Artigo

Técnicas Analíticas Hifenadas na Identificação de Marcadores Químicos e Adulterações em Produtos Naturais

Storion, A. C.; Gonçalves, C. P.; Marcucci, M. C.

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (4), 1038-1055. Data de publicação na Web: 7 de Julho de 2020

<http://rvq.sbq.org.br>

Hifened Analytical Techniques in the Identification of Chemical Markers and Adulterations in Natural Products

Abstract: The use of phytotherapeutic and herbal medicines has increased in recent years. Because of the growing demand, quality control for these drugs becomes increasingly necessary. The most widely practice used nowadays for standardization of products of plant origin is the identification of the phytochemical markers that, are characteristic for each species. However, such methodology can be inefficient, as many markers have no relationship with the biological activity of each plant. The simultaneous use of some already known analytical techniques not only can be an alternative to the quality control of these phytopharmaceuticals but also results in evaluation of these chemical compounds in its entirety. This work is a literature review, which evaluated different coupled analytical methods – which, reported better sensitivity, ease and accuracy in analysis – to highlight the most appropriate methodology to identify possible adulterations in herbal drugs and phytotherapics to ensure its efficacy, safety and quality to consumers. The data generated from these hyphenated analytical techniques and, the use of chemometrics, result in more valuable information regarding the authenticity of the plants used in the fabrication of herbal medicinal products. Modern analytical methods such as HPLC and UHPLC when used simultaneously with MS, RMN and chemometrics generate more precise and faithful results in the referred analysis and are useful tools in the identification of adulteration in herbal drugs and phytotherapics.

Keywords: Medicines; hyphenated analytical methods; chemometrics; quality control.

Resumo

A utilização de medicamentos fitoterápicos e drogas vegetais pela população e a busca por terapias à base de plantas tem crescido consideravelmente nos últimos anos. Com essa crescente demanda, torna-se cada vez mais necessário o controle de qualidade eficiente para esses medicamentos. A prática mais utilizada nos dias atuais para padronização de produtos de origem vegetal é a identificação de seus marcadores fitoquímicos, que são característicos para cada espécie. Porém, sabe-se que tal metodologia pode deixar a desejar, visto que muitos marcadores podem não apresentar relação com sua atividade biológica. Uma alternativa para o controle de qualidade mais eficiente desses produtos consiste na utilização de técnicas analíticas já conhecidas, o que resulta na avaliação desses fitoterápicos em sua totalidade. Este trabalho é uma revisão bibliográfica, em que foram avaliados diferentes métodos analíticos acoplados e pretende informar sobre as metodologias que tenham maior sensibilidade, facilidade e fidelidade nas análises, a fim de evidenciar quais seriam mais apropriadas na verificação de possíveis adulterações e fraudes em fitoterápicos e drogas vegetais, garantindo maior eficácia, segurança e qualidade para o consumidor. Os dados gerados a partir do uso de técnicas analíticas hifenadas e a utilização da quimiometria na interpretação dos dados, resultam em informações valiosas no que diz respeito à autenticidade das plantas utilizadas na produção dos medicamentos à base de drogas vegetais. Foi possível observar que o uso de técnicas analíticas modernas, como o HPLC e UHPLC utilizadas simultaneamente com MS, RMN e quimiometria geram resultados mais precisos e fiéis nas análises destes produtos, sendo ferramentas úteis na identificação de adulterações em drogas vegetais e fitoterápicos.

Palavras-chave: Drogas Vegetais; técnicas analíticas hifenadas; quimiometria; controle de qualidade.

* Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Ciências e Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Diagnóstico Bucal, Av. Engenheiro Francisco José Longo 777/778, CEP 12245-000, Jardim São Dimas, São José dos Campos-SP, Brasil.

cris.marcucci@yahoo.com.br
DOI: [10.21577/1984-6835.20200084](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200084)

Técnicas Analíticas Hifenadas na Identificação de Marcadores Químicos e Adulterações em Produtos Naturais

Ana Carolina Storion,^a Carolina Passarelli Gonçalves,^b Maria Cristina Marcucci^c

^a Universidade Anhanguera de São Paulo, Programa de Mestrado Profissional em Farmácia, Av. Raimundo Pereira de Magalhães 3305, CEP 05145-200, Pirituba, São Paulo-SP, Brasil.

^b Universidade Anhanguera de São Paulo, Programa de Pós-graduação em Farmácia e Biotecnologia, Av. Raimundo Pereira de Magalhães 3305, CEP 05145-200, Pirituba, São Paulo-SP, Brasil.

^c Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Ciências e Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Biociências e Diagnóstico Bucal, Av. Engenheiro Francisco José Longo 777/778, CEP 12245-000, Jardim São Dimas, São José dos Campos-SP, Brasil.

*cris.marcucci@yahoo.com.br

Recebido em 7 de Fevereiro de 2020. Aceito para publicação em 21 de Junho de 2020.

1. Introdução

2. Objetivos

3. Materiais e Métodos

4. Resultados e Discussão

4.1. Uso da hifenização na elucidação estrutural de moléculas de origem vegetal

4.2. A hifenização na escolha do melhor solvente para a extração de drogas vegetais

4.3. A hifenização e a influência da sazonalidade de marcadores em drogas vegetais

4.4. A hifenização evidenciando fraudes

5. Conclusões

6. Glossário

1. Introdução

A adulteração de plantas medicinais é um problema real que, afeta diretamente a saúde pública, fazendo-se necessário um controle de qualidade mais rigoroso e eficaz tanto para os extratos ainda brutos quanto para as fórmulas farmacêuticas.

Os eventos adversos decorrentes do consumo de plantas medicinais são atribuíveis a vários fatores, entre os quais, o uso incorreto de espécies de plantas e a adulteração das matérias primas se destacam.¹ Segundo dados do Sinixtox (Sistema

Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas) em 2016 ocorreram mais de 1200 casos de intoxicação por plantas em todo o Brasil.² Estes dados são preocupantes, visto que a população brasileira em geral, têm buscado tratamentos à base de plantas medicinais ou medicamentos fitoterápicos. Segundo a ANVISA entre 2013 e 2015 a busca por esses produtos no Sistema Único de Saúde (SUS) cresceu 161%.

Como exemplo de adulterações, pode-se citar a espinheira santa, e sua análise morfológica que, algumas vezes, é muito limitada, pois existem espécies do mesmo gênero *Maytenus* com fisiologia muito semelhante. A espinheira santa verdadeira,

a *Maytenus ilicifolia* é frequentemente confundida com as espécies *Zolernia ilicifolia* e *Sorocea bomplandii* devido à sua semelhança morfológica, o que causa problemas na comercialização e afeta a segurança dos consumidores.³⁻⁷

Outro exemplo é a catuaba da espécie *Anemopaegma arvense*, também conhecida por alecrim-do-campo, catuabinha, caramuru, piratançara, pau-de-resposta. Ela é popularmente utilizada pela sua atividade afrodisíaca e como tônico poderoso e estimulante do SNC (Sistema Nervoso Central), que se tornou escassa devido a constante utilização, sem incentivos ao cultivo. Na busca por alternativas, outras espécies vegetais começaram a ser comercializadas como catuaba, como por exemplo, as pertencentes às famílias Burseraceae, Euphorbiaceae, Erythoxylaceae, Bignoniaceae, Apocynaceae, Sapotaceae, Myrtaceae, Meliaceae. Estudos recentes confirmaram que a planta mais utilizada como catuaba é da espécie *Trichillia catigua*, da família Meliaceae.⁸⁻⁹

