



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**IVANILCE CRISTINA GUIMARÃES**

**CARACTERIZAÇÃO INORGÂNICA DA AYAHUASCA E  
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL PSICOTERAPÊUTICO**

CAMPINAS

2018

IVANILCE CRISTINA GUIMARÃES

## **CARACTERIZAÇÃO INORGÂNICA DA AYAHUASCA E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL PSICOTERAPÊUTICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Química na área de Química Analítica.

**Orientadora:** Profa. Dra. Alessandra Sussulini

**Coorientador:** Prof. Dr. Luis Fernando Farah de Tófoli

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA IVANILCE CRISTINA GUIMARÃES, ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ALESSANDRA SUSSULINI.

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** Não se aplica.

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

G947c Guimarães, Ivanilce Cristina, 1982-  
Caracterização inorgânica da Ayahuasca e avaliação do seu potencial  
psicoterapêutico / Ivanilce Cristina Guimarães. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Alessandra Sussulini.

Coorientador: Luis Fernando Farah de Tófoli.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de  
Química.

1. Ayahuasca - Uso terapêutico. 2. Elementos traços. 3. ICP-MS. 4. ICP  
OES. I. Sussulini, Alessandra, 1981-. II. Tófoli, Luis Fernando Farah de, 1972-.  
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Inorganic characterization of Ayahuasca and evaluation of its  
psychotherapeutic potential

**Palavras-chave em inglês:**

Ayahuasca - Therapeutic use

Trace elements

Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry

ICP OES

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Mestra em Química na área de Química Analítica

**Banca examinadora:**

Alessandra Sussulini [Orientador]

Solange Cadore

Heloisa França Maltez

**Data de defesa:** 12-06-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Química

## **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Alessandra Sussulini (Orientadora)

Profa. Dra. Heloisa França Maltez (CCNH-UFABC/Santo André)

Profa. Dra. Solange Cadore (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da  
Dissertação de Mestrado defendida pelo(a) aluno(a)  
**IVANILCE CRISTINA GUIMARÃES**, aprovada pela  
Comissão Julgadora em 12 de junho de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais  
Vicentina e Patrocínio (*in memoriam*)  
por me ensinarem que as conquistas  
só têm o devido valor quando advêm  
do nosso próprio esforço.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao meu esposo Rodolfo Maris, pela dedicação, compreensão e, acima de tudo, paciência em todo este tempo.

À minha mãe, por acreditar em mim mesmo quando faltava confiança a mim mesma e ao restante da minha família que, mesmo muitas vezes a contragosto, compreenderam minha ausência constante desde o início desse caminho (e minhas reclamações constantes também).

À profa. Alessandra Sussulini, pela orientação e confiança, além de permitir flexibilidade para que eu pudesse desenvolvê-lo concomitante às minhas atividades profissionais.

Ao prof. Marco Aurélio Zezzi Arruda, por manter toda a estrutura do seu laboratório à disposição para a realização deste trabalho, sem a qual não teria sido possível.

Ao prof. Luís Fernando F. Tófoli, pela obtenção das amostras de Ayahuasca junto à União do Vegetal e aos membros desta instituição, que depositaram confiança no nosso trabalho e forneceram as amostras.

À Rita, que a partir de trabalho paralelo com a Ayahuasca, forneceu dados relevantes para esta dissertação.

Aos amigos do Grupo de Espectroscopia, Preparo de Amostras e Mecanização do Instituto de Química da Unicamp, especialmente a Katherine e Gustavo, pelos diversos conhecimentos compartilhados ao longo do desenvolvimento deste trabalho, além da amizade. À Bruna por proporcionar ambiente alegre e agradável de trabalho, amizade e consolo.

Ao amigo Vítor por compartilhar longas horas de disciplinas e pelo auxílio em cada uma delas, além da amizade e companheirismo.

A todos os funcionários do Instituto de Química da Unicamp, pela colaboração e esforço diário, que ajudam a manter a excelência da instituição e especialmente a Walkyria, que tornou a rotina diária muito mais agradável.

A todos os amigos que, perto ou longe, tornam minha vida mais leve.

*“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original”.*

Oliver Wendell Holmes

## RESUMO

O objetivo deste trabalho consistiu na caracterização inorgânica de 19 amostras da bebida Ayahuasca prontas para consumo, provenientes das regiões Norte e Sudeste do Brasil, bem como na avaliação do seu potencial psicoterapêutico para tratamento de depressão. Para tanto, as amostras da bebida passaram por decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas e as concentrações de Li, Al, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, As, Cd, Ba, Hg, Tl e Pb foram determinadas por ICP-MS, enquanto que as de Ca, Mg, K, P, Sr e Rb foram determinadas por ICP OES. A exatidão dos métodos foi avaliada mediante ensaios de adição e recuperação dos analitos, sendo que foram encontradas recuperações entre 80 e 118 %, indicando exatidão satisfatória. Os valores de LOD e LOQ foram menores do que  $1 \text{ mg L}^{-1}$  para os elementos determinados por ICP OES e menores do que  $3,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  para os elementos determinados por ICP-MS. Os métodos se mostraram adequados para estas determinações. Com relação ao conteúdo total elementar, algumas amostras apresentaram teores de Mg e Mn acima do recomendado por órgãos de controle em termos de ingestão diária. No entanto, considerando que a bebida é consumida a cada 15 dias, não haveria excesso na sua ingestão. Além disso, não foram encontrados níveis de metais pesados potencialmente tóxicos acima do permitido para fitoterápicos. Portanto, com relação ao conteúdo total dos elementos estudados, a bebida Ayahuasca se apresenta com níveis seguros de administração. Com relação ao potencial psicoterapêutico da bebida, os metais Co, Fe, Li, Mg e Zn podem apresentar efeitos sinérgicos com os principais ativos orgânicos (*N,N*-dimetiltryptamina, harmina, harmalina e tetra-hidroharmina), contribuindo para um aumento na sua atividade psicoativa, enquanto que Al, Ca e Pb podem apresentar efeito antagônico. Com relação ao Mn, tanto pode apresentar efeito sinérgico como antagônico, dependendo da quantidade presente na bebida.

## ABSTRACT

The objective of this work consisted in the inorganic characterization of Ayahuasca samples ready for consumption, produced in North and Southwest regions of Brazil, as well as the evaluation of its psychotherapeutic potential for depression treatment. Therefore, the samples of the beverage underwent microwave radiation-assisted acid decomposition and the concentrations of Li, Al, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, As, Cd, Ba, Hg, Ti, and Pb were determined by ICP-MS; while Ca, Mg, K, P, Sr, and Rb were determined by ICP OES. The accuracy of the methods was evaluated by addition and recovery of the analytes, and recoveries between 80 and 118 % were determined, thus indicating satisfactory accuracy. LOD and LOQ values were lower than  $1 \text{ mg L}^{-1}$  for the elements determined by ICP OES and lower than  $3.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  for the elements determined by ICP-MS. The methods proved to be suitable to these determinations. Concerning the total elementary content, some samples presented higher Mg and Mn concentrations than the recommended by daily intake control organs. Nevertheless, considering that the beverage is consumed each 15 days, these values would not be considered excessive in its intake. Besides, there were not found potentially toxic heavy metals levels higher than the permitted to phytotherapies. Consequently, concerning to the total content of the studied elements, Ayahuasca presents safe levels of administration. Related to its psychotherapeutic potential, the metals Co, Fe, Li, Mg, and Zn may present synergic effects with the main organic actives (*N,N*-dimethyltryptamine, harmine, harmaline, and tetrahydroharmine), contributing to an increase of its psychoactive activity, as well as Al, Ca, and Pb may present antagonist effect. Regarding to Mn, it may present whether synergic or antagonist effect, depending on the amount present in the beverage.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química dos principais alcaloides encontrados em <i>Psychotria viridis</i> : (a) DMT e <i>Banisteriopsis caapi</i> : (b) HML, (c) HME e (d) THH.....	19
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da sinapse e etapas da transmissão química [11] .....	21
<b>Figura 3.</b> Estruturas químicas de (a) <i>N,N</i> -Dimetiltriptamina e (b) 5-Hidroxitriptamina, comumente conhecida como serotonina .....	24
<b>Figura 4.</b> Distribuição média dos scores das três escalas de medição de sintomas depressivos: HAM-D, MADRS e YMRS [9] .....	25
<b>Figura 5.</b> Fonte de plasma acoplado indutivamente [28] .....	29
<b>Figura 6.</b> Esquema de um ICP-MS (Adaptado de [29]) .....	31
<b>Figura 7.</b> Analisador de massas quadrupolo [28] .....	31
<b>Figura 8.</b> Otimização dos parâmetros instrumentais do ICP OES: a) vazão do gás nebulizador e b) potência da fonte de radiofrequência para a determinação de Ca, Mg, K e P; c) vazão do gás nebulizador e d) potência da fonte de radiofrequência para a determinação de Sr e Rb .....	44
<b>Figura 9.</b> Otimização dos parâmetros instrumentais ICP OES: a) visão axial e radial para a determinação de Ca, Mg, K e Rb e b) determinação de Sr e Rb .....	45
<b>Figura 10.</b> Efeito do pré-tratamento dos dados sobre as ordens de grandeza das variáveis: normalização pela mediana da amostra, transformação em log e autoescalamento .....	57
<b>Figura 11.</b> Comparação por <i>heatmap</i> da abundância dos elementos das amostras provenientes da região Norte (vermelho) e Sudeste (verde).....	58
<b>Figura 12.</b> Gráfico de <i>scores</i> para bebidas Ayahuasca preparadas com <i>P. viridis</i> e <i>B. caapi</i> provenientes das regiões Norte (vermelho) e Sudeste (verde).....	59
<b>Figura 13.</b> Gráfico de <i>loadings</i> para bebidas Ayahuasca preparadas com <i>P. viridis</i> e <i>B. caapi</i> provenientes das regiões Norte e Sudeste.....	59
<b>Figura 14.</b> Gráfico de <i>scores</i> de análise PLS-DA para bebidas Ayahuasca preparadas com <i>P. viridis</i> e <i>B. caapi</i> das regiões Norte (vermelho) e Sudeste (verde).....	61
<b>Figura 15.</b> Características importantes identificadas na análise PLS-DA para bebidas Ayahuasca preparadas com <i>P. viridis</i> e <i>B. caapi</i> provenientes das regiões Norte e Sudeste .....	61

**Figura 16.** Validação cruzada para modelo PLS-DA de bebidas Ayahuasca preparadas com *P. viridis* e *B. caapi* provenientes das regiões Norte e Sudeste .....63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Origem da <i>Banisteriopsis caapi</i> e <i>Psychotria viridis</i> nas amostras de Ayahuasca selecionadas para o estudo.....	36
<b>Tabela 2.</b> Condições operacionais otimizadas do instrumento de ICP OES.....	37
<b>Tabela 3.</b> Condições operacionais do instrumento de ICP-MS nas análises quantitativas .....	38
<b>Tabela 4.</b> Experimentos de radiofrequência e vazão do gás nebulizador.....	39
<b>Tabela 5.</b> Fortificação da amostra em três níveis de concentração para determinação da exatidão em ICP OES (itálico) e ICP-MS .....	41
<b>Tabela 6.</b> Elementos, abundância natural e principais interferentes .....	46
<b>Tabela 7.</b> Condições de operação otimizadas para cela de reação e colisão .....	46
<b>Tabela 8.</b> Resultados da determinação em NIST SRM 1640a fortificado com interferentes ( $\bar{X} \pm s$ , $n = 3$ ) .....	47
<b>Tabela 9.</b> Coeficientes de correlação obtidos para a determinação dos elementos por ICP OES (itálico) e ICP-MS .....	48
<b>Tabela 10.</b> LD e LQ obtidos para a determinação dos elementos por ICP OES (itálico) e ICP-MS .....	49
<b>Tabela 11.</b> Porcentagens de recuperação obtidas para a determinação dos elementos por ICP OES (itálico) e ICP-MS ( $\bar{X} \pm s$ , $n = 3$ ).....	50
<b>Tabela 12.</b> Concentrações totais dos elementos determinados por ICP OES em 19 amostras de Ayahuasca analisadas ( $\bar{X} \pm s$ , $n = 3$ ) .....	51
<b>Tabela 13.</b> Concentrações totais dos elementos determinados por ICP-MS em 19 amostras de Ayahuasca analisadas ( $\bar{X} \pm s$ , $n = 3$ ) .....	52
<b>Tabela 14.</b> Valores de ingestão diária recomendada de macroelementos e doses máximas ao se consumir um volume de 200 mL de Ayahuasca .....	53
<b>Tabela 15.</b> Valores de ingestão diária recomendada de microelementos e doses máximas ao se consumir um volume de 200 mL de Ayahuasca .....	54
<b>Tabela 16.</b> Concentração do alcaloide psicoativo DMT e alcaloides beta-carbônicos THH, HME e HML ( $\bar{X} \pm s$ , $n = 3$ ) .....	65
<b>Tabela 17.</b> Valores mínimos e máximos de ingestão dos ativos orgânicos, estimando consumo de um volume de 200 mL de Ayahuasca .....	66

<b>Tabela 18.</b> Resumo das interações possíveis entre Ayahuasca e os elementos inorgânicos .....	74
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AAS:** Espectrometria de absorção atômica (do inglês, *Atomic Absorption Spectrometry*)

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ATP:** Adenosina trifosfato

**CIS-R:** *Clinical Interview Schedule – revised edition*

**DMT:** *N,N*-dimetiltryptamina

**GABA:** Ácido gama-aminobutírico (do inglês, *Gamma-AminoButyric Acid*)

**HAM-D:** do inglês *Hamilton Rating Scale for Depression*

**HME:** Harmina

**HML:** Harmalina

**ICP OES:** espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)

**ICP-MS:** espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (do inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

**LOD:** limite de detecção (do inglês, *limit of detection*)

**LOQ:** limite de quantificação (do inglês, *limit of quantitation*)

***m/z*:** razão massa-carga

**MADRS:** do inglês *Montgomery-Asberg Depression Rating Scale*

**MAO:** Monoamina oxidase

**MAOIs:** Inibidores da MAO tipo A (do inglês, *MAO type-A inhibitors*)

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PCA:** Análise de Componentes Principais (do inglês, *Principal Component Analysis*)

**PLS-DA:** Análise Discriminante por Projeção a Estruturas Latentes (do inglês, *Projection to Latent Structures Discriminant Analysis*)

