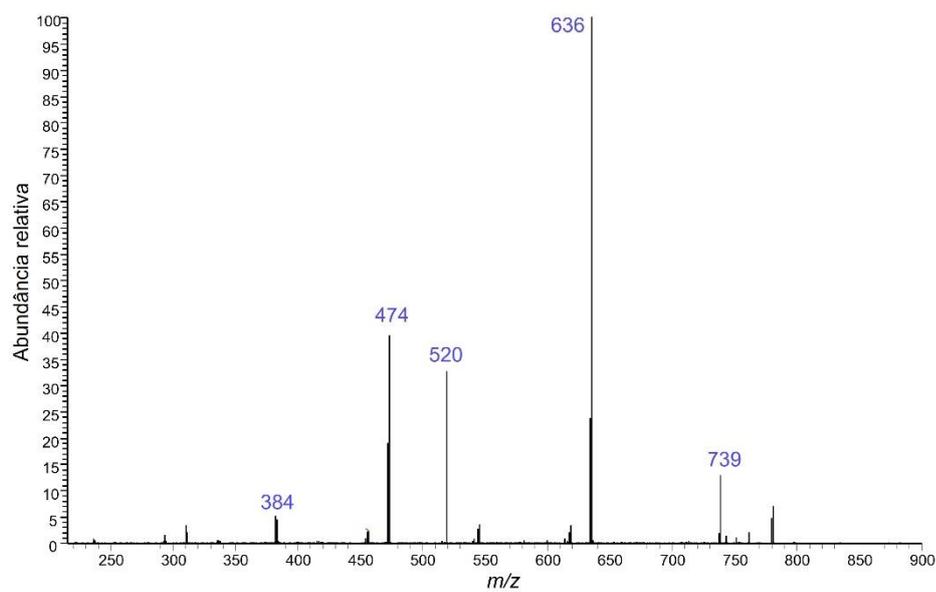


Figura 18A. Espectro PS(+)-MS² do íon em m/z 798 característico de *Lycium barbarum*.