Diante do exposto, vem a necessidade de colocar em prática métodos analíticos rápidos, precisos e confiáveis dentro dos laboratórios de estudo, principalmente quando o intuito é investigar plantas com características morfológicas e etnofarmacológicas parecidas. Essas aplicações tendem a aprimorar e agilizar os processos de caracterização e diminuir as extenuantes etapas de fracionamento, isolamento e elucidação de metabólitos secundários presentes nos indivíduos.¹⁰

Pode-se chamar de técnicas hifenadas o acoplamento entre duas ou mais técnicas de análise com o objetivo de obter uma ferramenta analítica mais rápida e eficiente que as técnicas isoladas. As técnicas analíticas mais utilizadas em produtos à base de plantas medicinais e outros de origem natural são a espectroscopia e a cromatografia. Essas técnicas deverão gerar informações diferentes, mas quando acopladas, se complementam e fornecem informações precisas sobre a estrutura química dos componentes presentes nas amostras. Em virtude disso, é gerado um número grande de informações, sendo necessária a utilização de computadores e *softwares* para a obtenção e tratamento de dados, muitas vezes associados ao uso da quimiometria.¹¹

O controle de qualidade, no que diz respeito à caracterização química dos fitoterápicos, abrange uma série de técnicas diferentes como as clássicas, de reação de identificação dos compostos químicos (fenóis, saponinas,

alcaloides, dentre outros) que são de baixo custo, porém apresentam o inconveniente de serem pouco sensíveis e específicas, visto que diversos metabólitos secundários são comuns a várias espécies de vegetais, até técnicas cromatográficas mais avançadas.¹²

O estudo morfológico das plantas, e o estudo das suas estruturas químicas, associadas aos processos cromatográficos (CCD, HPLC, CG) e as técnicas espectroscópicas (UV, IV, RMN) tem sido cada vez mais utilizadas para a avaliação dos compostos naturais. A associação destas técnicas permite a identificação de milhares de substâncias nas plantas, dentre outras fontes naturais, levando em conta também a pesquisa de novas ferramentas de prospecção para novos fitoterápicos.¹³

A associação de técnicas analíticas já é conhecida desde a década de 60, mas tornou-se popular na década de 80. O acoplamento de técnicas analíticas vem propiciando o conhecimento de informações mais precisas sobre os compostos presentes nos fitoterápicos.¹⁴ Frequentemente, a terminologia “técnicas analíticas hifenadas” tem sido aplicada ao acoplamento da espectrometria de massas (MS) a cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (EC), e a combinação da cromatografia líquida com a ressonância magnética nuclear.¹⁵

Pode-se dizer que existem limitações nas aplicações das técnicas de separação. No HPLC operando com detector UV/VIS, a dificuldade pode ser justificada devido a presença de cromóforos encontrados em produtos naturais, na faixa selecionada para este detector. O detector de arranjo de diodos (DAD) facilitou este tipo de análise, realizando uma varredura que se estende entre 200-800nm. A maior vantagem dessa técnica se dá pelo baixo preço, quando comparado a outras técnicas. Mesmo assim há necessidade de criação de técnicas hifenadas atualizadas, como a junção da HPLC com o espectrômetro de massas e com RMN.¹⁴⁻¹⁵

2. Objetivos

Avaliar as técnicas hifenadas descritas na literatura, mais utilizadas para a identificação e caracterização das drogas vegetais do gênero *Ocotea*, *Aniba*, *Phyllanthus*, *Serenoa*, *Mikania*, *Maytenus*, além de outros produtos naturais como o mel.

Tabela 1. Aplicações de técnicas hifenadas na área de plantas medicinais e outros produtos naturais

Técnicas hifenadas	Características	Alguns exemplos de aplicação na área de plantas medicinais
GC-MS	Identificação de compostos. Fornece informação estrutural da molécula. Permite comparação com bibliotecas espectrais.	Estudo da sazonalidade de algumas classes de metabólitos secundários, caracterização de aromas, identificação de terpenoides. Análise de flavonoides.
GC-MS-MS	Confirmação estrutural de moléculas.	Análise de fragrâncias.
LC-DAD	Identificação de compostos conhecidos, através da comparação do tempo de retenção e espectro UV com o padrão analítico. Não fornece informação estrutural.	Análise de polifenóis. Controle de qualidade de plantas medicinais, busca de metabólitos ativos, estudos de ecologia química e quimiossistemáticos.
LC-MS	Raramente resulta na identificação definitiva. Muitas vezes utilizada com LC-DAD para fornecer informações estruturais complementares.	Análise de antocianinas.
LC-MS-MS	Determinação de novos compostos, com a vantagem da simplicidade no preparo da amostra e rapidez na obtenção dos resultados.	Determinação de flavonoides e saponinas. Análise de polifenóis.
LC-NMR	Fornece informações estruturais (espectro ¹ H-RMN). Constitui-se a técnica mais poderosa na determinação estrutural de substâncias inéditas com novos esqueletos e em misturas biologicamente ativas.	Determinação de alcaloides e flavonoides. Determinação da autenticidade de produtos naturais.

3. Materiais e Métodos

Para o levantamento de dados comparativos a fim atingir os objetivos propostos, foram utilizadas como bases de dados para a busca dos estudos o Portal Periódicos Capes, Web of Science, Scielo, Lilacs, Science Direct e Google acadêmico. Para a busca foram considerados apenas estudos nos idiomas inglês e português, publicados no período entre 2005 e 2020.

Todos os estudos selecionados foram avaliados baseando-se nos seguintes critérios de inclusão:

- Estudos oriundos de livros, monografias, dissertações, teses ou relatórios;
- Artigos científicos revisados por pares;
- Estudos com texto disponível na íntegra;
- Estudos que apresentem as drogas vegetais do gênero *Ocotea*, *Aniba*, *Phyllanthus*, *Serenoa*, *Mikania*, *Maytenus*, e o mel, empregados como exemplos do uso das técnicas hifenadas para a detecção de adulterações.

Após a primeira avaliação, os estudos que preencheram aos critérios de inclusão foram revisados na íntegra, sendo então considerados não elegíveis aqueles que apresentassem pelo menos um dos seguintes critérios de exclusão:

- Estudos que não apresentam metodologias bem definidas;

- Estudos que não apresentam em seu título ou resumo, os descritores selecionados para a busca.

Por meio das bases de dados citadas, foram encontrados e elegidos os trabalhos para prosseguimento e desenvolvimento das análises comparativas nesta pesquisa. Todos os trabalhos elencados são relacionados à identificação de marcadores químicos, adulterações e fraudes em alimentos, medicamentos fitoterápicos ou drogas vegetais, sendo estes os descritores utilizados na busca bibliográfica.

4. Resultados e Discussão

Considerando os parâmetros escolhidos para a busca, foram encontrados 03 livros; 02 monografias, 07 dissertações, 5 teses, e 55 artigos científicos. Dos estudos encontrados foram selecionados 56 para esta revisão.

Para evitar vieses na seleção dos estudos, a inclusão das referências na pesquisa foi realizada por dois revisores, que selecionaram os estudos de maneira independente e com base nos critérios de inclusão e exclusão.