**R:** Coeficiente de correlação linear

**RF:** Radiofrequência (do inglês, *Radiofrequency*)

**SSRIs:** Inibidores seletivos da reuptake da serotonina (do inglês, *specific serotonin reuptake inhibitors*)

**TCAs:** Antidepressivos tricíclicos (do inglês, *tricyclic antidepressants*)

**THH:** Tetraidro-harina

**UDV:** União do Vegetal

**UHPLC-MS/MS:** Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês, *Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer*)

**VIP:** Importância da variável na projeção (do inglês, *Variable Importance in Projection*)

**YMRS:** do inglês *Young Mania Rating Scale*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1. A Ayahuasca: Definição, Principais Constituintes Químicos e Ação Farmacológica</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2. A Ayahuasca e a Depressão</b> .....	<b>20</b>
1.2.1. Mecanismo da depressão .....	20
1.2.2. A Ayahuasca no tratamento da depressão .....	22
<b>1.3. Importância da determinação elementar em potenciais fitoterápicos</b> .....	<b>26</b>
<b>1.4. Métodos para determinação elementar</b> .....	<b>28</b>
1.4.1. ICP OES .....	30
1.4.2. ICP-MS .....	30
1.5. Análise Multivariada .....	32
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>2.1. Objetivos Gerais</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	<b>34</b>
<b>3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1. Preparo de soluções e limpeza de materiais</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2. Amostras</b> .....	<b>35</b>
<b>3.3. Preparo das amostras</b> .....	<b>36</b>
<b>3.4. Instrumentação</b> .....	<b>37</b>
<b>3.5. Avaliação da etapa de preparo de amostras e seleção dos analitos</b> .....	<b>38</b>
<b>3.6. Otimização dos parâmetros instrumentais</b> .....	<b>38</b>
<b>3.7. Avaliação de figuras de mérito</b> .....	<b>40</b>
<b>3.8. Tratamento estatístico e quimiométrico dos dados</b> .....	<b>41</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1. Avaliação da etapa de preparo de amostras e seleção dos analitos</b> .....	<b>42</b>
<b>4.2. Otimização dos parâmetros do instrumento de ICP OES</b> .....	<b>43</b>
<b>4.3. Otimização dos parâmetros do ICP-MS</b> .....	<b>45</b>
<b>4.4. Avaliação de figuras de mérito</b> .....	<b>47</b>
4.4.1. Linearidade .....	48
4.4.2. Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	48
4.4.3. Exatidão .....	49
<b>4.5. Determinação do conteúdo total</b> .....	<b>50</b>

<b>4.6. Análise Multivariada.....</b>	<b>56</b>
<b>4.7. Potenciais efeitos psicoterapêuticos da Ayahuasca .....</b>	<b>63</b>
4.7.1. Avaliação das concentrações dos alcaloides .....	64
4.7.2. Avaliação de efeitos sinérgicos e antagônicos entre ativos orgânicos e inorgânicos .....	67
4.7.2.1. Alumínio .....	67
4.7.2.2. Cálcio .....	67
4.7.2.3. Cobalto .....	68
4.7.2.4. Cobre.....	69
4.7.2.5. Ferro.....	69
4.7.2.6. Lítio.....	70
4.7.2.7. Magnésio.....	71
4.7.2.8. Manganês.....	71
4.7.2.9. Metais pesados .....	72
4.7.2.10. Zinco.....	73
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>

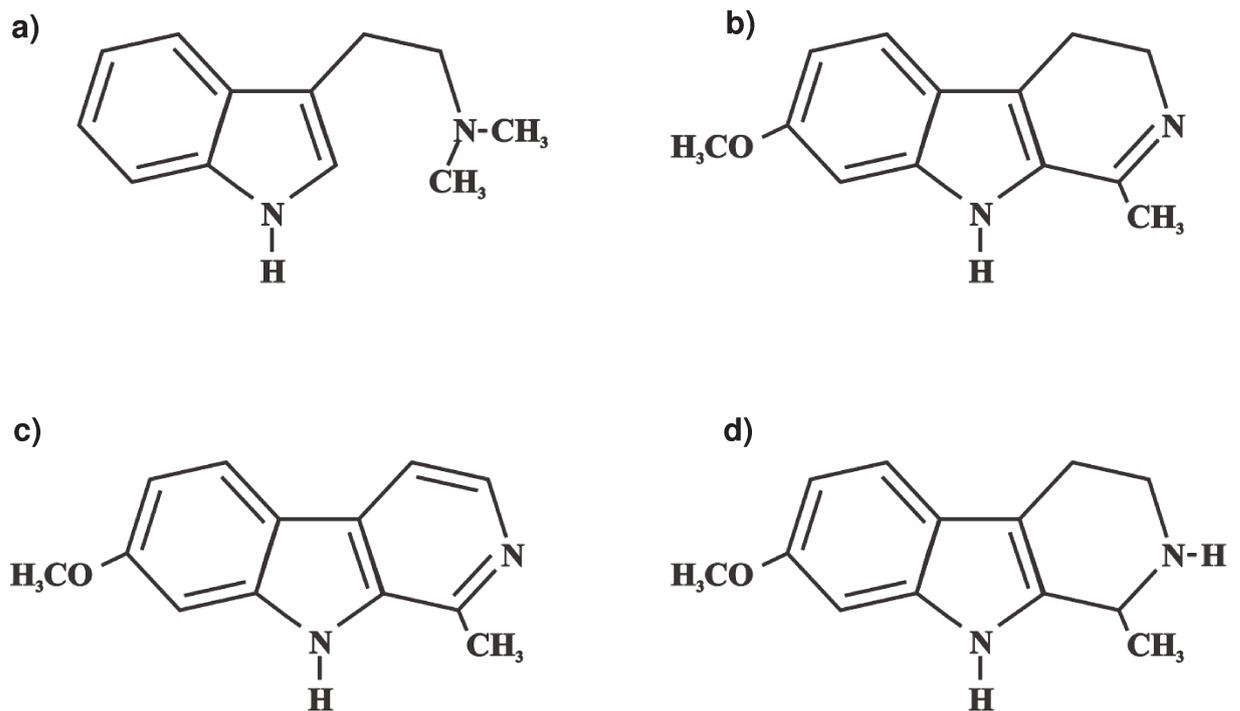
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A Ayahuasca: Definição, Principais Constituintes Químicos e Ação Farmacológica

Ayahuasca é uma palavra derivada da língua Quechua que significa Vinho da Alma (Aya = espírito + Huasca = vinho). Também conhecida pelos nomes de caapi, daime, yajé, natema, vegetal e hoasca, entre outros, é uma bebida psicoativa preparada a partir da decocção prolongada de partes de duas plantas nativas da região amazônica: a casca e os caules do cipó *Banisteriopsis caapi* e as folhas do arbusto *Psychotria viridis* [1-3].

Tradicionalmente utilizada por grupos indígenas do norte da Amazônia em rituais religiosos e para fins medicinais e recreacionais [2,3], ao longo das últimas décadas tem obtido ampla difusão nos grandes centros urbanos em todas as regiões do Brasil e em outras partes do mundo [4]. Esse fenômeno é consequência da expansão de grupos religiosos sincréticos que utilizam a bebida em seus rituais [5], processo que teve início com a fundação da religião Santo Daime e prosseguiu com o estabelecimento da União do Vegetal (UDV) e da Barquinha [3,5].

Os constituintes químicos ativos da Ayahuasca têm sido caracterizados desde a década de 1970 [2]. As cascas e os caules da *Banisteriopsis caapi* contêm três alcaloides principais que compartilham uma estrutura tricíclica comum, motivo pelo qual são comumente referidos como alcaloides  $\beta$ -carbonílicos: harmina (HME), harmalina (HML) e tetraidro-harmina (THH). Já as folhas da *Psychotria viridis* contêm o alcaloide psicoativo da classe das triptaminas, *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) (Figura 1) [5].



**Figura 1.** Estrutura química dos principais alcaloides encontrados em *Psychotria viridis*: (a) DMT e *Banisteriopsis caapi*; (b) HML, (c) HME e (d) THH.

A DMT é um potente alucinógeno que apresenta atividade quando administrada pela via parenteral. Quando administrado oralmente, ela sofre degradação pelas enzimas monoaminas oxidases (MAOs) no fígado e no intestino, perdendo sua atividade [1,5]. As  $\beta$ -carbonilas apresentam uma variedade de propriedades farmacológicas, podendo apresentar propriedade alucinógena e contribuir para a atividade psicotrópica da bebida. No entanto, de papel fundamental na Ayahuasca está o fato de elas serem inibidores seletivos e reversíveis da MAO. Essa enzima degrada naturalmente neurotransmissores e amins exógenas potencialmente perigosas, precisamente como a DMT. Dessa forma, a primeira ação das  $\beta$ -carbonilas é impedir que a DMT seja degradada no trato gastrointestinal, tornando-a oralmente ativa, de modo que alcance seu local de ação no sistema nervoso central intacta [5,6].

A atividade psicotrópica da Ayahuasca depende, portanto, de uma interação sinérgica entre a DMT e os alcaloides  $\beta$ -carbonílicos da mistura. Assim, a Ayahuasca é uma bebida única, na medida em que o princípio ativo (DMT) de uma espécie de planta depende da inibição de enzimas por parte de compostos ( $\beta$ -carbonilas) presentes em outra espécie [5].

Quando administrada oralmente, a Ayahuasca provoca uma série de alterações no estado consciente, com modificações perceptivas nas esferas visual, auditiva e tátil [7], incluindo alucinações, visões, além de emoções intensas e de uma maior reflexão pessoal e maior interação entre pensamentos, memórias e emoções [5].

Considerando as raízes históricas e tradicionais no Brasil, embora a DMT seja uma substância proscrita mundialmente desde a Convenção Internacional para Substâncias Psicotrópicas, ocorrida em Viena em 1971, em 1989 o governo brasileiro retirou a Ayahuasca da lista de substâncias banidas, concedendo permissão para o consumo da bebida no contexto de práticas religiosas [1,5]. Esta legalização foi confirmada em 2004, pela Resolução nº 4 do Conselho Nacional Antidrogas [8].

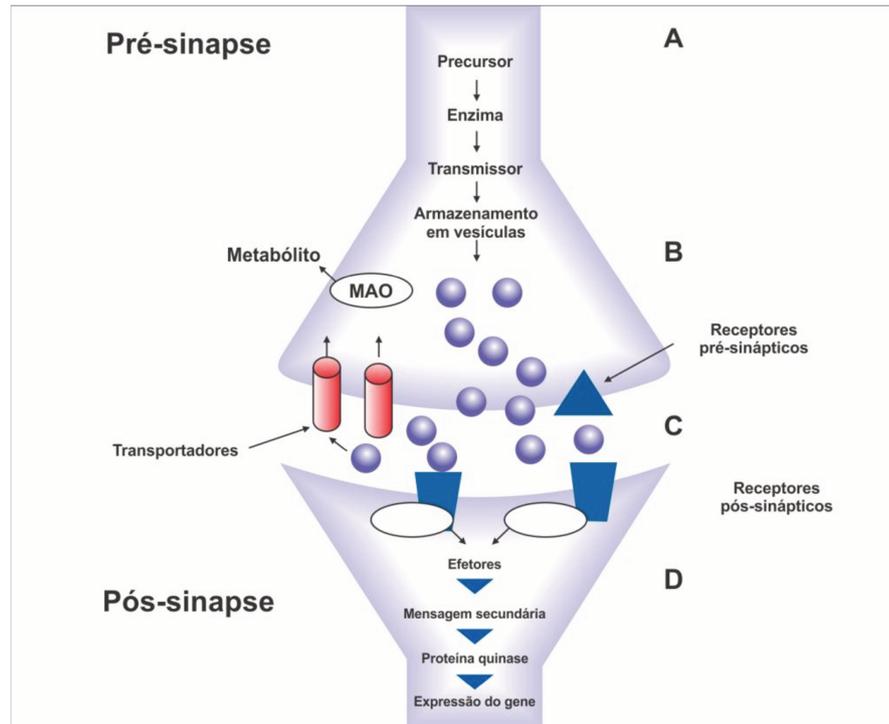
## **1.2. A Ayahuasca e a Depressão**

### **1.2.1. Mecanismo da depressão**

A depressão é uma doença recorrente que está associada a um intenso sofrimento pessoal, alta taxa de mortalidade e alta morbidade [9] e que, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), afeta cerca de 350 milhões de pessoas no mundo [10]. Esse número representa um alto custo para a sociedade, uma vez que a depressão provoca graves dificuldades e perturbações na vida e, se não tratada, pode ser fatal [11].

Os principais sintomas da depressão incluem humor baixo ou deprimido, anedonia e baixa energia ou fadiga. Podem ocorrer também sono e distúrbios psicomotores, sentimento de culpa, baixa autoestima, tendências suicidas, bem como distúrbios gastrointestinais [11].

Os eventos pré e pós-sinápticos são a base do sistema nervoso central e seu entendimento em muito contribui para explicar a depressão [11]. A Figura 2 mostra a representação esquemática de uma sinapse para neurotransmissores clássicos.



**Figura 2.** Representação esquemática da sinapse e etapas da transmissão química (Adaptado de [11]).

O passo inicial é o transporte dos aminoácidos precursores do sangue para o cérebro (A), onde serão convertidos via reação enzimática em neurotransmissores (monoaminas), que serão armazenados em vesículas sinápticas (B) até sua liberação para a fenda sináptica (C), onde se ligam aos seus receptores pré-sinápticos para regular a síntese e liberação, ou agem sobre a célula receptora através dos seus receptores pós-sinápticos, para induzir os eventos da cascata de transdução de sinal (D) [11]. Em todo esse processo, podem também ser degradados pela enzima MAO.

A hipótese mais aceita atualmente para explicar os sintomas da depressão e transtornos de comportamento diz respeito a um déficit funcional nas monoaminas (principalmente serotonina, mas também noradrenalina, dopamina, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA, do inglês *Gamma-AminoButyric Acid*) nas regiões límbicas do cérebro [9,12] o que pode ser causado por uma deficiência destes ou até mesmo na ineficiência dos seus transportadores, cuja função é administrar a recaptação do respectivo neurotransmissor na sinapse. Esta hipótese é a base para o desenvolvimento dos antidepressivos disponíveis comercialmente [13,14].

Uma vez que a liberação dos neurotransmissores é dependente da taxa de disparo dos neurônios, é razoável supor que condições ou drogas que alteram essa taxa possam modificar a liberação desse neurotransmissor [11]. Desse modo, existem três principais classes de antidepressivos, dependendo do mecanismo de ação empregado nesse sentido: os inibidores da MAO tipo A (MAOIs, do inglês *MAO type-A inhibitors*), os antidepressivos tricíclicos (TCAs, do inglês *tricyclic antidepressants*) e os inibidores seletivos da reuptake da serotonina (SSRIs, do inglês *specific serotonina reuptake inhibitors*) [15]. Cada um desses tratamentos tem limitações que podem levar à baixa efetividade, latência no início da ação terapêutica e efeitos colaterais, de modo que são necessários novos métodos com potencial para minimizar essas limitações [9].