A atividade biológica de extratos e preparações obtidas a partir de plantas pode resultar da sinergia de compostos ativos em vez de uma

única entidade química. A qualidade dos extratos é extremamente importante e esta é a razão pela qual as diretrizes legais são obrigatórias para cumprir as Boas Práticas de Agricultura e Coleta (GACP), Boas Práticas de Fabricação (GMP), Normas Farmacopeicas e Diretrizes de Produtos Herbáceos.¹⁶

4.1. Uso da hifenização na elucidação estrutural de moléculas de origem vegetal

Para elucidar a estrutura dos compostos orgânicos a partir de extratos brutos, realizada antes do trabalho de isolamento, estratégias de triagem química baseadas em técnicas hifenizadas, como detecção por cromatografia líquida com arranjo de fotodiodos (LC-DAD), por cromatografia líquida-ultravioleta (LC-UV), espectrometria de massa por cromatografia líquida (LC-MS), espectrometria de massa por cromatografia líquida (GC-MS) e ressonância magnética nuclear por cromatografia líquida (LC-RMN) são cada vez mais utilizadas.¹⁷⁻²⁰

A título de exemplo da hifenização, cita-se o trabalho de Queiroz (2009) que estudou as folhas e galhos das espécies *Ocotea paranapiacabensis* (*O. paranapiacabensis*) e a folha da espécie *Aniba firmula* (*A. firmula*).^{13,21} O gênero *Ocotea*, da família Lauraceae, é encontrado na América tropical e subtropical. Apresenta cerca de 160 espécies deste gênero que, atualmente, tem sido ameaçada de extinção por conta do desmatamento e da sua dificuldade de disseminação e proliferação. Este gênero é caracterizado por suas atividades farmacológicas antibacteriana, anti-inflamatória, antialérgica e antifúngica relacionados às lignanas e alcaloides.^{13,21}

A *O. paranapiacabensis* é uma árvore de aproximadamente 8 metros, comumente chamada de “canela gosmenta”, e não possui ainda definição fitoquímica em sua bibliografia. Este gênero também possui alcaloides isoquinolínicos, indólicos e aporfinícos, lignanas, arilpropanóis e sesquiterpenos que são utilizados em óleos essenciais.²²⁻²³

O gênero *Aniba*, que é composta por 41 espécies, sendo que 27 delas encontram-se no Brasil. Alguns estudos relatam que as espécies desse gênero possuem ação antifúngica, antibacteriana e relaxante muscular, e apresentam em sua composição fitoquímica grupos alcaloides, neolignanas, flavonoides e pironas.²¹ O autor

utilizou a técnica de HPLC-DAD, com o intuito de obter os perfis cromatográficos (*fingerprints*) dos extratos hidroalcoólicos das folhas e dos galhos (separadamente) de *O. paranapiacabensis*, dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *A. firmula* e das frações oriundas das etapas de extração líquido-líquido. Sobre as análises da atividade antioxidante (propriedade sequestradora do radical livre DPPH) nas folhas da *O. paranapiacabensis* da partição líquido-líquido de acetato de etila (OPFAc), nas folhas da *O. paranapiacabensis* da partição líquido-líquido de butanol (OPFBu), e das folhas da *O. paranapiacabensis* na fase aquosa (OPFaq), e foram encontrados resultados de porcentagem de sequestro de 50%, 40% e 20% respectivamente, na concentração de 20 g/mL. Os dados expostos juntamente com a semelhança nos perfis cromatográficos das frações analisadas por HPLC-DAD demonstraram semelhança qualitativa dos constituintes das frações analisadas.²¹⁻²³

Ainda em seus experimentos, Queiroz aperfeiçoou o sistema HPLC-DAD para HPLC-ESI-MS, utilizando o método de ionização por *electrospray* como fonte de íons. Através da hifenização dessas técnicas, foi possível identificar algumas substâncias isoladas nesses vegetais, constatando a presença de compostos já conhecidos nos gêneros *Ocotea* e *Aniba*. Juntamente, conjugada com a abordagem *in silico*, identificou também constituintes majoritários presentes nas frações de acetato de etila das folhas das espécies estudadas. Foram identificados dois flavonoides do tipo canferol-O-glicosilados ainda não relatados à época, para o gênero *Ocotea*, bem como quatro estilipironas já previamente isoladas para o gênero *Aniba* e duas estilipironas inéditas na literatura.^{13,21} A partir dos dados levantados em seu trabalho, é possível concluir que ao utilizar a técnica hifenada HPLC-ESI-MS associada a abordagem *in silico*, há uma eficiência na detecção *in situ* dos constituintes das matrizes complexas estudadas, possibilitando também o encaminhamento de estudos futuros em regiões específicas do perfil cromatográfico, buscando a detecção e identificação de moléculas inéditas. O autor citou também que o processo experimental poderá ser aprimorado com a utilização de técnicas espectroscópicas modernas, como a RMN, a fim de mostrar outras moléculas, bem como ajudar na compreensão de relações de sinergismo.^{13,21,24}

Com respeito às análises da atividade antioxidante da fração OPFAc, foram encontradas

duas substâncias responsáveis pela ação antioxidante, os flavonoides canferol-3-*O*-glicosídeo e canferol-3-*O*-ramnosídeo. A utilização de metodologia *in silico* possibilitou a rápida identificação destes compostos bioativos, sem prévio isolamento. Juntamente com uma abordagem *in silico*, foram identificadas ainda, estruturas isoméricas de alcaloides aporfinicos, além de dois flavonoides de tipo canferol-*O*-glicosilados ainda não relatados para o gênero *Ocotea*. Esses flavonoides foram isolados e suas estruturas confirmadas através de experimentos de RMN ¹H e ¹³C. Verificou-se assim eficiência da análise *in silico* na detecção de constituintes presentes na matriz complexa estudada.²¹

A partir do espectro de massa da fração OPFAC e com abordagem *in silico*, quatro estilipironas previamente isoladas para este gênero, foram identificadas. A partir da análise desses dados, os constituintes químicos presentes em uma região específica do perfil cromatográfico foram isolados, e não foram detectados na análise *in silico*.²⁴

Sprenger (2011), com o objetivo de comparar quimicamente metabólitos secundários e diferenciar quimicamente extratos aquosos de quatro espécies do gênero *Phyllanthus* (popularmente conhecida como quebra-pedra) utilizou a HPLC acoplada a MS. As amostras analisadas foram de *Phyllanthus amarus*, *Phyllanthus stipulatus*, *Phyllanthus niruri* e *Phyllanthus tenellus*, onde as duas últimas são as espécies oficiais catalogadas pela Farmacopeia Brasileira. A caracterização estrutural foi realizada por meio da MS/MS, com fonte de ionização por *electrospray*.¹²

As amostras foram também previamente analisadas por LC-UV para isolamento dos marcadores químicos, e posteriormente suas estruturas foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas. Diversos compostos foram elucidados, sendo que alguns são comuns às quatro espécies e outros exclusivos de determinada espécie, como é o caso das estruturas inéditas identificadas para o gênero *Phyllanthus*, como algumas flavonas C-glicosiladas (vitexina-2"-*O*-ramnosídeo e orientina-2"-*O*-ramnosídeo) presentes somente no extrato aquoso da espécie *P. niruri*, que juntamente com o 1-*O*-galoil-3,6-hexadihidroxidifenol-glicopiranosose, podem servir como padrão em extrato aquoso para esta espécie. O autor concluiu que a HPLC acoplada a detectores sensíveis e específicos como o espectrômetro

de massas é uma poderosa ferramenta para o controle de qualidade de plantas medicinais, pois proporciona padrões de qualidade mais seguros aos fitoterápicos. As análises por HPLC-MS foram realizadas com rapidez e sem grandes gastos com solventes, e permitiram a caracterização de compostos mesmo que em pequenas quantidades devido à sua alta sensibilidade, além de evidenciar informações valiosas sobre as estruturas dos metabólitos secundários dos vegetais estudados.¹²

Entretanto, o mesmo autor verificou que alguns compostos apresentaram dados insuficientes para caracterização estrutural completa, onde foi necessária utilização de RMN. Foi também caracterizado o composto raramente encontrado em espécies vegetais, quercetina-3-*O*-glicuronídeo. Este composto foi encontrado exclusivamente nas espécies *P. amarus* e *P. stipulatus*, podendo servir como marcador fitoquímico dessas espécies.¹² Definiu-se então, a partir dos dados do trabalho de Sprenger que a técnica acoplada HPLC-MS demonstrou grande eficiência na caracterização dos metabólitos secundários das espécies estudadas, podendo ser aplicado com segurança nas análises de materiais vegetais, assegurando a autenticidade das drogas vegetais.

4.2. A hifenização na escolha do melhor solvente para a extração de drogas vegetais

A equivalência fitoquímica de *Saw palmetto*¹⁹⁻²⁵ quando extraído em diferentes solventes como etanol, dióxido de carbono supercrítico e hexano, conforme estabelecido na Farmacopeia Americana e Farmacopeia Europeia, foi estudada por Carmin.¹⁹ Para isto, foi necessária a utilização de técnicas espectroscópicas, como RMN para obtenção de dados das amostras.¹⁹

Carmin e colaboradores (2019), verificaram que as amostras extraídas com hexano (cor vermelha) e dióxido de carbono supercrítico CO₂ (cor azul) apresentaram comportamento semelhante. Os dados foram avaliados por quimiometria (análise multivariada – PCA) para auxílio na comparação dos dados e interpretação dos resultados, conforme a análise quimiométrica apresentada na Figura 1. A matriz de dados foi processada fazendo uso da Análise de Componente Principal (PCA) programada no *software* MATLAB da Math Works (Natick, EUA).¹⁹ Porém, o extrato de *Saw palmetto* quando obtido com o solvente etanol não apresentou

Figura 1. PC1 versus PC2 de amostras de *Saw palmetto*. Azul: amostras extraídas com solvente CO₂ supercrítico; vermelho: amostras extraídas com solvente hexano; verde: amostras extraídas com solvente etanol.¹⁹

diferenças significativas na composição fitoquímica em relação aos outros dois, pois possui grande concentração de ácidos graxos monoinsaturados, 1,3 diglicerídeos e grande concentração de ácido linoléico, que apresentam menor polaridade em relação ao solvente etanol. Sendo assim, os autores concluíram através da análise multivariada, que os resultados demonstrados em seu trabalho podem ser atribuídos a variabilidade natural das frutas do *Saw palmetto*, como mudanças climáticas, por exemplo.²⁶⁻²⁹

4.3. A hifenização e a influência da sazonalidade de marcadores em drogas vegetais

É sabido que as concentrações dos componentes ativos podem variar de acordo com a sazonalidade e condições de cultivo, afetando assim a segurança, qualidade e eficácia dos medicamentos à base de plantas.²⁶⁻²⁹

Almeida e colaboradores (2016) avaliaram por UHPLC-MS/MS os extratos hidroalcóolicos das espécies *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*, popularmente conhecidas como guaco, e como as condições de sazonalidade (temperatura, luminosidade e disponibilidade de água) interferem em três de seus constituintes químicos: a cumarina (marcador químico tradicionalmente descrito para essas espécies), o ácido clorogênico (ácido 3-*O*-cafeoilquínico) e ácido dicafeoilquínico.²⁹

Neste trabalho, após todo plantio, as amostras de folhas jovens e adultas foram coletadas três vezes ao dia (manhã, meio-dia e à tarde), uma vez ao mês. Os

extratos foram avaliados por UHPLC-M/MS, sendo que os dados dos principais picos encontrados através do acoplamento destas técnicas foram coletados e avaliados por análise multivariada (PCA). Conforme mostrado na Figura 2, as amostras ficaram agrupadas em 2 grupos, mostrando que têm diferenças químicas entre si.²⁹

Nos pontos de *loadings* (Figura 2B), foi possível verificar que, três ions foram importantes na separação das amostras, sendo designados como marcadores químicos: relação *m/z* 147 para as amostras de *M. laevigata*, *m/z* 353 e 515 para *M. glomerata*.²⁹

O marcador químico foi encontrado e identificado por UHPLC-MS/MS. A cumarina e ácido clorogênico foram identificados por comparação com padrões desses compostos. A cumarina (*m/z* 147) apresentou tempo de retenção (*t_R*) de 4,92 minutos, o ácido clorogênico (*m/z* 353) *t_R* de 1,83 minutos e o ácido dicafeoilquínico (*m/z* 515), *t_R* de 4,16 minutos. Notou-se que o tempo de retenção da cumarina (*t_R* 4,92 min) e do ácido dicafeoilquínico (*t_R* de 4,16 e 4,54min) são muito próximos, o que pode ter levado à má identificação dos mesmos em estudos anteriores, sendo este ácido facilmente confundido com a cumarina, o que levava à interpretação de que a cumarina é usualmente encontrada em ambas as espécies de guaco, o que é uma falsa afirmação.²⁹

Também foi verificado que o maior teor de cumarina foi encontrado nos extratos de *M. laevigata* referente às folhas coletadas de março a julho, as quais foram cultivadas sob 50% de

(A) Scores das amostras PC1 x PC2. *M. glomerata* ▲, *M. laevigata* ●.²⁹

(B) Loadings dos ions²⁹

Figura 2. Análise das componentes principais – PCA dos principais picos encontrados na análise por UHPLC-MS das amostras de acordo com a sazonalidade

sombra, temperatura de 10 a 22 °C, com pouca disponibilidade de água. A espécie *M. glomerata* mostrou alto conteúdo de ácidos (clorogênico e dicafeoilquínicos) crescendo ao sol, à temperatura de 10 a 22 °C. As menores concentrações foram encontradas nas amostras coletadas em julho, que coincidiu com a floração. Este estudo foi o primeiro a identificar o ácido dicafeoilquínico nos extratos de guaco, devido a utilização da técnica hifenada de UHPLC-MS, o possível obter os fragmentação dos picos selecionados.²⁹

O uso destas técnicas de modo simultâneo favorece resultados com alta especificidade e sensibilidade, permitindo uma análise qualitativa e quantitativa, simultaneamente.³⁰⁻³⁸ Além disso, os resultados deste trabalho mostraram a influência significativa da sazonalidade sobre esses compostos, indicando qual é o melhor período do ano para a colheita das folhas, e assim obter maior concentração de cumarina, o marcador químico do guaco, assim como dos outros compostos naturais que em sinergismo podem, atuar de maneira benéfica no organismo.