### 1.2.2. A Ayahuasca no tratamento da depressão

Desde a inserção da Ayahuasca nos grandes centros urbanos, as alterações cognitivas que o seu consumo provoca nos indivíduos vem despertando a atenção da comunidade científica, incluindo botânicos, antropólogos, bioquímicos, médicos psiquiatras e neuropsiquiatras [5]. Este interesse se deve, em grande parte, aos diversos relatos sobre os seus potenciais psicoterapêuticos, principalmente a partir de experiências vividas por membros das igrejas sincréticas e, ocasionalmente, também por pesquisadores que se propuseram a estudar a bebida no seu contexto religioso [16].

No início da década de 1990, estes relatos, aliados às alterações cognitivas já mencionadas, fomentou uma preocupação sobre possíveis efeitos provocados pelo uso a longo prazo, de tal modo que um estudo científico formal se fez necessário [16]. Assim, a partir da união dos esforços de pesquisadores biomédicos dos Estados Unidos, Finlândia e Brasil, juntamente com o apoio de membros da UDV, que vislumbraram a chance de uma legalização incontestável apoiada em argumentos com base científica, surgiu em 1993 um projeto denominado *Hoasca Project* [1,5,16].

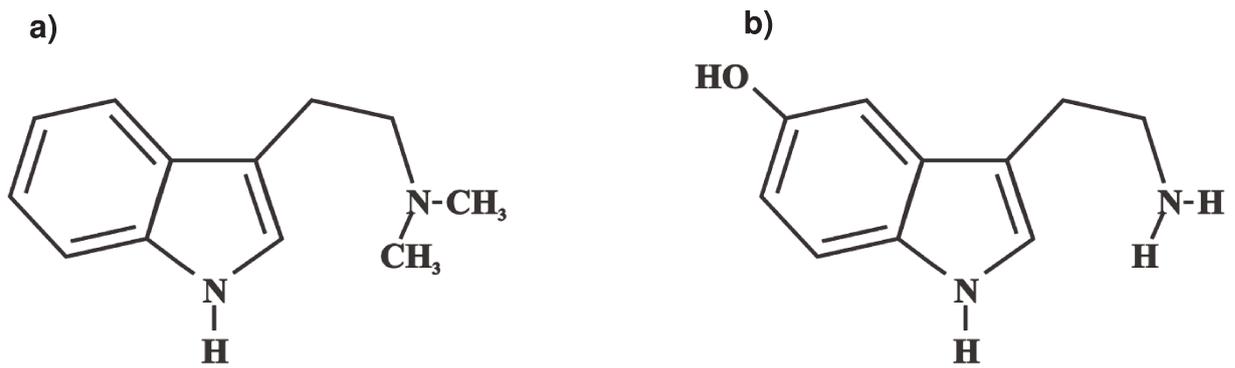
O *Hoasca Project* teve o objetivo de avaliar os efeitos bioquímicos e psicológicos da Ayahuasca em um grupo de quinze indivíduos com uma história de consumo de mais de 10 anos, comparados com um grupo controle, formado por quinze não-usuários. Para tanto, foram empregados diversos parâmetros para

avaliar níveis passados e atuais de função psicológica nos dois grupos, que incluíram entrevistas de diagnóstico psiquiátrico estruturadas, testes de personalidade e testes neuropsicológicos, além de um questionário sobre história de vida [1,5,16].

Como resultado destas avaliações, Grob *et al.* (1996) relataram que não foram encontradas evidências de toxicidade aguda ou de longo prazo, ou qualquer outro efeito adverso à saúde. Além disso, também não foram encontrados indícios de deficiência mental ou cognitiva nos usuários. Por outro lado, foi demonstrado que os usuários da Ayahuasca apresentaram maior função cognitiva, maior facilidade na comunicação verbal, raciocínio matemático e bem-estar emocional quando comparados ao grupo controle [16].

Juntamente com estas mudanças psicológicas e comportamentais positivas, uma descoberta inesperada surgiu das entrevistas em que os voluntários foram convidados a responder sobre sua história de vida presente e passada. Entre os participantes do grupo controle, na época do estudo, dois sofriam de alcoolismo e um de hipocondria e, no histórico de vida passado, um deles tinha apresentado transtorno psiquiátrico. Já entre os usuários da Ayahuasca, na época do estudo, nenhum sofria de transtorno psiquiátrico ou dependência, enquanto que, no passado, dois já tinham sofrido de depressão, três de ansiedade, onze de alcoolismo, sendo que, destes onze, oito tinham sido ainda viciados em tabaco e quatro em drogas [1,5,16]. Essas observações levaram a hipótese de que a Ayahuasca não somente não apresentava riscos ao ser consumida em longo prazo, como também apresentava efeitos serotoninérgicos, fornecendo evidência preliminar de que poderia ter ação antidepressiva.

Aparentemente, esta propriedade decorre da semelhança estrutural da DMT com a serotonina (Figura 3), o que torna possível a sua ligação aos seus receptores.



**Figura 3.** Estruturas químicas de (a) *N,N*-Dimetiltryptamina e (b) 5-Hidroxitriptamina, comumente conhecida como serotonina.

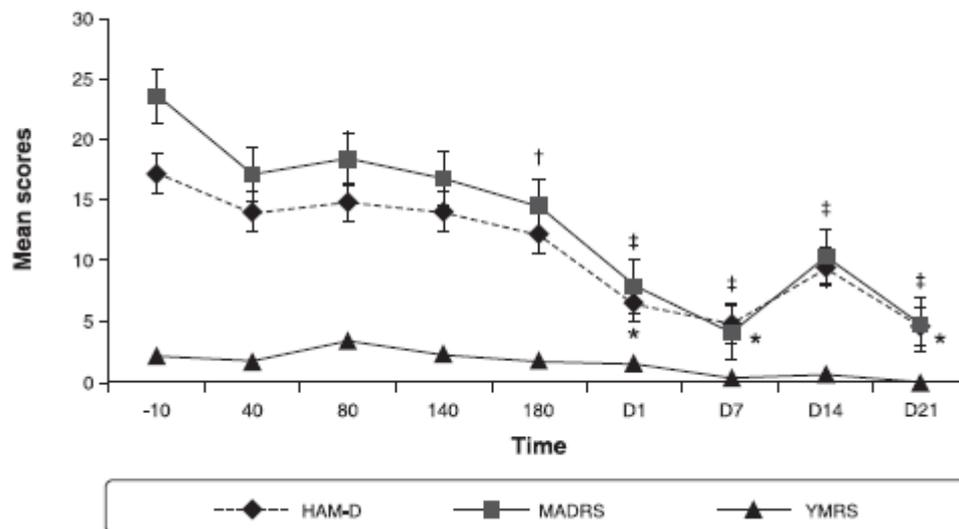
Dessa forma, o uso regular da Ayahuasca resultaria em uma modulação dos índices desta monoamina no cérebro, ocorrendo um aumento dos níveis dos seus transportadores, que são proteínas de membrana que atuam gerenciando a receptação deste neurotransmissor na sinapse. Este é precisamente o local de ação dos SSRIs. Uma vez que estes transportadores estão envolvidos nos sintomas da depressão e transtornos de humor, têm-se sugerido que uma elevação nos seus níveis nos usuários de longo prazo da Ayahuasca poderia estar relacionada às mudanças positivas no comportamento [5].

As  $\beta$ -carbolinas também poderiam contribuir com os efeitos psicoativos da Ayahuasca, bloqueando a ação da MAO no cérebro e inibindo fracamente a recaptção de serotonina, fenômenos que aumentariam os níveis do neurotransmissor na fenda sináptica. No entanto, as concentrações destas em uma dose de Ayahuasca estão bem abaixo da concentração necessária para que tenham atividade alucinógena própria. Por outro lado, estas concentrações estão acima do limiar para atividade como inibidora da MAO [4].

Após os resultados encontrados no *Hoasca Project*, Palladino (2009) investigou os impactos da Ayahuasca em seis indivíduos que sofriam de depressão crônica e que apresentavam resistência aos tratamentos convencionais, sendo que quatro deles nunca haviam experimentado a bebida antes. Para tanto, eles foram convidados a descrever sua experiência de depressão antes e após a ingestão de Ayahuasca. Todos os participantes sentiram melhoras nos sintomas por até 10 dias após a ingestão, o que representa uma evidência de sucesso no tratamento, mesmo considerando este pequeno grupo [17].

Osório *et al.* (2015) avaliaram o efeito da administração de uma dose única de Ayahuasca fornecida por uma comunidade do Santo Daime também em seis voluntários com histórico recorrente de depressão. Os participantes foram acompanhados por um psiquiatra com experiência clínica na aplicação de escalas para avaliação de sintomas depressivos. Foram medidas três escalas: HAM-D (do inglês *Hamilton Rating Scale for Depression*), MADRS, (do inglês *Montgomery-Asberg Depression Rating Scale*) e YMRS (do inglês *Young Mania Rating Scale*), a partir das quais os participantes foram classificados como portadores de um nível moderado de depressão [9].

As escalas foram acompanhadas desde 10 minutos antes da administração até 21 dias após (Figura 4), sendo que os resultados mostraram reduções de até 82% nas pontuações depressivas entre linha de base nos dias 1, 7 e 21 após a administração, indicando que a Ayahuasca teve ação antidepressiva em pacientes com transtorno depressivo [9].



**Figura 4.** Distribuição média dos scores das três escalas de medição de sintomas depressivos: HAM-D, MADRS e YMRS [9].

Resultados semelhantes foram obtidos por Barbosa *et al.* (2009) em um grupo maior de participantes, a partir da avaliação da morbidade psiquiátrica em novos usuários de Ayahuasca através da escala de depressão CIS-R (do inglês *Clinical Interview Schedule – revised edition*). Foram avaliadas a intensidade de sintomas psiquiátricos (ansiedade, depressão, ideias depressivas, irritação) pouco antes e uma semana após a primeira experiência religiosa de Ayahuasca no Santo

Daime (n = 19) ou na UDV (n = 9). Após a ingestão da bebida, as pontuações na escala melhoraram significativamente, sendo que foram observados diminuição dos sintomas, além de mudanças comportamentais, como aumento da autoconfiança e positividade, vivacidade e alegria [18].

Estes estudos demonstraram que, do ponto de vista psicológico, neuropsicológico e psiquiátrico, o uso da bebida não provocou alterações patológicas nos indivíduos. Além disso, ainda que os efeitos do forte apoio emocional propiciado pela participação em um grupo religioso não possam ser desprezados, estes resultados indicam que o uso frequente da Ayahuasca tem relação positiva sobre o estado psiquiátrico dos indivíduos [16], resultando em benefícios para o tratamento da depressão, principalmente para casos em que os tratamentos convencionais não surtem efeito.

Deste modo, são necessários mais estudos a fim de comprovar seu mecanismo de ação, bem como a dosagem adequada e segurança na administração. Embora a Ayahuasca seja legalizada somente no contexto religioso, essas informações podem ser úteis para o seu consumo com finalidade terapêutica ou mesmo para o desenvolvimento de uma nova forma de medicamento à base das plantas.

De acordo com a definição da OMS, medicamentos à base de plantas, ou seja, fitoterápicos, são aqueles que contêm partes de uma ou mais plantas como ingredientes ativos ou, ainda, materiais vegetais em estado bruto ou processado, acrescido de excipientes, que podem ser solventes, diluentes ou conservantes [19]. Considerando esta definição, a bebida Ayahuasca, se vier a ser utilizada com finalidade terapêutica, poderá ser considerada como fitoterápico.

### **1.3. Importância da determinação elementar em potenciais fitoterápicos**

O desenvolvimento de um fitoterápico para tratamento da depressão através das espécies que compõem a Ayahuasca vem de encontro a uma tendência atual de menor dependência medicamentosa, com crescimento da busca por produtos de origem natural, com efeitos colaterais reduzidos. No entanto, embora muitas vezes os medicamentos à base de plantas sejam promovidos como naturais e, portanto, inofensivos, eles não são livres de efeitos adversos. O conhecimento, portanto, dos benefícios, da forma correta de uso e dos malefícios que as plantas

medicinais podem causar é de grande importância para o uso seguro dos fitoterápicos [20].

A despeito dessa importância, a maior parte das pesquisas para o desenvolvimento de fitoterápicos têm foco na caracterização do princípio ativo da planta para comprovação científica das propriedades terapêuticas [21], e essa tendência não é diferente no caso da Ayahuasca, de tal forma que não há, atualmente, nenhum trabalho de caracterização inorgânica da bebida.

Até onde se sabe, todos estes potenciais benefícios da Ayahuasca são relacionados aos seus compostos orgânicos DMT, HME, HML e THH, que foram os únicos identificados até o momento. No entanto, no que tange ao desenvolvimento e consumo de fármacos derivados de plantas medicinais, é essencial o conhecimento de todos os compostos presentes, incluindo os elementos inorgânicos. Isso porque estes tanto podem desempenhar papel na formação de muitos constituintes químicos ativos e, nesse caso, serem responsáveis pelas propriedades medicinais das plantas, como também pelo fato de muitos deles (zinco, ferro, cobre, cromo e cobalto) serem nutrientes para os humanos, tornando-se tóxicos em altas concentrações. Por último, mas não menos importante, ainda há o fato de que alguns deles (chumbo, cádmio, mercúrio, arsênio) podem apresentar riscos à saúde devido à elevada toxicidade [22,23].

A presença de grande variedade e quantidade de elementos em bebidas provenientes de plantas decorre do meio biogeoquímico natural ao qual estas estão sujeitas, podendo variar em decorrência do tipo de solo e condições climáticas, além da presença de agentes de proteção das plantas e fertilizantes [24]. Nota-se, portanto, que as plantas medicinais constituem uma fonte importante de transferência de macro e microelementos para a o homem.

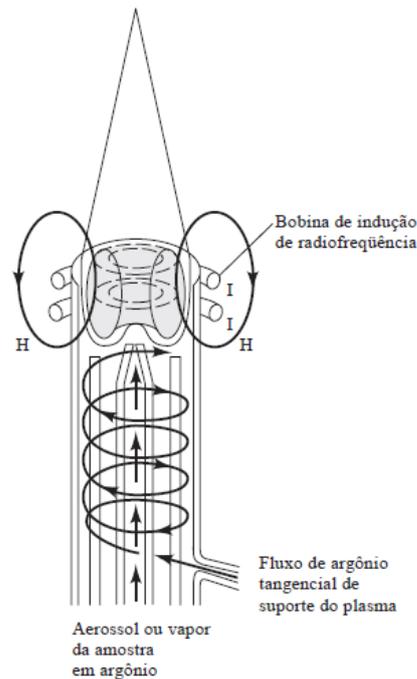
Em vista do exposto, o controle dessas concentrações nos fitoterápicos é de fundamental importância. Uma vez que a bebida Ayahuasca pode vir a ser empregada como fitoterápico para o tratamento alternativo de depressão, é necessário que o seu conteúdo elementar seja conhecido. Nas seções seguintes, serão apresentados os métodos para tal fim empregados neste trabalho.