O inverno foi a estação do ano em que a espécie *M. laevigata* apresentou teor de cumarina mais elevado. Mesmo assim, a diferença das composições entre as duas espécies foram maiores do que as variações de sazonalidade ou de condições de colheita dentro da mesma espécie, uma vez que a cumarina, marcador químico catalogado para ambas as espécies estudadas, esteve praticamente ausente na espécie *M. glomerata* em todas as condições estudadas. Sendo assim, não é indicado o uso dessas espécies sem distinção, uma vez que o efeito terapêutico pode não ser atingido.²⁹

4.4. A hifenização evidenciando fraudes

A ciência moderna desenvolveu técnicas químicas imensamente poderosas, que podem fornecer informações sobre características únicas que os fabricantes deixam em seus produtos. Essas análises podem fornecer aos pesquisadores a evidência necessária para detectar medicamentos, alimentos ou drogas vegetais falsificadas a fontes específicas.³⁰⁻³⁸

Daolio (2006) descreveu em seu trabalho uma metodologia de análise para os fitoterápicos de catuaba, espinheira santa e guaco, fundamentado no perfil metabólico, onde a RMN e a HPLC foram utilizados para obter o *fingerprinting*

desses medicamentos fitoterápicos.³⁹ Para a espinheira santa, a utilização de RMN e HPLC possibilitou verificar que a maioria das amostras comerciais analisadas no trabalho não utilizava a espécie *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa verdadeira). Para o guaco, os resultados obtidos a partir de RMN e HPLC foram contraditórios, sendo necessária utilização de técnica analítica complementar como o acoplamento da HPLC com MS/MS. Utilizando essas técnicas, a autora identificou a cumarina-1,2-benzopirona em todas as amostras de guaco analisadas, atestando assim a autenticidade das mesmas.³⁹

A espinheira santa, popularmente conhecida por sua principal ação farmacológica de proteção contra úlcera gástrica, dentre várias outras,⁴⁰⁻⁴³ foi avaliada por Games (2010).⁴⁴ Para as amostras de *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa), foram determinados os parâmetros físico-químicos, químicos e microbiológicos, bem como a atividade antioxidante, correlacionando-se os resultados através de análise multivariada. Foram avaliadas nove amostras de folha da droga vegetal de diferentes marcas comercializadas no Estado de São Paulo, e em caráter complementar, foram analisadas outras dez amostras da droga de diferentes formas farmacêuticas as quais foram submetidas à análise estatística multivariada, como chás, extratos fluídos, extrato seco e cápsulas. Games, ao analisar amostras da droga utilizou, dentre outras técnicas, a CCD para elucidar amostras verdadeiras e falsas, que foi eficaz na determinação da autenticidade da planta estudada, uma vez que as manchas das amostras verdadeiras foram similares, excetuando a amostra falsa, que não apresentou manchas, conforme cromatograma a seguir (Figura 3).

A Farmacopeia Brasileira, em sua quinta edição preconiza a avaliação da autenticidade de drogas vegetais empregando a CCD. No presente caso, foi constatada a fraude na amostra 6 das drogas vegetais de espinheira santa. No teste de determinação do teor de taninos totais, a mesma autora determinou que todas as drogas vegetais analisadas atendiam o teor mínimo de taninos, preconizado para a espécie, de 2%.⁴⁴ Os dados da CCD e os quantitativos (teor de taninos) pareciam ser antagônicos, uma vez que na CCD ficou evidenciado que a amostra 6 era falsa, mas continha o teor de taninos acima do mínimo estabelecido.

Na continuidade dos experimentos, Games analisou as drogas vegetais apresentando um

Figura 3. Cromatografia em camada delgada (CCD) de amostras de drogas vegetais de *Maytenus ilicifolia* (espíneira santa)⁴⁴

fingerprinting em MS (Figura 4), onde foram elucidados os principais íons e suas intensidades. Estes valores, somados aos teores de polifenóis (PT), taninos totais (TT) e polifenóis não adsorventes (PNA) e a atividade antioxidante foram imputados numa matriz para análise multivariada (Figura 5).⁴⁴

Para droga vegetal, foram analisados o *fingerprinting* por espectrometria de massas, os teores de polifenóis, polifenóis não adsorventes

e taninos totais e atividade antioxidante. Para as outras formulações comerciais, foram analisados o *fingerprinting* por espectrometria de massas das soluções mãe dos produtos comerciais. A autora, junto com outros colaboradores, verificou que houve uma tendência de separação das amostras. Os valores que formaram um aglomerado nos gráficos são, provavelmente, os principais marcadores das amostras de espíneira santa, autênticas (Figura 5).⁴⁴⁻⁴⁶

Figura 4. *Fingerprinting* por espectrometria de massas de amostras de espíneira santa⁴⁴

Figura 5. Scores das amostras (a) (drogas vegetais de espinheira santa) e *loadings* (b) dos íons e/ou dados físico-químicos**Polifenóis totais (%PT), polifenóis não adsorventes (%PNA) e taninos totais (%TT) e a CE50 (dose que elimina 50% dos radicais livres de DPPH, em µg/mL⁴⁴

A área circulada evidenciou a tendência de separação das amostras, no quadrante positivo do gráfico. Foi possível também verificar na área circulada a presença de íons, que provavelmente são os principais marcadores das amostras da espinheira santa autêntica, que tem entre eles uma média semelhante, sendo que apenas as amostras 1 e 7 estão fora do grupo (quadrante positivo). A amostra 6 está fora do grupo (quadrante negativo), uma vez que todos esses parâmetros sem encontram no quadrante negativo, comprovando a falsificação da mesma.

Os resultados obtidos por Games em 2010, na determinação de taninos totais encontravam-se dentro da especificação (mínimo de 2%, conforme

a Farmacopeia Brasileira, 1998), mesmo a amostra sendo considerada falsa. A autora concluiu então que, para esta análise, o limite é muito genérico e não confiável para detectar possíveis adulterações em drogas vegetais no mercado. Não há parâmetro para a determinação de fenóis totais. Quanto à atividade antioxidante, a amostra falsa não demonstrou ter atividade antioxidante comprovada devido ao alto valor de CE₅₀, comprovando sua falsificação. Portanto, o método de atividade antioxidante pode ser empregado nessa avaliação como informação complementar.⁴⁴

Um produto natural que apresenta grandes problemas com respeito a fraudes é o mel. É muito difícil detectar adulterações, pois a “indústria da

fraude” se especializou de tal forma que as análises convencionais, preconizadas por órgãos oficiais são incapazes de detectar contraversão.⁴⁷⁻⁴⁸

A origem floral do mel é geralmente determinada por análise de pólen (melissopalínologia), no entanto, a melissopalínologia tem limitações, em relação a profissionais especializados e com grande conhecimento de morfologia.⁴⁹

Basicamente, o mel é composto por diferentes proporções de açúcares (principal constituinte, com 95% do peso seco do mel), água, aminoácidos, óleos, sais minerais e enzimas especiais produzidas por abelhas. Por se tratar de um produto natural, nada deve ser extraído ou adicionado no mel, porém algumas adulterações acontecem pela adição de açúcar no mel, o que impacta diretamente no preço deste produto, que é amplamente comercializado.⁵⁰

Atualmente, as técnicas analíticas utilizadas na análise de mel envolvem pré-tratamento de amostras, fato que torna as análises demoradas e trabalhosas. A RMN tem como principal vantagem na análise do mel o fato de ser não invasiva e de rápida aquisição de dados, fornecendo informações detalhadas sobre todos os metabólitos em apenas uma análise. A riqueza das informações obtidas é muito complexa para ser interpretado sem auxílio e por profissionais sem treinamento, o que torna necessária a utilização de análise multivariada na interpretação dos dados espectrais obtidos a partir da RMN.⁵¹⁻⁵³

A maioria dos estudos sobre metabólitos realizados através da RMN foca, no hidrogênio,

pois este fornece maior sensibilidade, em comparação com ^{31}P , ^{13}C , ^{17}O ou ^{15}N .⁵²

Um índice de classificação pode ser calculado e utilizado para determinar a origem floral do mel como alternativa ao teste melissopalínológico muito tabaloso e muitas vezes inconclusivo.

Na técnica descrita por Schievano e colaboradores (2010) foi possível determinar a porcentagem de várias espécies botânicas em amostras poliflorais. Este método parece ser uma abordagem promissora para discriminar entre várias amostras de mel, tanto uniflorais como poliflorais, utilizando uma única medição espectroscópica.⁴⁷

Boffo e colaboradores (2012) utilizando a RMN combinada à análise quimiométrica, descreveram a variabilidade da composição das amostras de mel produzidos no Estado de São Paulo, bem como diferenciaram o néctar empregado em sua produção.⁴⁸ Foram coletadas 46 amostras, levando em conta 03 categorias: méis de flores silvestres, eucalipto e citros. Após análise por RMN, foi aplicada a análise quimiométrica PCA e HCA para os dados obtidos através da ^1H RMN. Geralmente, esses métodos não supervisionados (PCA e HCA) tornam-se o primeiro passo na análise de dados, pois permitem que esses resultados sejam visualizados em espaço dimensional reduzido construído sobre a diferença entre as amostras em relação às suas propriedades químicas.⁴⁸

Na análise multivariada por PCA apresentada na Figura 7, é possível visualizar com clareza as amostras designadas como adulteradas

Figura 6. Análise parcial de mínimos quadrados-discriminantes de 85 amostras de mel.⁴⁷ As letras indicam as fontes de mel, A: mel multifloral, B: mel de tília, C: mel de castanha e D: mel de acácia

Figura 7. Análise estatística multivariada (PC1 X PC2) de méis analisados por ^1H RMN.⁴⁸

circuladas. Os méis de flores silvestres foram bem discriminados no quadrante negativo, entretanto não foi possível distinguir satisfatoriamente os méis de assa-peixe e citricos. Os méis adulterados demonstraram presença de 5-hidroximetilfurfural (HMF), ácido cítrico e ausência dos aminoácidos, geralmente encontrados. O ácido cítrico provavelmente foi adicionado intencionalmente para funcionar como antioxidante, e o HMF é um indicativo de adulteração por adição de sacarose. No entanto, o HMF também pode estar presente no mel quando este é submetido a temperaturas elevadas por um longo período de tempo, armazenamento inadequado, alterações de pH, dentre outros motivos.⁵¹

A concentração de HMF – hidroximetilfurfural é um importante parâmetro no que diz respeito à qualidade do mel. Quanto mais tempo de armazenamento e calor, maior a concentração, enquanto os méis frescos contêm apenas vestígios de HMF. No intuito de discriminar ainda melhor os méis, as amostras foram submetidas à análise por HCA, sendo que os resultados mostraram que todas as amostras analisadas apresentam diferenças químicas entre si (Figura 8).⁵¹

Como conclusão, verificou-se que os méis de flores silvestres foram caracterizados por possuírem maior concentração de fenilalanina e tirosina. Os méis de citros mostraram quantidade mais elevada de sacarose do que outros

Figura 8. Análise hierárquica por clusters (HCA), dendrograma obtido através dos dados dos espectros ^1H RMN de diferentes tipos de méis.⁴⁸

compostos, os méis de eucalipto apresentaram maior quantidade de ácido láctico do que os demais. Os méis de assa-peixe apresentaram espectros semelhantes aos de eucalipto e citros. O mel de cana-de-açúcar mostrou sinais semelhantes ao mel de eucalipto e ao mel de citros, mas também apresentou traços de tirosina e fenilalanina. Os méis que apresentaram adulteração apresentaram 5-hidroximetilfurfural, ácido cítrico e etanol.⁵⁴

As aplicações de quimiometria para os espectros de ^1H RMN permitiram discriminar os méis obtidos a partir de eucalipto, citros e flores silvestres das amostras coletadas no Estado de São Paulo, sendo identificadas as amostras adulteradas. Os métodos quimiométricos mostraram que é possível classificar as amostras de mel comercial de acordo com o néctar do qual são gerados. A análise por PCA permitiu discriminar os méis que mostraram adulterações, bem como a identificação dos compostos envolvidos. A espectroscopia de ^1H RMN mostrou-se uma ferramenta válida na caracterização de alimentos, como o mel, combinada com técnicas quimiométricas, verificando-se o aprimoramento no que diz respeito a classificação das amostras, que não precisaram de muitos cuidados na etapa de preparação e se obteve alta qualidade nos resultados obtidos, o que representa uma vantagem e uma alternativa para análises complexas e demoradas, principalmente no tocante a evidencição de adulterações.⁵¹

A técnica de RMN já é utilizada e recomendada para validação de produtos farmacêuticos em farmacopeias internacionais.⁵⁵ Baseado na RE Nº 899, Colnago validou um método de análise por RMN para produtos farmacêuticos, que apresentou seletividade, linearidade, precisão, repetibilidade e robustez satisfatórias, concluindo que através de uma única análise por RMN, é capaz de fornecer informações estruturais e quantitativas dos componentes ativos e excipientes de produtos terminados.⁵⁶

A quantificação simultânea de princípios ativos diferentes mostrou ser um método bastante promissor, assim como as análises qualitativas dos espectros de RMN de ^1H das amostras comerciais, as quais propiciaram a identificação de outros componentes presentes na formulação (excipientes) de algumas das amostras analisadas. Nesse contexto, concluiu-se que uma única medida de RMN de ^1H pode fornecer informações estruturais significativas sobre ativos e excipientes,

além das informações quantitativas desses compostos, o que contribuiu para um controle de qualidade eficiente, simples e rápido.

5. Conclusões

Com a crescente busca por terapias à base de plantas, a utilização de medicamentos fitoterápicos e drogas vegetais têm crescido consideravelmente e assim, há necessidade de novos estudos relacionados à qualidade desses produtos. A fabricação de medicamentos à base de ervas deve apresentar qualidade assegurada, que depende diretamente de fatores como matéria prima, processo de fabricação, cumprimento das especificações, dentre outros, e não pode permitir adulterações acidentais como consequência de um controle de qualidade deficiente, nem adulterações intencionais para ganhos financeiros. Essas adulterações (acidentais e intencionais) e o uso de plantas não verdadeiras justifica a importância de análises robustas no controle de qualidade das empresas fabricantes de medicamentos, como o uso de técnicas analíticas hifenadas aliadas à análise multivariada na elucidação de fraudes em drogas vegetais, fitoterápicos e outros produtos naturais. A indústria apícola também se mostra muito preocupada com respeito a adulterações encontradas em seus produtos, de difícil detecção.

Os estudos relacionados às estruturas químicas das plantas têm sido associados aos processos cromatográficos (CCD, HPLC, CG) juntamente com as técnicas espectroscópicas (UV, IV, MS, RMN). A associação destas técnicas, aliada à facilidade e à rapidez das análises, permite a identificação de milhares de substâncias, bem como identificação de marcadores fitoquímicos já conhecidos ou inéditos na literatura, o que pode ser o início para estudos de novos fitoterápicos.