#### 1.4. Métodos para determinação elementar

A OMS recomenda a utilização da técnica de espectrometria de absorção atômica (AAS, do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*) para a determinação de elementos tóxicos [19]. No entanto, a grande maioria dos estudos de determinação elementar em fitoterápicos e bebidas derivadas de ervas emprega técnicas baseadas em atomizadores de plasma, particularmente espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) [23,24] e espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, *ICP Optical Emission Spectrometry*) [20,24,25], que oferecem a vantagem de serem multielementares e com alta sensibilidade.

Ambas as técnicas empregam plasmas de argônio. Plasmas são gases parcialmente ionizados, contendo uma grande concentração de íons e elétrons livres, que podem estar presentes tanto no seu estado fundamental como no seu estado excitado, de modo que a radiação pode ser absorvida ou emitida. No plasma de argônio, os íons argônio, espécies condutoras principais, são capazes de absorver potência suficiente de uma fonte externa, mantendo o plasma a uma temperatura que pode chegar a 10000 K [26].

No caso do ICP OES e ICP-MS, a fonte de potência empregada é um gerador de radiofrequência, chamado de plasma acoplado indutivamente. Neste tipo de plasma, a energia de um gerador de radiofrequência é transferida para um fluxo do gás argônio fluindo em um sistema de tubos de quartzo com o auxílio de uma bobina de indução, gerando campos magnéticos oscilantes orientados axialmente dentro da bobina. A ionização do argônio se inicia por uma centelha produzida por uma bobina de Tesla. Os íons e elétrons formados interagem então com os campos magnéticos e são acelerados, colidindo com outros átomos de argônio e gerando ionização adicional, capaz de manter o plasma. Este é sustentado na extremidade aberta de um conjunto de três tubos concêntricos de quartzo, que se encontram envoltos pela bobina de indução conectada ao gerador de radiofrequência, como mostrado na Figura 5 [26,27].



**Figura 5.** Fonte de plasma acoplado indutivamente [28].

O plasma formado dessa maneira atinge temperaturas tão elevadas que é necessário um isolamento térmico do cilindro de quartzo. Este isolamento é conseguido utilizando um fluxo de argônio que é introduzido tangencialmente às paredes do tubo a uma vazão entre 10 a 15 L min<sup>-1</sup>. Este fluxo resfria as paredes internas do tubo de quartzo e centraliza o plasma radialmente no tubo. Também serve como principal fluxo de sustentação. Outro fluxo de argônio de aproximadamente 1 a 1,5 L min<sup>-1</sup> transporta a amostra para o plasma. O fluxo total de argônio necessário é, portanto, de 11 a 17 L min<sup>-1</sup> [26].

A amostra deve ser transportada para o plasma na forma de uma nuvem de gotículas denominada aerossol, o que é conseguido através de um nebulizador. Após, a alta temperatura do plasma evapora o solvente (dessolvatação) e, em seguida, ocorre a volatilização das partículas produzindo as espécies atômicas e iônicas, que por fim podem passar pelas etapas de excitação e emissão [26,28].

O nebulizador funciona com alta pressão, proporcionando uma alta eficiência de nebulização com baixa taxa de reabsorção de amostra, o que é ideal para acoplamento do ICP com espectrometria de emissão ou de massas [26].

#### 1.4.1. ICP OES

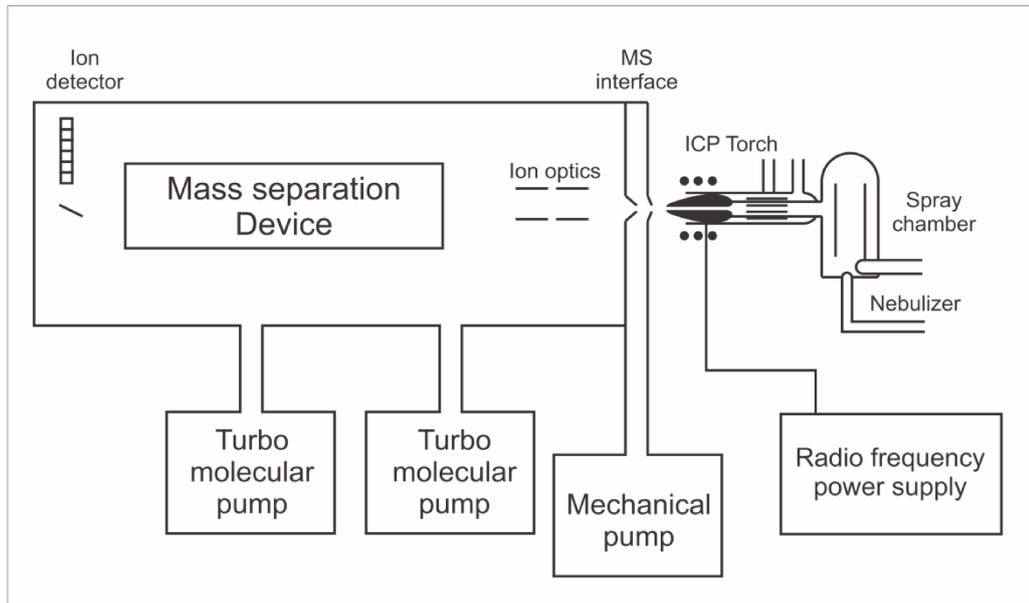
Na técnica de ICP OES, o plasma é utilizado para a geração de fótons de luz pela excitação dos elétrons do estado fundamental para níveis de energia mais altos. Quando os elétrons retornam ao estado fundamental, os fótons com comprimento de onda específico, característicos do elemento de interesse, são emitidos. Essa radiação emitida é separada em seus comprimentos de onda constituintes por meio de um policromador, normalmente com arranjo *echelle*, que são então detectados e utilizados para identificação e quantificação dos elementos presentes na amostra [26,28].

Quando comparada à técnica de AAS, ICP-OES oferece a grande vantagem de ser uma técnica multielementar, permitindo obtenção de baixos limites de detecção para vários elementos simultaneamente, incluindo aqueles que formam óxidos refratários, terras raras ou que tem baixo potencial de ionização, difíceis de serem determinados por AAS [26].

#### 1.4.2. ICP-MS

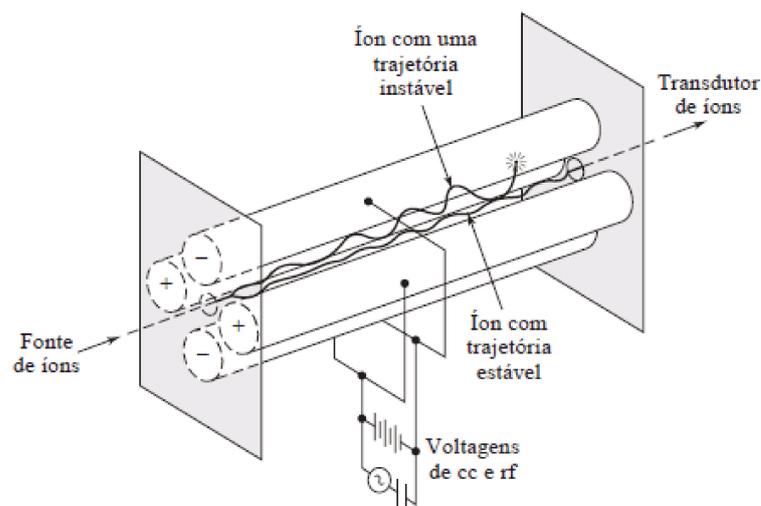
A técnica de ICP-MS se baseia na medida da razão massa/carga ( $m/z$ ) de íons positivamente carregados que são gerados pelo plasma de argônio. Os íons de massas atômicas diferentes são separados por um analisador de massas para produzir um espectro de massas [26, 29].

Devido ao fato de que o ICP opera à pressão atmosférica e o analisador de massas em alto vácuo, é necessária uma interface entre ambos. Uma vez produzidos no plasma, os íons são direcionados para o espectrômetro de massas através dessa região de interface, que consiste em dois cones metálicos com diferentes ângulos, denominados *sampler* e *skimmer*, cada qual com um pequeno orifício que permite a passagem dos íons para uma lente iônica, onde serão guiados para a região de alto vácuo (Figura 6) [26,29].



**Figura 6.** Esquema de um ICP-MS (Adaptado de [29]).

Os analisadores de massas mais comumente empregados são os do tipo quadrupolo, setor magnético e tempo de voo. O analisador de massas quadrupolo consiste em quatro hastes cilíndricas, de modo que as hastes em pares opostos são conectadas a voltagens de corrente contínua e de radiofrequência. Pela seleção da voltagem adequada em cada par de hastes, somente os íons de uma razão  $m/z$  selecionada adquirem uma trajetória estável e passam através do analisador em direção ao detector, enquanto os demais são ejetados do quadrupolo (Figura 7) [29].



**Figura 7.** Analisador de massas quadrupolo [28].

A técnica de ICP-MS tem sido empregada para a determinação simultânea de um grande número de elementos desde o início da sua comercialização, em 1983, em substituição a outras técnicas analíticas de espectrometria atômica. O crescente interesse por esta técnica se deve a sua ampla faixa analítica, detecção multielementar aliada a baixos limites de detecção, ótima exatidão e precisão e seletividade isotópica, além de permitir que, numa única varredura em modo qualitativo, grande parte dos elementos da tabela periódica sejam avaliados [26,29]. No entanto, é uma técnica relativamente cara quando comparada a outras técnicas para determinação elementar, além de requerer pessoal qualificado para a operação e manutenção dos equipamentos, de tal modo que a sua popularidade, embora crescente, ainda não é tão alta quanto a das técnicas de AAS e ICP OES [29].

### **1.5. Análise Multivariada**

A utilização de instrumentação moderna para obtenção de dados químicos resultou no crescimento da quantidade e variedade de dados a partir de um único experimento. Com o intuito de facilitar o tratamento e o entendimento desses dados, desenvolveu-se uma ferramenta que utiliza métodos matemáticos e estatísticos que, quando aplicada à análise de dados químicos, é chamada de Quimiometria [30].

Essa ferramenta permite a avaliação de dados multivariados, onde duas ou mais respostas instrumentais (variáveis) estão relacionadas a cada uma das amostras [31], de modo que muitas variáveis podem ser analisadas simultaneamente.

Modernamente, a Quimiometria pode ser dividida em três grandes áreas: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e calibração multivariada [32,33].

Os métodos de reconhecimento de padrões permitem avaliar tendências em um grande volume de dados, de modo a agrupá-los de acordo com sua similaridade, podendo ser considerados como uma análise exploratória [30-33]. Estes métodos podem ser divididos em supervisionados, onde cada amostra pertence a uma classe conhecida, permitindo a construção de modelos, como a PLS-DA, e não supervisionados, onde não há necessidade de conhecimento prévio

sobre as amostras, que serão agrupadas com base nos dados experimentais, que é o caso do PCA [30].

A PCA consiste em um método para projeção de dados multivariados em um espaço com menor número de dimensões, tornando-os mais facilmente visualizados e interpretados sem, contudo, afetar as relações entre as amostras. Dessa forma, é possível avaliar diferenças e similaridades entre estas, além de detectar as que apresentam comportamento anômalo [30].

Essa análise pode ser realizada a partir do reconhecimento de padrões nos conjuntos de dados, que permitem encontrar um número menor de novas variáveis ainda capazes de descrever toda a informação contida nos dados, em outras palavras, preservando a variância. Esse conjunto de novas variáveis obtidas a partir dos dados originais são as componentes principais (PCs, do inglês *Principal Components*), também chamadas de fatores ou autovetores [30-33].

A primeira componente principal (PC1) pode ser encontrada na direção que descreve a maior variação dos dados, ou seja, a máxima variância, enquanto a segunda (PC2) é traçada na direção ortogonal à PC1. As componentes subsequentes (PC3, PC4, etc.) são ortogonais a essas duas e descrevem a máxima variância restante, de tal modo que, ao final do processo, quase toda a informação contida nos dados originais é descrita [30].

Embora a natureza não supervisionada do PCA forneça um meio para alcançar uma redução imparcial da dimensionalidade, sua aplicação apenas revela estrutura de grupo quando a variação dentro deste é suficientemente inferior à variação entre grupos diferentes. Assim, as formas supervisionadas de análise discriminante, como PLS-DA, onde cada amostra provém de uma classe estabelecida, e essa informação é utilizada durante a análise dos dados e construção dos modelos, também são comumente aplicadas, permitindo uma melhor exposição das separações entre as classes no espaço. A PLS-DA é, portanto, um método supervisionado que emprega técnicas de regressão multivariada para extrair através de combinação linear das variáveis originais a informação que pode prever a associação da classe [30,34].

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

O objetivo deste trabalho consiste em determinar os macro e microelementos em amostras da bebida Ayahuasca prontas para o consumo utilizando técnicas de ICP-MS e ICP OES e avaliar os possíveis efeitos psicoterapêuticos da bebida, bem como níveis seguros na sua administração.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Selecionar dos analitos a serem quantificados por meio de análises qualitativas por ICP-MS;
- Desenvolver método multielementar para determinação dos elementos selecionados utilizando ICP OES e ICP-MS;
- Otimizar as condições dos equipamentos;
- Determinar as figuras de mérito para avaliar os métodos desenvolvidos;
- Quantificar os analitos em diferentes amostras de Ayahuasca;
- Avaliar a toxicidade das amostras com relação à presença e concentração de metais potencialmente tóxicos;
- Avaliar os efeitos psicoterapêuticos dos analitos quando combinados com os ativos orgânicos;
- Aplicar ferramentas quimiométricas no intuito de avaliar as possíveis diferenças entre amostras provenientes de diferentes regiões do Brasil.

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1. Preparo de soluções e limpeza de materiais

As soluções foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico, ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) subdestilado (Merck, Darmstadt, Alemanha) e água desionizada ( $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) obtida a partir de sistema de purificação de água (Millipore, Bedford, EUA). As vidrarias, tubos plásticos e demais materiais utilizados no preparo e armazenamento das amostras foram descontaminados em banho de  $\text{HNO}_3$  10% (v/v) por 24 h e, em seguida, enxaguados com água desionizada.