As técnicas cromatográficas como HPLC e UHPLC são mais frequentemente utilizadas e se mostraram eficientes na separação e identificação das amostras e, acopladas ao DAD, MS, MS/MS juntamente com abordagem *in silico*, mostraram-se como poderosa ferramenta no controle de qualidade de plantas, no que diz respeito à identificação fitoquímica, elucidação e caracterização de estruturas químicas dos metabólitos, permitindo elevada especificidade e velocidade nos ensaios, bem como análise qualitativa e quantitativa simultaneamente.

Apesar de suas vantagens, a HPLC e a UHPLC podem ser caras, exigindo grandes quantidades de solventes orgânicos de alto custo. Além disso, embora seja relativamente fácil usar os métodos existentes para HPLC e UHPLC, pode ser complexo solucionar problemas ou desenvolver novos métodos. Isso ocorre principalmente devido à variedade de diferentes módulos, colunas e fases móveis.

Mesmo com a MS tendo se mostrado altamente eficiente e primordial para elucidação de estruturas químicas e identificação de compostos, a RMN associada à quimiometria, em especial à análise de componentes principais (PCA) desponta como o melhor e mais poderoso método atual para avaliar a consistência de lote a lote, utilizando várias variáveis analíticas e grande quantidade de amostras. Nesse sentido, é importante ressaltar que, a elucidação estrutural, seja por MS ou RMN exige pessoal treinado, o que pode dificultar a conclusão das análises.

Entretanto, os resultados permitem concluir que técnicas espectrométricas quando são aliadas à Quimiometria auxiliam claramente nos estudos que têm como objetivo a avaliação dos fitoterápicos e suas matrizes complexas. A quimiometria confirma seu grande potencial no auxílio da interpretação dos dados fornecidos pelas técnicas analíticas.

6. Glossário

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
EC	Eletroforese Capilar
HCA	Análise Hierárquica de Agrupamentos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-ESI-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Eletrospray e Massas
HPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Massas
In silico	Os modelos in silico se baseiam em modelos matemáticos e computacionais (métodos de extrapolação, redes neurais, regras e sistemas baseados em conhecimento) entre outros, visando estabelecer a relação entre as características físico químicas/estruturais e a atividade biológica.
In situ	Refere-se normalmente a "na mistura de reação", como, por exemplo, a síntese de moléculas instáveis que somente podem ser processadas em misturas, não podendo ser isoladas.

IV	Infravermelho
LC-DAD	Cromatografia Líquida com Detector de Arranjo de Diodos
LC-MS	Cromatografia Líquida com Detector de Massas
LC-RMN	Cromatografia Líquida com Detector de Ressonância Magnética Nuclear
LC-UV	Cromatografia Líquida com Detector de Ultravioleta
MS	Espectroscopia de massas
PCA	Análise das Componentes Principais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H e ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Próton (¹ H) e Carbono (¹³ C)
UHPLC-MS	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com Detector de Massas
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Detector de Ultravioleta/Visível

Referências Bibliográficas

- Ekor, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology* 2013, 4, 177. [CrossRef] [PubMed]
- Sítio do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Disponível em: <<https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//11%20-%20Plantas%20-%205.pdf>>. Acesso em: 03 maio 2020.
- Leal-Costa, M. V.; Teodoro, F.; Barbieri, C.; dos Santos, L. F. U.; de Sousa, A. L. Quality assessment of medicinal plants marketed in the Municipal Market of Campos dos Goytacazes-RJ. *Revista Fitos* 2018, 12, 127. [CrossRef]
- Silva, F. C.; Ribeiro, A. B.; Ribeiro, P. R. S. Evaluation quality of medicinal plants traded in the city of Imperatriz, Maranhão. *Scientia Plena* 2017, 13, 1. [CrossRef]
- Lima, I. E. O.; Nascimento, L. A. M.; Silva, M. S. Comercialização de Plantas Medicinais no Município de Arapiraca-AL. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 2016, 18, 462. [CrossRef]
- Jesus, W. M. M.; Cunha, T. N. Estudo das propriedades farmacológicas da espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) e de duas espécies adulterantes. *Revista Saúde e Desenvolvimento* 2012, 1, 20. [Link]
- Maroni, B. C.; Stasi, L. C.; Machado, S. R.; *Plantas medicinais do cerrado de Botucatu: guia ilustrado*, 1a. ed., UNESP: São Paulo, 2006.

- ⁸ Saleem, S.; Kazmi, I.; Afzal, M. Medicinal Plants in the Treatment of Arthritis. *Plant and Human Health* 2019, 3, 101. [CrossRef]
- ⁹ Melro, J. C.; Lima, S. A. F.; Silva Júnior, J. M.; Franco, S. P. B.; Souza, M. A.; Pimentel, Y. F. C.; Bomfim, M. R. P.; Almeida, E. M.; Costa, J. G.; Matos-Rocha, T. J.; Santos, A. F. Ethnobotanical study of Medicinal plants used by the population assisted by the "Programa de Saúde da Família" (Family Health Program) in Marechal Deodoro - AL, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 2019, 410. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰ Pasqua, C. S. P. D.; Iwamoto, R. D.; Antunes, E.; Borghi, A. A.; Sawaya, A. C. H. F.; Landucci, E. C. T. Pharmacological study of anti-inflammatory activity of aqueous extracts of *Mikania glomerata* (Spreng.) and *Mikania laevigata* (Sch. Bip. ex Baker). *Journal of Ethnopharmacology* 2019, 231, 50. [CrossRef] [PubMed]
- ¹¹ Dutra, J. C. V.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual do Espírito Santo, 2019. [Link]
- ¹² Sprenger, R. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de São Carlos, 2011. [Link]
- ¹³ Queiroz, E.; Ioset, J. R.; Ndjoko, K.; Guntern, A.; Foggin, C.; Hostettmann, K. Identification of the bioactive compounds from *Blumea gariepina* by HPLC-UV-MS and HPLC-UV-NMR, combined with HPLC-micro-fractionation. *Phytochemical Analysis* 2005, 16, 166. [CrossRef]
- ¹⁴ Lanças, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis"? *Scientia Chromatographica* 2009, 1, 35. [CrossRef]
- ¹⁵ Alves, C. A. Characterization of solvent extractable organic constituents in atmospheric particulate matter: an overview. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2008, 80, 21. [CrossRef]
- ¹⁶ Pace, R.; Martinelli, E. M. Apis of botanical origin quality and adulteration (Indena SPA) Workshop ANVISA, vídeo conferência, 29-09-2015. Usado com permissão da CATEF-ANVISA.
- ¹⁷ Stefani, R.; Dantas, P. G. B.; Costa, F. B. Elucidação estrutural de substâncias orgânicas com auxílio de computador: evoluções recentes. *Química Nova* 2007, 30, 347. [CrossRef]
- ¹⁸ Ribeiro, C. M. R.; Souza, N. A. Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. *Química Nova* 2007, 30, 1026. [CrossRef]
- ¹⁹ Perini, M.; Paolini, M.; Pace, R.; Camin, F. The use of stable isotope ratio analysis to characterize Saw Palmetto (*Serenoa repens*) extract. *Food Chemistry* 2019, 274, 26. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁰ Burns, D. C.; Mazzola, E. P.; Reynolds, W. F. The role of computer-assisted structure elucidation (CASE) programs in the structure elucidation of complex natural products. *Natural Product Reports* 2019, 36, 919. [CrossRef] [PubMed]
- ²¹ Queiroz, M. M. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista, 2009. [Link]
- ²² Ferreira, G.; Castro, M. S.; Bridi, R. Estudo exploratório da utilização de Saw Palmetto no tratamento da hiperplasia benigna da próstata por urologistas de Porto Alegre. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2008, 18, 222. [CrossRef]
- ²³ Combarieu, E.; Martinelli, E. M.; Pace, R.; Sardone, N. Metabolomics study of Saw palmetto extracts based on ¹H-NMR Spectroscopy. *Fitoterapia* 2015, 102, 56. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁴ Marti, G.; Joulia, P.; Amiel, A.; Fabre, B.; David, B.; Fabre, N.; Fiorini-Puybaret, C. Comparison of the Phytochemical Composition of *Serenoa repens* Extracts by a Multiplexed Metabolomic Approach. *Molecules* 2019, 24, 2208. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵ Habib, F.; Wyllie, M. Not all brands are created equal: a comparison of selected components of different brands of *Serenoa repens* extract. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2004, 7, 195. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁶ Moraes, P. L. R. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: *Lauraceae*. *Rodriguésia* 2018, 69, 81. [CrossRef]
- ²⁷ Souza, A. L.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Amazonas, 2014. [Link]
- ²⁸ Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 2007, 30, 374. [CrossRef]
- ²⁹ Almeida, C. L.; Xavier, R. M.; Borghi, A. A.; Santos, V. F.; Sawaya, A. C. H. F. Effect of seasonality and growth conditions on the content of coumarin, chlorogenic acid and dicaffeoylquinic acids in *Mikania laevigata* Schultze and *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) by UHPLC-MS/MS. *International Journal of Mass Spectrometry* 2017, 418, 162. [CrossRef]
- ³⁰ Dutra, J. C. V.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual do Espírito Santo, 2019. [Link]
- ³¹ Wolfender, J. L.; Queiroz, E.; Hostettmann, K. The importance of hyphenated techniques in discovery of new lead compounds from nature. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2006, 1, 237. [CrossRef] [PubMed]
- ³² Gupta, P. D. Approaches in fostering quality parameters for medicinal botanicals in the Indian context. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014, 46, 363. [CrossRef] [PubMed]

- ³³ Wachtel-Galor S.; Benzie I. F. F. Em *Herbal Medicine: An Introduction to Its History, Usage, Regulation*; Benzie, I. F. F.; Wachtel-Galor, S.; eds., CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, 2011, cap. 1.
- ³⁴ Zhou, X.; Li, C. G.; Chang, D.; Bensoussan, A. Current Status and Major Challenges to the Safety and Efficacy Presented by Chinese Herbal Medicine. *Medicines* 2019, 6, 14. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁵ Li, S.; Han, Q.; Qiao, C. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese Medicines* 2008, 3, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁶ Committee on Understanding the Global Public Health Implications of Substandard, Falsified, and Counterfeit Medical Products; *Countering the Problem of Falsified and Substandard Drugs*, 1a. ed., National Academies Press: Washington, 2013.
- ³⁷ Simmler, C. Integrated analytical assets aid botanical authenticity and adulteration management. *Fitoterapia* 2018, 129, 401. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁸ Beyene, K. Prescription medication sharing: a systematic review of the literature. *American Journal of Public Health* 2014, 104, 15. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁹ Daolio, C.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, 2006. [Link]
- ⁴⁰ Oliveira, R. S.; Coulaud, S. C.; Colaco, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2009, 19, 650. [CrossRef]
- ⁴¹ Kuna, L. Peptic Ulcer Disease: A Brief Review of Conventional Therapy and Herbal Treatment Options. *Journal Clinical Medicine* 2019, 8, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴² Gadekar, R.; Singour, P. K.; Chaurasiya, P. K.; Pawar, R. S.; Patil, U. K. A potential of some medicinal plants as an antiulcer agent. *Pharmacognosy Reviews* 2010, 4, 136. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴³ Silva, D. M.; Martins, J. L. R.; Oliveira, D. R.; Florentino, I. F.; Silva, D. P. B.; Santos, F. C. A.; Costa, E. A. Effect of allantoin on experimentally induced gastric ulcers: Pathways of gastroprotection. *European Journal of Pharmacology* 2018, 15, 68. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁴ Games, R. A. T.; Marques, L. C.; Sawaya, A. C. H. F.; Marcucci, M. C. Utilização da espectrometria de massas e análise multivariada para a confirmação da autenticidade de fitoterápicos contendo *Maytenus ilicifolia*. *Revista Fitos* 2011, 6, 7. [CrossRef]
- ⁴⁵ Alves, T. B.; Moreira, T. M. S.; Valentini, S. R.; Zanelli, C. F.; Furlan, M. Friedelin in *Maytenus ilicifolia* is produced by Friedelin synthase isoforms. *Molecules* 2018, 23, 700. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁶ Mariño, P. A.; Maldaner, G.; Menezes, A. P. S.; Reis, R. O.; Asta, A. P. D.; Vargas, J. O.; Alves, V. H.; Trindade, G. O. Phytochemical screening and assay of total polyphenols and flavonoids in different samples of holy thorn (*Maytenus ilicifolia* Mart.). *Brazilian Journal Health Review* 2019, 2, 1049. [CrossRef]
- ⁴⁷ Schievano, E.; Peggion, E.; Mammi, S. ¹H Nuclear magnetic resonance spectra of chloroform extracts of honey for chemometric determination of its botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010, 58, 57. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁸ Boffo, E. F.; Tavares, L. A.; Tobias, A. C. T.; Ferreira, M. M. C.; Ferreira, A. G. Identification of components of Brazilian honey by ¹H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods. *LWT - Food Science and Technology* 2012, 49, 55. [CrossRef]
- ⁴⁹ Agência Nacional de Vigilância Sanitária; *Farmacopeia Brasileira*, 5ª. ed.; ANVISA: Distrito Federal: Brasília, 2010.
- ⁵⁰ Sítio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Disponível em: <<http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-11-de-6-de-abril-de-2020-251701377>>. Acesso em: 20 maio 2020.
- ⁵¹ Salgueiro, F. B.; Lira, A. L.; Rumjanek, V. M.; Castro, R. N. Botanical Characterization of Brazilian Honeys by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Chemometrics, *Revista Virtual de Química* 2016, 8, 277. [CrossRef]
- ⁵² Karabagias, I. K.; Vlasίου, M.; Kontakos, M.; Drouza, C.; Kontominas, M. G.; Keramidias, A. D. Geographical discrimination of pine and fir honeys using multivariate analyses of major and minor honey components identified by ¹H NMR and HPLC along with physicochemical data. *European Food Research and Technology* 2018, 244, 1249. [CrossRef]
- ⁵³ Song, X.; She, S.; Xin, M.; Chen, L.; Vander, H. Y. V.; Rogers, K. M.; Chen, L. Detection of adulteration in Chinese monofloral honey using ¹H nuclear magnetic resonance and chemometrics. *Journal of Food Composition and Analysis* 2020, 86, 103390. [CrossRef]
- ⁵⁴ Junior, F. C. M. ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy in the studies of biosynthetic routes of natural products. *Química Nova* 2007 30, 116. [CrossRef]

⁵⁵ Holzgrabe, U.; Deubner, R.; Schollmayer, C.; Waibel, B. Quantitative NMR spectroscopy applications in drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005, 38, 806. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

⁵⁶ Colnago, L. A.; Santos, M. S. Validação de método quantitativo por RMN de ¹H para análises de formulações farmacêuticas. *Química Nova* 2013, 36, 324. [\[CrossRef\]](#)