As soluções para as curvas analíticas foram preparadas em  $\text{HNO}_3$  5 % (v/v) por meio de diluição sucessiva de soluções padrões certificadas de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (Qhemis, Brasil) para Ca, Mg, P, Li, Al, Mn, Fe, Co, Cu, As, Rb, Cd, Ba, Hg, Tl e Pb e  $10000 \text{ mg L}^{-1}$  (Specsol, Brasil) para K e Sr.

As concentrações das curvas analíticas foram:  $0,03 - 1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  para Hg, Tl e Cd;  $0,05 - 1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  para Pb;  $0,05 - 3,0 \mu\text{g L}^{-1}$  para Li;  $0,1 - 1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  para As;  $0,1 - 2,0 \mu\text{g L}^{-1}$  para Co;  $0,3 - 2,0 \mu\text{g L}^{-1}$  para Cu;  $0,1 - 8,0 \mu\text{g L}^{-1}$  para Ba;  $1,0 - 80 \mu\text{g L}^{-1}$  para Fe e Mn;  $5 - 80 \mu\text{g L}^{-1}$  para Al;  $10 - 200 \mu\text{g L}^{-1}$  para Zn,  $20 - 200 \mu\text{g L}^{-1}$  para Sr e Rb,  $0,5 - 5 \text{ mg L}^{-1}$  para Ca, Mg e P;  $5 - 50 \text{ mg L}^{-1}$  para K.

#### 3.2. Amostras

As amostras constituíram-se de preparações de Ayahuasca prontas para consumo, fornecidas por núcleos da instituição União do Vegetal (UDV), preparadas a partir das plantas provenientes de diferentes regiões do país. Foram selecionadas 19 amostras para este estudo (Tabela 1).

O envio das amostras foi acompanhado de um formulário, onde constavam algumas informações como tipo e origem das plantas e local de preparo da bebida. Após recebimento, as amostras foram alíquotadas em microtubos de 2 mL e armazenadas em freezer a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  até a ocasião da análise.

**Tabela 1.** Origem da *Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis* nas amostras de Ayahuasca selecionadas para o estudo

Amostras	Localização Núcleo UDV	Origem <i>B. caapi</i>	Origem <i>P. viridis</i>
1	Arujá/SP	SP	SP
2	Piracicaba/SP	RO	RO
3	Piracicaba/SP	PA	RO
4	Campinas/SP	SP	AC/SP
5	Campinas/SP	SP	SP
6	São Paulo/SP	AC	AC
7	Campinas/SP	SP	SP
8	Jaru/RO	RO	RO
9	Manaus/AM	AM	AM
10	Caldas/MG	SP	SP/MG
11	Jaru/RO	RO	Não informado
12	Araçariguama/SP	SP	SP
13	Rio Branco/AC	AC	AC
14	São Paulo/SP	BA	SP/BA
15	Campinas/SP	SP	SP
16	Campinas/SP	SP	SP
17	Mogi das Cruzes/SP	RO	Não informado
18	São Paulo/SP	Não informado	Não informado
19	São Paulo/SP	MG	SP

### 3.3. Preparo das amostras

Foram avaliados o método de análise direta e decomposição ácida. A análise direta mostrou-se inadequada para estas amostras por deixar resíduos no equipamento. Sendo assim, empregou-se o procedimento de decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas. Para tanto, as amostras foram centrifugadas (5804R, Eppendorf, Westbury, EUA) a 10000 rpm por 10 minutos para eliminação de sólidos em suspensão, que não costumam ser ingeridos pelos membros dos grupos religiosos. Em seguida, 200 µL foram transferidos para frascos de decomposição, juntamente com 2 mL de HNO<sub>3</sub> subdestilado e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio (Merck, Darmstadt, Alemanha). As condições da decomposição no forno micro-ondas (DGT 100 Plus, Provecto, Jundiaí, Brasil) foram: 2 min a 400 W e 5 min a 790 W. Após a decomposição, o volume foi ajustado com água desionizada de modo a atingir 5 % (v/v) de HNO<sub>3</sub> (fator de diluição de 200 x, exceto para Ba e Mn, em que

os fatores de diluição empregados foram de 400 e 800 x, respectivamente). Os brancos analíticos foram preparados de acordo com o mesmo procedimento.

### 3.4. Instrumentação

As determinações de Ca, Mg, K, P, Sr e Rb foram realizadas empregando-se espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, ICP OES (iCAP 6300, Thermo, EUA). Os parâmetros operacionais do equipamento estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Condições operacionais otimizadas do instrumento de ICP OES

<b>Parâmetros e condições operacionais- ICP OES</b>	
Marca e modelo	Thermo, iCAP 6300
Câmara de nebulização	Ciclônica
Nebulizador	Thermo®
Potência RF (W)	1150
Vazão do gás nebulizador - Ar (L min <sup>-1</sup> )	0,4
Vazão do gás auxiliar - Ar (L min <sup>-1</sup> )	0,5
Visão do plasma	I (Ca, P, Sr, Rb); II (Mg, K)
Linhas de emissão (nm)	Ca (422,673) Mg (279,553) K (769,896) P (213,618) Sr (407,771) Rb (780,023)

I: axial; II: radial

As determinações de Li, Al, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, As, Cd, Ba, Hg, Tl e Pb foram efetuadas empregando-se ICP-MS (Elan DRG-e, PerkinElmer, EUA), equipado com um analisador de massas do tipo quadrupolo e cela dinâmica de reação e colisão, que emprega os gases metano, hidrogênio ou oxigênio para a remoção de interferências. Os parâmetros operacionais do equipamento (Tabela 3) foram otimizados diariamente, de acordo com recomendação do fabricante, com solução de 1 µg L<sup>-1</sup> de Mg, Al, Cr, Mn, Cu, Rh, Cd, In, Ce, Pb, Th e U e 10 µg L<sup>-1</sup> de Ba em HNO<sub>3</sub> 0,5 % (v/v), de modo a obter razões de contagens de CeO<sup>+</sup>/Ce<sup>+</sup> e Ba<sup>2+</sup>/Ba<sup>+</sup> inferiores a 3 % e contagens de Mg<sup>+</sup>, In<sup>+</sup> e U<sup>+</sup> maiores que 5000, 25000 e 20000, respectivamente.

**Tabela 3.** Condições operacionais do instrumento de ICP-MS nas análises quantitativas

<b>Parâmetros e condições operacionais - ICP-MS</b>	
Marca e modelo	PerkinElmer ELAN DRC-e
Câmara de nebulização	Ciclônica
Nebulizador	Meinhard®
Potência de Radiofrequência (W)	1200 W
Vazão do gás nebulizador - Ar (L min <sup>-1</sup> )	0,75 - 0,78 (otimizado diariamente)
Vazão do gás auxiliar - Ar (L min <sup>-1</sup> )	1,0
Faixa de <i>m/z</i> monitorada	<sup>7</sup> Li, <sup>27</sup> Al, <sup>55</sup> Mn, <sup>56</sup> Fe, <sup>59</sup> Co, <sup>63</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn, <sup>75</sup> As, <sup>111</sup> Cd, <sup>138</sup> Ba, <sup>202</sup> Hg, <sup>203</sup> Tl, <sup>208</sup> Pb

### 3.5. Avaliação da etapa de preparo de amostras e seleção dos analitos

Com o intuito de avaliar o método de decomposição empregado nas amostras, foi avaliada a porcentagem de recuperação do elemento Rh, sendo que, para tanto, uma triplicata de uma mistura das 19 amostras (*pool*) foi decomposta de acordo com o procedimento descrito anteriormente, juntamente com 50 µg L<sup>-1</sup> de solução-padrão de Rh. Esta adição foi efetuada em uma triplicata antes da decomposição e em outra triplicata após a decomposição. Após, a porcentagem de recuperação entre os dois grupos foi determinada e o valor aceito como uma estimativa da eficiência da decomposição.

Para a seleção dos elementos a serem estudados se fez necessária a realização de um experimento semi-quantitativo. Para tal fim, empregou-se a mesma triplicata de amostras fortificada com 50 µg L<sup>-1</sup> de Rh, cujo sinal foi empregado para normalização do sinal de todos os elementos.

As amostras foram analisadas empregando-se ICP-MS em modo de análise semi-quantitativa (*Total Quant*), no qual as seguintes faixas de razão massa-carga foram monitoradas: 6-44, 45-70, 75-90, 91-130, 131-140 e 180-183.

### 3.6. Otimização dos parâmetros instrumentais

A otimização dos parâmetros instrumentais do ICP OES foi realizada de modo univariado a partir do *pool* fortificado com os analitos (2 mg L<sup>-1</sup> de Ca, Mg, K e

P e  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  para Sr e Rb) e decomposto, visando a obtenção da maior intensidade do sinal analítico.

Foi efetuada a leitura do branco e da amostra em 9 valores de radiofrequência e vazão do gás nebulizador (Tabela 4).

**Tabela 4.** Experimentos de radiofrequência e vazão do gás nebulizador

Experimento	Radiofrequência (W)	Vazão do Gás Nebulizador ( $\text{L min}^{-1}$ )
1	1150	0,4
2	1150	0,7
3	1150	1,0
4	1200	0,4
5	1200	0,7
6	1200	1,0
7	1250	0,4
8	1250	0,7
9	1250	1,0

Para o equipamento de ICP-MS, utilizou-se a cela de reação e colisão para a determinação dos analitos que estão sujeitos a interferências. A vazão do gás de reação/colisão e a voltagem da cela (*Rpq*) foram otimizados através da ferramenta para otimização da cela disponível no equipamento. Para tanto, as contagens de uma solução contendo o isótopo de interesse e seus principais interferentes em  $\text{HNO}_3$  5% (chamada de solução matriz) e uma solução não fortificada (branco) foram testadas para os diferentes parâmetros: vazão do gás da cela entre 0,1 e  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , em intervalos de  $0,1 \text{ mL min}^{-1}$  e voltagem da cela (*Rpq*) entre 0,4 e 0,9 V, em intervalos de 0,05 V. A natureza do gás da cela também foi escolhida entre metano, hidrogênio ou oxigênio, seguindo orientações do fabricante.

Para checagem dos resultados, foram realizados testes de exatidão para verificação do desempenho do equipamento com as condições otimizadas mediante a análise de material de referência certificado de água *Trace Elements in Water - SRM1640a* fortificado com os interferentes na mesma concentração da etapa anterior.

### 3.7. Avaliação de figuras de mérito

Todas as amostras foram preparadas e analisadas em triplicata. A linearidade, o limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*), o limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantitation*) e a exatidão foram determinados para o *pool* da amostra. O LOD foi obtido pelo critério  $3\delta$  (3 vezes o desvio padrão de 20 medidas do branco dividido pela inclinação da curva), e o LOQ pelo critério  $10\delta$  (10 vezes o desvio padrão de 20 medidas do branco dividido pela inclinação da curva). A exatidão dos métodos foi avaliada pelo método de adição e recuperação. Para tanto, a amostra foi fortificada com os analitos, em três níveis de fortificação (Tabela 5) antes do processo de decomposição, após o qual foram avolumadas de modo a obter 5% (v/v) de  $\text{HNO}_3$ . As concentrações empregadas variaram em função da faixa da curva analítica adotada. A recuperação foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{(C1 - C2)}{C3} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

onde: C1 = Concentração do analito na amostra fortificada

C2 = Concentração do analito na amostra não fortificada

C3 = Concentração do analito adicionada

**Tabela 5.** Fortificação da amostra em três níveis de concentração para determinação da exatidão em ICP OES (itálico) e ICP-MS

Elemento	Níveis de Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		
	Nível 1	Nível 2	Nível 3
<i>Ca</i>	500	2000	3000
<i>Mg</i>	500	1000	2000
<i>P</i>	500	2000	3000
<i>K</i>	5000	15000	25000
<i>Sr</i>	20	60	100
<i>Rb</i>	20	60	100
Li	0,2	0,4	1,0
Al	5,0	15,0	30,0
Mn	5,0	15,0	30,0
Fe	10	20	40
Co	0,2	0,6	1,0
Cu	0,2	0,6	1,0
Zn	20	40	100
As	0,1	0,3	0,5
Cd	0,1	0,3	0,5
Ba	0,5	1,0	2,0
Hg	0,1	0,3	0,5
Tl	0,1	0,3	0,5
Pb	0,1	0,3	0,5

### 3.8. Tratamento estatístico e quimiométrico dos dados

Os resultados foram expressos em termos de média e desvio padrão entre as triplicatas.

As amostras, de acordo com a região de origem das plantas utilizadas no seu preparo, foram avaliadas por meio das seguintes ferramentas quimiométricas: Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e Análise Discriminante pelo Método dos Mínimos Quadrados Parciais, também conhecido por Análise Discriminante por Projeção a Estruturas Latentes (PLS-DA, do inglês *Projection to Latent Structures Discriminant Analysis*), utilizando-se a plataforma online *MetaboAnalyst*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação da etapa de preparo de amostras e seleção dos analitos

A fim de avaliar o processo de preparo da amostra na etapa inicial, o elemento Rh, adicionado em três amostras antes da decomposição ácida e em três amostras após a decomposição ácida, foi quantificado e a sua porcentagem de recuperação foi calculada. Obteve-se uma concentração de  $(51,5 \pm 1,4) \mu\text{g L}^{-1}$  e  $(49,9 \pm 0,5) \mu\text{g L}^{-1}$  antes e após a decomposição, respectivamente, o que resultou numa porcentagem de recuperação de  $(103 \pm 3) \%$ .

Com uma recuperação próxima a 100 %, considerou-se que não houve perdas de analito em decorrência do processo de preparo de amostra, mostrando a eficiência da decomposição. Ressalta-se, no entanto, que as particularidades de cada elemento tornaram necessária uma avaliação individual, motivo pelo qual foi realizado o procedimento de adição e recuperação para cada um deles em etapas posteriores.

Uma vez que a literatura pesquisada, até a presente data, não dispõe de dados a respeito da composição elementar da bebida Ayahuasca, a seleção dos elementos a serem estudados foi realizada utilizando-se a ferramenta de análise exploratória *Total Quant* do ICP-MS. Essa ferramenta permite a obtenção de dados a respeito da presença ou ausência dos elementos na amostra através de uma análise semi-quantitativa em que é feita uma varredura em todas as faixas de  $m/z$  selecionadas, a partir da qual o equipamento fornece a intensidade do sinal analítico de cada elemento, normalizado com um elemento pouco abundante na amostra em estudo. O elemento escolhido foi o Rh.

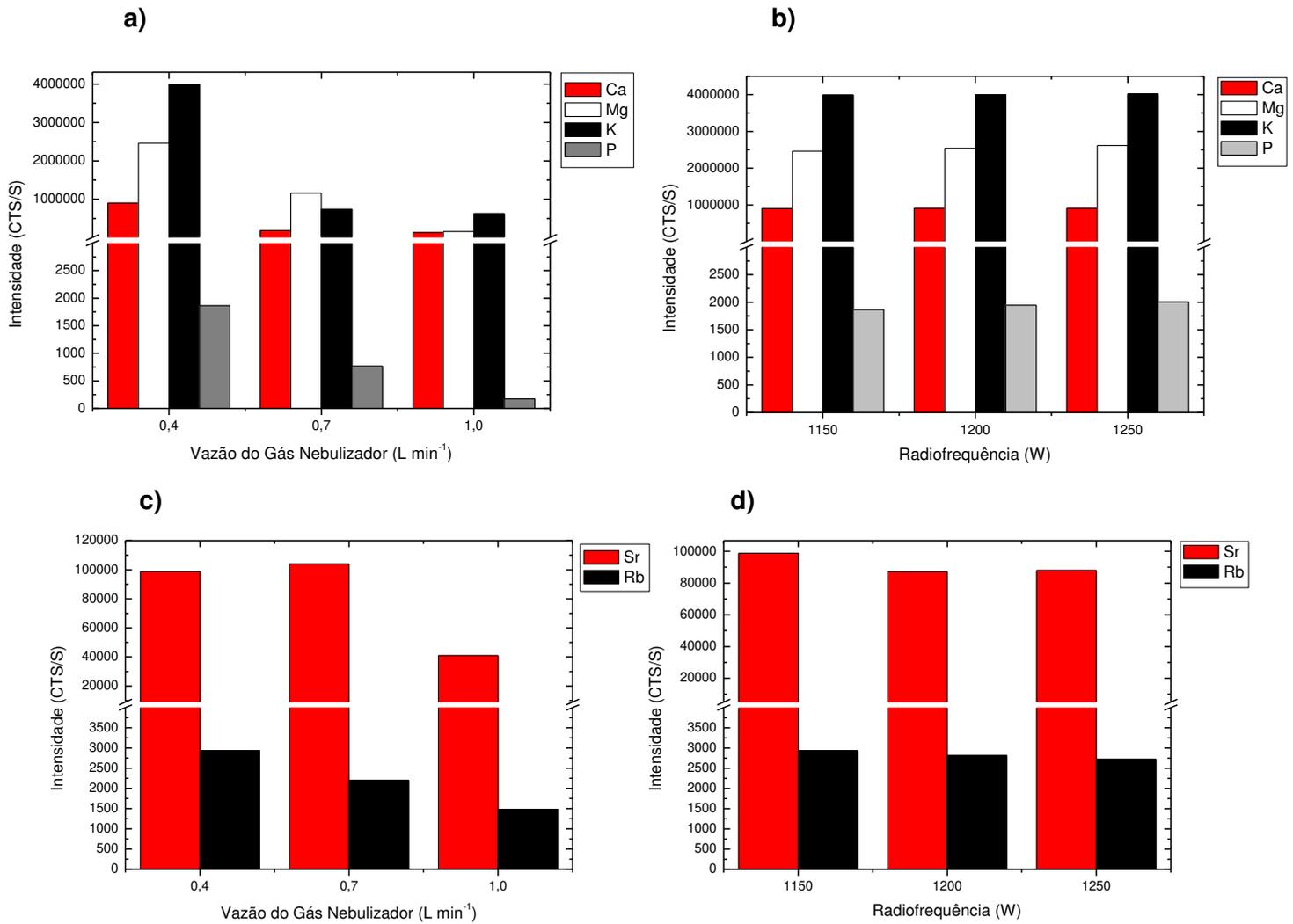
Empregando-se como fator de inclusão os sinais dos elementos, no mínimo, 5 vezes maiores que os sinais dos respectivos brancos, foram selecionados para quantificação os seguintes elementos: Li, Al, Mg, P, K, Ca, Mn, Co, Zn, Cu, Rb, Sr, Cd, Ba e Tl. Além disso, a fim de avaliar a toxicidade das amostras devido à presença de metais potencialmente tóxicos, foram incluídos os elementos As, Cd, Hg e Pb, totalizando 19 elementos.

## 4.2. Otimização dos parâmetros do instrumento de ICP OES

A partir de análises onde foram avaliados os fatores de diluição ideais para a determinação de cada elemento, optou-se por utilizar o equipamento ICP OES para a determinação dos macroatômicos Ca, Mg, K, P e de Sr e Rb.

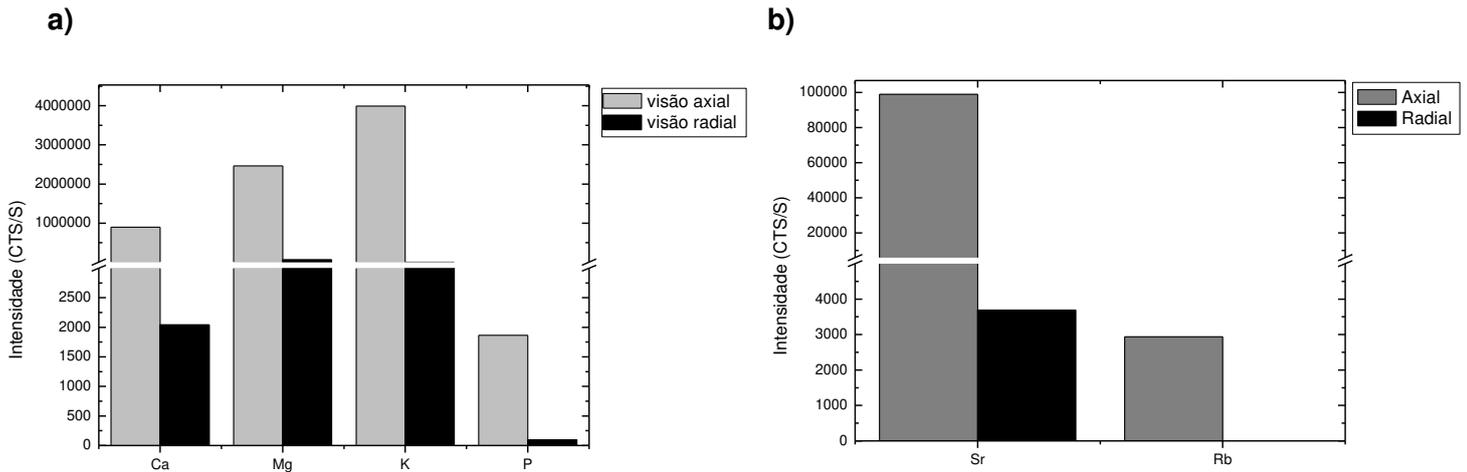
As linhas de emissão foram escolhidas com base na ausência de interferências de elementos presentes na amostra.

Observou-se que a vazão do gás nebulizador que forneceu maiores intensidades de sinais para Ca, Mg, K e P foi a de  $0,4 \text{ L min}^{-1}$  de argônio (Figura 8a). Fixando esse parâmetro, foi realizada a verificação da potência da fonte de radiofrequência. Considerando que não houve variação significativa no sinal obtido (Figura 8b), optou-se pela menor potência avaliada, 1150 W, a fim de se prolongar a vida útil do equipamento. Para a determinação de Sr e Rb observou-se que a vazão de  $0,4 \text{ L min}^{-1}$  forneceu maiores intensidades para o Rb, sem perdas significativas no sinal do Sr (Figura 8c), tendo sido esta, portanto, a vazão escolhida. Com relação à potência da fonte de radiofrequência, optou-se por trabalhar usando 1150 W (Figura 8d).



**Figura 8.** Otimização dos parâmetros instrumentais do ICP OES: a) vazão do gás nebulizador e b) potência da fonte de radiofrequência para a determinação de Ca, Mg, K e P; c) vazão do gás nebulizador e d) potência da fonte de radiofrequência para a determinação de Sr e Rb.

As duas visões de observação do plasma, axial e radial, foram avaliadas (Figura 9a). Para os elementos Ca e P optou-se pela visão axial, pois a visão radial apresentou baixa intensidade de sinal. Já para Mg e K a intensidade do sinal na visão radial foi considerada suficiente, tendo sido escolhida para ambos. No caso do Sr, a visão axial forneceu maiores intensidades e o sinal do Rb não foi detectado na visão radial, de modo que empregou-se a visão axial para ambos (Figura 9b).



**Figura 9.** Otimização dos parâmetros instrumentais ICP OES: a) visão axial e radial para a determinação de Ca, Mg, K e Rb e b) determinação de Sr e Rb.

### 4.3. Otimização dos parâmetros do ICP-MS

As análises em ICP-MS estão sujeitas a interferências, que podem dificultar as determinações de elementos traço. Dentre estas, as mais comuns são as interferências espectrais: poliatômicas, provenientes de espécies de argônio, componentes da matriz da amostra/solvente e oxigênio do ar e isobáricas, resultantes de dois isótopos diferentes com a mesma  $m/z$ , como seria o caso de  $^{54}\text{Fe}$  e  $^{54}\text{Cr}$  [29].

Para este trabalho, os isótopos  $^7\text{Li}$ ,  $^{64}\text{Zn}$ ,  $^{111}\text{Cd}$ ,  $^{138}\text{Ba}$ ,  $^{202}\text{Hg}$ ,  $^{203}\text{Tl}$  e  $^{208}\text{Pb}$  foram escolhidos levando-se em consideração a ausência de interferências isobáricas e poliatômicas. Já no caso de  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{63}\text{Cu}$  e  $^{75}\text{As}$  empregou-se a cela de reação e colisão do equipamento para remoção das interferências constantes, apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6.** Elementos, abundância natural e principais interferentes

Isótopo/espécie monitorada	Abundância natural* (%)	Principais interferentes poliatômicos
<sup>27</sup> Al	100	<sup>1</sup> H <sup>12</sup> C <sup>14</sup> N <sup>+</sup>
<sup>55</sup> Mn	100	<sup>39</sup> K <sup>16</sup> O
<sup>56</sup> Fe	91,72	<sup>40</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup>
<sup>59</sup> Co	100	<sup>43</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>24</sup> Mg <sup>35</sup> Cl <sup>+</sup>
<sup>63</sup> Cu	69,17	<sup>48</sup> Ca <sup>16</sup> OH, <sup>26</sup> Mg <sup>37</sup> Cl <sup>+</sup>
<sup>75</sup> As	100	<sup>43</sup> Ca <sup>16</sup> O <sub>2</sub> , <sup>40</sup> Ar <sup>35</sup> Cl <sup>+</sup> , <sup>59</sup> Co <sup>16</sup> O <sup>+</sup>

\*de acordo com a IUPAC [35].

Para a otimização dos parâmetros vazão do gás de reação/colisão e *Rpq* empregou-se a ferramenta para otimização da cela disponível do equipamento. Essa ferramenta fornece a condição que oferece maiores intensidades nas contagens dos elementos presentes na solução matriz (sinal) quando comparadas com as contagens da solução branco (ruído). A melhor condição será aquela cuja razão sinal/ruído é a maior possível. A vantagem dessa ferramenta é que ela permite que isso seja feito de modo automático pelo equipamento, a partir dessas duas soluções apenas, o que permite economia de tempo, reagentes e dos materiais de consumo do equipamento que, geralmente, têm custo elevado.

As condições otimizadas, bem como os gases empregados, que foram escolhidos de acordo com a orientação do fabricante, estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Condições de operação otimizadas para cela de reação e colisão

Condições de operação otimizadas para cela de reação e colisão			
Isótopo/espécie monitorada	Gás de reação/colisão	Vazão do gás (mL min <sup>-1</sup> )	<i>Rpq</i> (V)
<sup>27</sup> Al	Hidrogênio	1,0	0,90
<sup>55</sup> Mn	Metano	0,9	0,90
<sup>56</sup> Fe	Metano	0,7	0,90
<sup>59</sup> Co	Metano	0,4	0,75
<sup>63</sup> Cu	Metano	0,7	0,90
<sup>75</sup> As	Oxigênio	0,3	0,45

Visando a avaliação das condições otimizadas para o equipamento ICP-MS, foi verificada a exatidão do método analisando-se material de referência certificado de água NIST SRM1640a fortificado com os principais interferentes constantes nas amostras. A fortificação foi necessária porque o material de referência certificado não continha estes elementos em sua composição. Os resultados (Tabela 8) mostram que as recuperações dos elementos variaram de 82 a 111 %, indicando concordância entre os valores determinados e os valores certificados. Os desvios padrão relativos variaram de 0,72 a 8,15 %, indicando boa precisão.

**Tabela 8.** Resultados da determinação em NIST SRM 1640a fortificado com potenciais interferentes ( $\bar{X} \pm s$ , n = 3).

Elemento	Material de Referência Certificado SRM1640a*			
	Valor verdadeiro ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Valor encontrado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	DPR (%)	Recuperação (%)
<sup>7</sup> Li	1	1,11 $\pm$ 0,03	2,41	111
<sup>27</sup> Al	53	48 $\pm$ 3	7,01	90
<sup>55</sup> Mn	40,39	38,4 $\pm$ 0,7	1,68	5
<sup>56</sup> Fe	36,8	33,4 $\pm$ 0,3	0,97	91
<sup>59</sup> Co	20,24	20 $\pm$ 1	5,79	98
<sup>63</sup> Cu	85,75	81,6 $\pm$ 0,6	0,72	95
<sup>64</sup> Zn	55,64	61 $\pm$ 2	3,80	110
<sup>75</sup> As	8,075	6,6 $\pm$ 0,3	3,85	82
<sup>111</sup> Cd	3,99	4,2 $\pm$ 0,2	5,05	106
<sup>138</sup> Ba	151,8	137 $\pm$ 10	7,09	91
<sup>202</sup> Hg	0,5	0,50 $\pm$ 0,04	8,15	99
<sup>203</sup> Tl	1,62	1,49 $\pm$ 0,01	0,78	92
<sup>208</sup> Pb	12,101	10,6 $\pm$ 0,2	2,23	87

\*exceto Li, que foi adicionado.

#### 4.4. Avaliação de figuras de mérito

Para verificar a confiabilidade dos métodos desenvolvidos, tanto para ICP OES como para ICP-MS, foram determinadas as figuras de mérito linearidade, LOD, LOQ e exatidão. Para o caso de o desenvolvimento de um método novo, essa etapa é essencial para garantir que os resultados sejam confiáveis.

#### 4.4.1. Linearidade

A linearidade é a capacidade de reprodução de resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito nas amostras, na faixa de concentração selecionada para o trabalho. Com isso, obtém-se informação sobre a dependência entre a resposta medida e a concentração. Pode ser calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação linear (R) indica o quanto a reta obtida pela regressão linear é adequada como modelo matemático [36].

Empregando-se as condições otimizadas para ambos os equipamentos, as curvas analíticas foram obtidas com valores de R iguais ou superiores a 0,999, indicando boa linearidade (Tabela 9).

**Tabela 9.** Coeficientes de correlação obtidos para a determinação dos elementos por ICP OES (itálico) e ICP-MS

<b>Elemento</b>	<b>R</b>	<b>Elemento</b>	<b>R</b>
<i>Ca</i>	0,999	Co	0,999
<i>Mg</i>	0,999	Cu	0,999
<i>P</i>	1,000	Zn	0,999
<i>K</i>	0,999	As	0,999
<i>Sr</i>	0,999	Cd	0,999
<i>Rb</i>	0,999	Ba	0,999
Li	1,000	Hg	0,999
Al	0,999	Tl	0,999
Mn	0,999	Pb	0,999
Fe	0,999		

#### 4.4.2. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O LOD e o LOQ são parâmetros relacionados entre si, mas que tem definições distintas. O LOD pode ser definido como o menor valor de concentração do analito em uma amostra que pode ser detectado pelo método, mas não necessariamente quantificado. Já o LOQ é a menor concentração do analito que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas [36].

Foram observados LOQ abaixo de 1,050 mg L<sup>-1</sup> para todos os macroelementos e inferiores a 6 µg L<sup>-1</sup> para Sr e Rb. Para os elementos determinados por ICP-MS foram observados LOQ abaixo de 0,187 µg L<sup>-1</sup>, valores esperados devido à alta sensibilidade da técnica, exceto para Al, Fe e Zn (Tabela 10).

**Tabela 10.** LOD e LOQ obtidos para a determinação dos elementos por ICP OES (itálico) e ICP-MS

<b>Elemento</b>	<b>LOD</b> <b>(µg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ</b> <b>(µg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Elemento</b>	<b>LOD</b> <b>(µg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ</b> <b>(µg L<sup>-1</sup>)</b>
<i>Ca</i>	4	15	Co	0,003	0,011
<i>Mg</i>	9	30	Cu	0,104	0,347
<i>P</i>	10	33	Zn	0,170	0,567
<i>K</i>	300	1050	As	0,024	0,079
<i>Sr</i>	0,4	1	Cd	0,005	0,016
<i>Rb</i>	2	6	Ba	0,039	0,129
Li	0,011	0,037	Hg	0,005	0,017
Al	1,077	3,590	Tl	0,001	0,003
Mn	0,056	0,187	Pb	0,012	0,041
Fe	0,918	3,060			

#### 4.4.3. Exatidão

A exatidão de um método indica a concordância entre os resultados obtidos em um determinado ensaio com relação a um valor de referência aceito como verdadeiro [37].

Uma vez que não há disponibilidade de material de referência certificado para vegetais em decocção, a exatidão dos métodos foi avaliada mediante ensaios de adição e recuperação em três níveis de concentração. Foram obtidas recuperações entre 80 e 113 % para os elementos determinados por ICP OES e de 80 a 118 % para ICP-MS (Tabela 11), indicando exatidão satisfatória de acordo com a recomendação da AOAC para as concentrações estudadas [38].

**Tabela 11.** Porcentagens de Recuperação obtidas para a determinação dos elementos por ICP OES (itálico) e ICP-MS ( $\bar{X} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Elemento	Recuperação (%)			Elemento	Recuperação (%)		
	Nível 1	Nível 2	Nível 3		Nível 1	Nível 2	Nível 3
<i>Ca</i>	96 ± 9	92 ± 4	92 ± 2	Co	118 ± 6	100 ± 2	103 ± 2
<i>Mg</i>	99 ± 8	80 ± 6	83 ± 1	Cu	83 ± 4	90 ± 9	92 ± 3
<i>P</i>	100 ± 6	94 ± 1	95 ± 1	Zn	99 ± 9	100 ± 7	103 ± 1
<i>K</i>	95 ± 11	94 ± 3	96 ± 1	As	108 ± 6	89 ± 5	109 ± 4
<i>Sr</i>	90 ± 4	94 ± 1	87 ± 3	Cd	112 ± 4	109 ± 2	109 ± 1
<i>Rb</i>	104 ± 4	113 ± 3	95 ± 12	Ba	80 ± 8	101 ± 7	109 ± 4
<i>Li</i>	106 ± 3	106 ± 3	105 ± 2	Hg	84 ± 2	88 ± 3	88 ± 2
<i>Al</i>	95 ± 2	99 ± 3	100 ± 2	Tl	112 ± 2	88 ± 3	88 ± 2
<i>Mn</i>	84,5 ± 0,1	100 ± 6	95 ± 2	Pb	114 ± 24	106 ± 6	105,1 ± 0,2
<i>Fe</i>	108 ± 10	101 ± 6	99 ± 3				

#### 4.5. Determinação do conteúdo total

Os minerais absorvidos pelas plantas podem ser disponibilizados para o corpo humano seja pelo consumo da planta crua como de qualquer forma de preparação, incluindo as bebidas preparadas a partir da decocção de partes da planta, como na Ayahuasca, ou em medicamentos fitoterápicos. Uma vez que estes elementos podem ter influência sobre a nutrição e saúde das pessoas, para o emprego da bebida com finalidade psicoterapêutica para casos de depressão e para o desenvolvimento de um fitoterápico, é importante o conhecimento do seu conteúdo elementar. Sendo assim, foi realizada a quantificação dos elementos em 19 amostras obtidas de núcleos da UDV, o maior grupo religioso que faz uso da bebida no Brasil. Nas Tabelas 12 e 13 estão apresentadas as concentrações totais dos elementos obtidas por ICP OES e ICP-MS, respectivamente, e seus valores de desvio padrão, calculados a partir das triplicatas.

**Tabela 12.** Concentrações totais dos elementos determinados por ICP OES em 19 amostras de Ayahuasca analisadas ( $\bar{X} \pm s$ , n = 3)

	Concentração total, mg L <sup>-1</sup>					
	Ca	Mg	P	K	Sr	Rb
<b>Amostra 1</b>	158 ± 3	560 ± 4	174,4 ± 0,6	2964 ± 15	5,1 ± 0,2	11 ± 1
<b>Amostra 2</b>	664 ± 23	692 ± 21	616 ± 23	4921 ± 149	10 ± 2	6,4 ± 0,8
<b>Amostra 3</b>	629 ± 37	678 ± 42	599 ± 30	4798 ± 223	7,83 ± 0,01	6,3 ± 0,7
<b>Amostra 4</b>	438 ± 13	893 ± 34	555 ± 21	6396 ± 232	10,3 ± 0,4	12,5 ± 0,6
<b>Amostra 5</b>	153 ± 17	424 ± 22	47 ± 2	2017 ± 58	3,1 ± 0,2	5 ± 0,3
<b>Amostra 6</b>	497 ± 18	833 ± 42	152 ± 7	3433 ± 167	8 ± 0,04	12,1 ± 0,1
<b>Amostra 7</b>	397 ± 12	389 ± 11	107 ± 2	2549 ± 15	6,7 ± 0,2	8,5 ± 0,1
<b>Amostra 8</b>	500 ± 11	713 ± 19	371 ± 11	4656 ± 109	4,3 ± 0,2	7,6 ± 0,2
<b>Amostra 9</b>	282 ± 11	476 ± 14	316 ± 10	5391 ± 156	2 ± 0,2	10,9 ± 0,4
<b>Amostra 10</b>	235 ± 19	477 ± 14	62 ± 1	2397 ± 58	4,4 ± 0,2	4,9 ± 0,2
<b>Amostra 11</b>	489 ± 18	705 ± 18	383 ± 5	4501 ± 64	4,3 ± 0,2	7,6 ± 0,2
<b>Amostra 12</b>	280 ± 4	313 ± 6	62 ± 1	2217 ± 39	1,73 ± 0,03	19,6 ± 0,3
<b>Amostra 13</b>	576 ± 24	1034 ± 37	272 ± 8	7263 ± 100	11,4 ± 0,5	21,2 ± 0,5
<b>Amostra 14</b>	102 ± 7	1034 ± 43	137 ± 5	3827 ± 104	3,6 ± 0,2	6,9 ± 0,3
<b>Amostra 15</b>	402 ± 29	540 ± 28	76 ± 4	2412 ± 111	5,6 ± 0,3	3,9 ± 0,2
<b>Amostra 16</b>	166 ± 1	953 ± 2	395 ± 1	6022 ± 6	8,21 ± 0,04	19,3 ± 0,1
<b>Amostra 17</b>	420 ± 22	397 ± 7	96 ± 2	2485 ± 53	7,6 ± 0,2	7,9 ± 0,3
<b>Amostra 18</b>	479 ± 14	838 ± 17	237 ± 5	5126 ± 71	8,6 ± 0,1	25,3 ± 0,3
<b>Amostra 19</b>	169 ± 18	1542 ± 26	498 ± 11	6962 ± 120	14 ± 1	37 ± 4

**Tabela 13.** Concentrações totais dos elementos determinados por ICP-MS em 19 amostras de Ayahuasca analisadas ( $\bar{X} \pm s$ , n = 3)

	Concentração total, $\mu\text{g L}^{-1}$												
	Li	Al	Mn	Fe	Cu	Co	Zn	As	Cd	Ba	Hg	Tl	Pb
<b>Amostra 1</b>	9,4 ± 0,7	5641 ± 397	33615 ± 1984	1753	< LQ	85 ± 1	9915 ± 140	<LQ	11,0 ± 0,4	1055 ± 60	<LQ	31,6 ± 0,4	179 ± 28
<b>Amostra 2</b>	33,9 ± 0,4	5016 ± 341	30373 ± 1225	1810±63	< LQ	30 ± 1	15702 ± 445	<LQ	10,9 ± 0,5	2137 ± 67	<LQ	5,64 ± 0,05	<LQ
<b>Amostra 3</b>	34,7 ± 0,6	4767 ± 287	29921 ± 907	4870±319	< LQ	30 ± 1	15283 ± 186	<LQ	11,05 ± 0,6	2189 ± 26	<LQ	5,7 ± 0,2	<LQ
<b>Amostra 4</b>	57 ± 2	<LQ	24800 ± 1355	2001±79	116 ± 10	142 ± 7	12591 ± 110	<LQ	8,4 ± 0,6	3813 ± 43	<LQ	8,7 ± 0,1	27 ± 1
<b>Amostra 5</b>	11,2 ± 0,9	7234 ± 385	22142 ± 485	4432±1011	81 ± 12	7 ± 1	7230 ± 548	<LQ	4,3 ± 0,1	185 ± 10	<LQ	10,6 ± 0,3	72 ± 10
<b>Amostra 6</b>	73 ± 3	1325 ± 277	22501 ± 421	4779±166	< LQ	< LQ	616 ± 94	<LQ	4,4 ± 0,5	216 ± 7	<LQ	15,6 ± 0,6	31 ± 9
<b>Amostra 7</b>	53,9 ± 0,5	3490 ± 148	27608 ± 239	2857±1913	87 ± 33	35 ± 1	15420 ± 165	<LQ	26,9 ± 0,7	700 ± 20	<LQ	10,2 ± 0,2	159 ± 9
<b>Amostra 8</b>	11,2 ± 0,5	3608 ± 41	33640 ± 382	1759±5	< LQ	22,2 ± 0,3	8444 ± 177	<LQ	10,2 ± 0,2	568 ± 14	<LQ	3,8 ± 0,2	179 ± 8
<b>Amostra 9</b>	4,5 ± 0,2	1937 ± 188	7709 ± 234	2463±375	< LQ	5,6 ± 0,4	11113 ± 550	<LQ	11,8 ± 0,5	199 ± 9	<LQ	7,9 ± 0,2	17 ± 2
<b>Amostra 10</b>	8,7 ± 0,3	8863 ± 607	7659 ± 239	2732±383	< LQ	9,6 ± 0,8	6707 ± 145	<LQ	3,9 ± 0,2	319 ± 6	<LQ	6,5 ± 0,2	58 ± 3
<b>Amostra 11</b>	12,4 ± 0,2	4569 ± 133	30859 ± 314	2178±248	119 ± 28	21 ± 2	9390 ± 779	<LQ	10,4 ± 0,2	595 ± 32	<LQ	3,9 ± 0,1	158 ± 5
<b>Amostra 12</b>	21,6 ± 0,9	1151 ± 140	4848 ± 274	2462±525	< LQ	9,2 ± 0,2	4469 ± 177	<LQ	8,0 ± 0,4	353 ± 3	<LQ	6,6 ± 0,1	<LQ
<b>Amostra 13</b>	66 ± 1	7905 ± 640	93519 ± 4385	1893±112	74 ± 13	39 ± 1	1765 ± 733	<LQ	18 ± 2	1969 ± 101	<LQ	10,2 ± 0,3	54 ± 8
<b>Amostra 14</b>	76,3 ± 0,7	<LQ	30082 ± 347	1834±34	< LQ	70 ± 6	6561 ± 297	<LQ	8,1 ± 0,5	507 ± 43	<LQ	11,4 ± 0,3	<LQ
<b>Amostra 15</b>	10,8 ± 0,2	<LQ	18291 ± 535	1811±66	< LQ	6,9 ± 0,7	9672 ± 850	<LQ	6 ± 1	829 ± 21	<LQ	14,6 ± 0,3	140 ± 11
<b>Amostra 16</b>	75,5 ± 0,7	<LQ	29783 ± 562	1865±98	< LQ	170 ± 6	10862 ± 265	<LQ	9,7 ± 0,2	669 ± 43	<LQ	13,3 ± 0,2	<LQ
<b>Amostra 17</b>	50 ± 1	6094 ± 194	39713 ± 1041	3491±101	< LQ	63 ± 2	13691 ± 423	<LQ	16,5 ± 0,5	503 ± 20	<LQ	13,3 ± 0,2	351 ± 9
<b>Amostra 18</b>	14,5 ± 0,2	3135 ± 289	47370 ± 2055	2415±50	< LQ	15,8 ± 0,4	13552 ± 73	<LQ	3,8 ± 0,5	1117 ± 28	<LQ	11,4 ± 0,2	<LQ
<b>Amostra 19</b>	29,0 ± 0,7	9709 ± 205	7709 ± 234	6902±143	169 ± 40	60 ± 2	19264 ± 520	<LQ	7,8 ± 0,2	2564 ± 83	<LQ	19,3 ± 0,5	152 ± 14

Em relação aos macromelementos estudados, essenciais para a dieta humana, os teores de Ca variaram de 102 a 664 mg L<sup>-1</sup>, os de Mg de 313 a 1542 mg L<sup>-1</sup>, os de P de 47 a 616 mg L<sup>-1</sup> e os de K de 2017 a 7263 mg L<sup>-1</sup>. As concentrações de Mg e K estão acima do encontrado em outras bebidas preparadas a partir da infusão de plantas medicinais. PYTLAKOWSKA *et al* (2012), por exemplo, encontrou valores de Mg e K que variaram de 129 a 442 mg L<sup>-1</sup> e 1048 a 2782 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente [25]. Esses valores mais altos podem ser devido ao fato de o processo de decocção ser mais extremo quando comparado ao de infusão, resultando em maior extração desses compostos, ainda mais considerando que os valores de são muito próximos aos encontrados por ARUMUGAN *et al.* (2012) em folhas de outras plantas medicinais, que encontrou concentrações de K que variaram de 2524 a 8096 mg L<sup>-1</sup> [39], valores muito próximos aos obtidos neste trabalho. Essas concentrações elevadas são esperadas em bebidas derivadas de plantas, por serem elementos essenciais ao seu desenvolvimento, estando presente em praticamente todos os seus órgãos e tecidos.

De acordo com o regulamento técnico sobre ingestão diária recomendada pela ANVISA [40], o limite para ingestão de Ca, Mg e P para indivíduos adultos é de 1000, 260 e 700 mg/dia, respectivamente, e a OMS [41] recomenda um máximo de 3510 mg/dia para K.

Levando-se em consideração os valores de ingestão diária recomendados e estimando uma ingestão de aproximadamente 200 mL de Ayahuasca, as quantidades máximas desses minerais que seriam ingeridas quando da administração da bebida são as constantes na Tabela 14. Essa estimativa foi realizada a partir das amostras que apresentaram a maior concentração para cada um dos elementos, de modo que reflete o valor máximo que poderia ser ingerido ao se consumir a bebida.

**Tabela 14.** Valores de ingestão diária recomendada de macromelementos e doses máximas ao se consumir um volume de 200 mL de Ayahuasca

	<b>Ingestão recomendada (mg/dia)</b>	<b>Ingerido com Ayahuasca (mg/dia)</b>	<b>Valores Diários (%)</b>
Ca	1000	133	13
Mg	260	308	118
P	700	123	18
K	3510	1453	41

Verifica-se que, excetuando-se o Mg, todos os demais elementos seriam ingeridos numa quantidade inferior ao limite recomendado, não sendo, portanto, prejudiciais. Com relação ao Mg, há ainda que se levar em consideração que os rituais religiosos que administram Ayahuasca são efetuados a cada 15 dias, e ainda, baseando-se no estudo de Osório *et al.* (2015) [9], os efeitos antidepressivos desta têm a duração aproximada de 15 dias, o que significa que esse seria o período de tempo entre uma ingestão e outra, de modo que poderia ser administrada sem maiores problemas, ainda mais considerando-se que apenas uma amostra (amostra 19) apresenta uma concentração superior ao recomendado.

Sr e Rb estão presentes nas concentrações de 2 a 11,4 mg L<sup>-1</sup> e 3,9 a 37 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. As concentrações de Sr estão abaixo do encontrado em outras plantas medicinais, bem como em suas infusões. Isso pode ser devido à menor eficiência de extração do Sr [25], podendo ser também o caso do Rb.

Com relação aos microelementos, as maiores concentrações encontradas foram as dos elementos Mn (4,85 a 93,52 mg L<sup>-1</sup>), Zn (0,62 a 19,26 mg L<sup>-1</sup>), Al (1,15 a 9,71 mg L<sup>-1</sup>), Ba(0,20 a 3,81 mg L<sup>-1</sup>) e Fe (1,75 a 6,90 mg L<sup>-1</sup>).

Tendo em vista que alguns microelementos são considerados nutrientes essenciais para o organismo, a ANVISA [40] também estabelece valores diários recomendados para a sua ingestão, exceto para o Li, cuja essencialidade ainda é discutível [42]. A Tabela 15 estabelece os valores de ingestão diária recomendados desses elementos, bem como aqueles máximos obtidos mediante administração da Ayahuasca, considerando um ingestão de 200 mL.

**Tabela 15.** Valores de ingestão diária recomendada de microelementos e doses máximas ao se consumir um volume de 200 mL de Ayahuasca

	<b>Ingestão recomendada (mg/dia)</b>	<b>Ingerido com Ayahuasca (mg/dia)</b>	<b>Valores Diários (%)</b>
Fe	14	1,4	10
Zn	7,0	3,9	56
Cu	0,9	0,03	3
Li	1,0*	0,015	1,5

\*\*Valor provisório, pois a essencialidade do Li ainda é discutível [37].

Os valores permitem concluir que todos estes microelementos seriam ingeridos numa quantidade inferior ao limite recomendado, não sendo, portanto, prejudiciais.

Com relação ao Co, a ingestão máxima recomendada é de 0,0024 mg [40]. Ainda que os valores estejam acima dos valores diários recomendados na maioria das amostras, a ingestão seria realizada a cada 15 dias e não diariamente. Deve-se considerar também que há uma grande margem entre os valores presentes nas amostras e os valores tóxicos, que são de 250 – 300 mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo [43].

A dose diária de ingestão recomendada de Mn é de 2,3 mg. Por ser um elemento considerado tóxico acima de determinadas concentrações, estabelece-se também o limite diário de ingestão tolerável, que é de 11 mg [44]. Entre todas as amostras analisadas, apenas uma (amostra 13) apresentou ingestão máxima de Mn acima do valor tolerável, que foi de 18,7 mg, considerando um volume de 200 mL da bebida. Todas as outras amostras apresentaram-se com valores inferiores ao limite tolerável e, embora estejam acima do valor diário recomendado, deve-se levar em consideração que a ingestão da Ayahuasca seria a cada 15 dias.

A ANVISA, em sua RDC nº 48, de 16 de março de 2004, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, estabelece que, para o registro, o medicamento deve preencher alguns requisitos, como a ausência de riscos tóxicos ao usuário e ausência de grupos ou substâncias químicas tóxicas, ou se presentes, que sejam dentro de limites comprovadamente seguros. Essa resolução abrange medicamentos cujos princípios ativos são exclusivamente derivados de drogas vegetais [45], como seria o caso da Ayahuasca.

Assim, a respeito dos metais pesados potencialmente tóxicos, As e Hg ficaram abaixo do limite de quantificação em todas as amostras. As concentrações de Cd variaram de 3,8 a 26,9 µg L<sup>-1</sup> e as de Pb de 0,041 a 351 µg L<sup>-1</sup>, ambas abaixo dos limites toleráveis pela OMS em preparações derivadas de plantas medicinais, que são de 0,3 mg kg<sup>-1</sup> para Cd e 10 mg kg<sup>-1</sup> para Pb [46]. Com relação ao Ba, a ingestão diária tolerável é de 12,6 mg para uma pessoa de 60 kg [47]. Os valores obtidos em todas as amostras estão abaixo desse limite.

Por fim, tendo em vista a sua natureza cumulativa no organismo, os valores toleráveis para o Al foram estabelecidos semanalmente, sendo de 60 mg/semana para uma pessoa de 60 kg [48], de tal modo que a Ayahuasca se apresenta segura também com relação a este elemento.

Como visto, as concentrações de todos os elementos apresentaram grande variação entre as amostras. As causas dessa variação podem ter origem nas condições diversas a que as plantas estiverem expostas, já que são provenientes

tanto da região sudeste como da região norte do Brasil e, portanto, submetidas a condições climáticas e de solo diferentes. Podem ainda, ser decorrência de variações aleatórias. No caso da bebida Ayahuasca, cujo preparo se dá de modo artesanal, essas variações aleatórias podem estar relacionadas tanto ao modo de preparo, como com a quantidade das plantas empregada, tempo de cozimento, recipiente de preparo, armazenamento, entre outros. Essas condições poderiam ser melhor controladas e avaliadas se as amostras tivessem sido preparadas no laboratório, o que não foi possível devido ao impedimento legal por conta da presença de substância proscrita pela legislação brasileira (DMT), que só permite o preparo da bebida para uso ritual. Por outro lado, da forma como foi realizado, os resultados refletem a condição real da bebida ao ser consumida.

#### **4.6. Análise Multivariada**

A fim de verificar se as variações observadas nas concentrações dos elementos entre as amostras são decorrentes de condições diferentes de exposição das plantas durante seu cultivo ou de variações ocasionadas durante o preparo, procedeu-se a uma análise multivariada empregando-se métodos de reconhecimento de padrões.

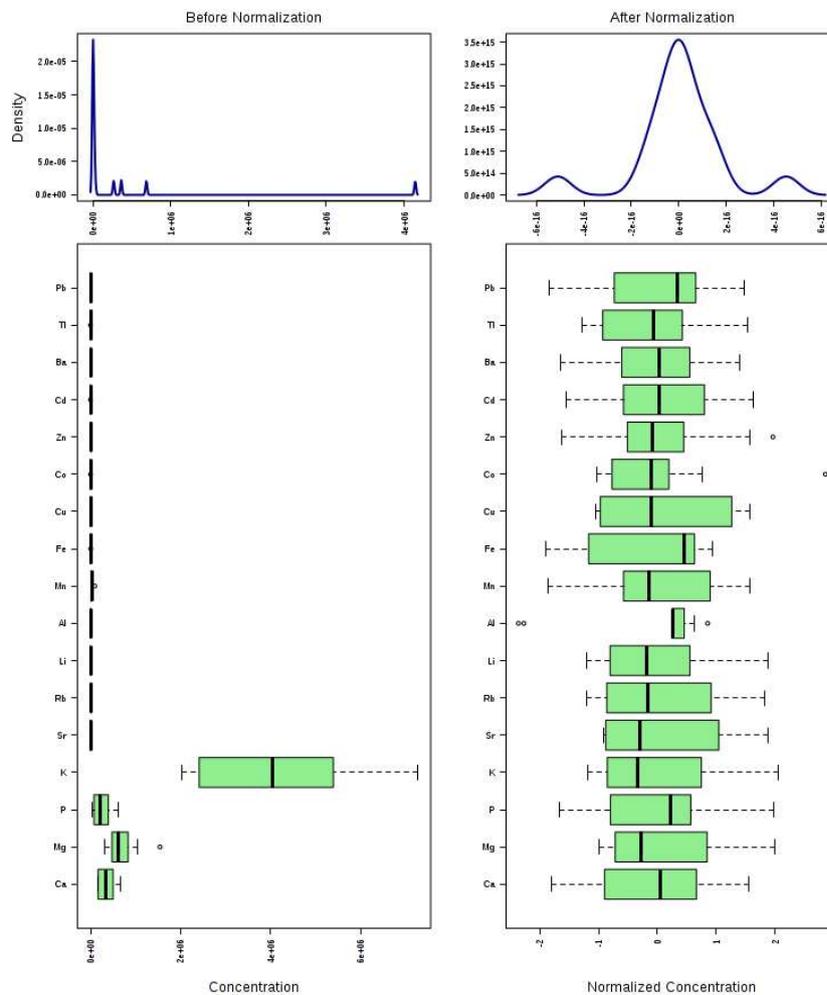
No intuito de avaliar se as diferenças observadas no conteúdo total elementar poderiam agrupar as amostras de acordo com a região de origem das plantas, os dados obtidos foram submetidos à análise exploratória por meio do método não supervisionado de análise PCA e pelo método supervisionado, PLS-DA.

Estas ferramentas tornaram possível a avaliação de todas as variáveis simultaneamente, a fim de verificar a possibilidade de formação de agrupamentos a partir das características das amostras de uma forma mais rápida, uma vez que permitiu maior facilidade na visualização dos dados.

Para tanto, os dados foram organizados em um arranjo ordenado de linhas e colunas para formar as matrizes, em que cada linha correspondeu a uma amostra e onde as variáveis de cada amostra foram posicionadas em colunas. Considerando as diferenças nas ordens de grandeza entre macro e microelementos, foi necessário um pré-tratamento dos dados, com o objetivo de minimizar o peso em relação às diferentes proporções. Neste trabalho, o pré-tratamento consistiu em uma normalização dos dados pela mediana das amostras, uma transformação logarítmica ( $\log_{10}$ ) para linearização dos dados e autoescalamamento, em que cada coluna da

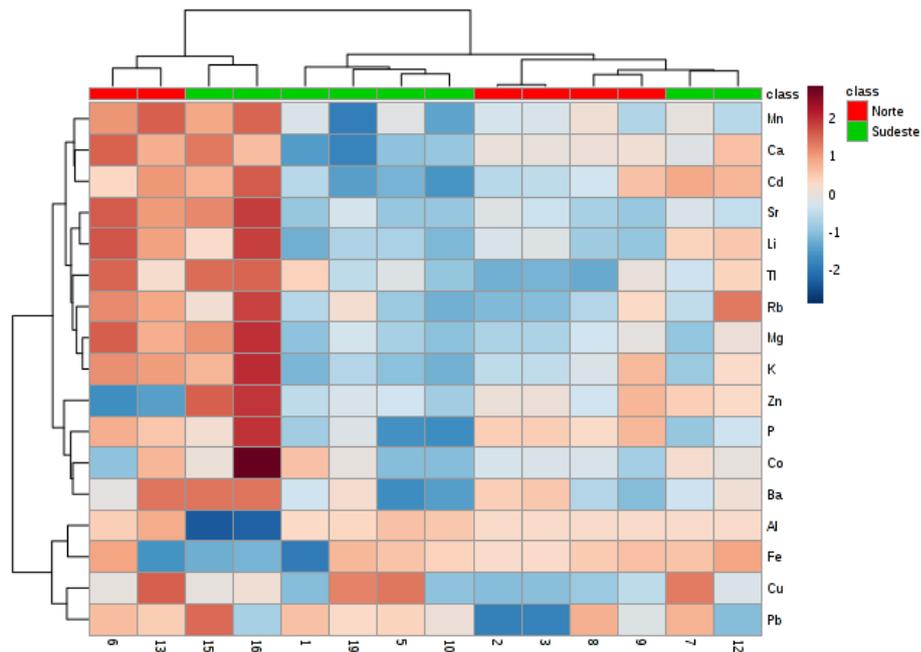
matriz de dados é centrada na média e escalada pelo desvio-padrão dessa coluna [30].

O efeito desse tratamento sobre o conjunto de amostras pode ser visualizado na Figura 10.



**Figura 10.** Efeito do pré-tratamento dos dados sobre as ordens de grandeza das variáveis: normalização pela mediana da amostra, transformação em log e autoescalamento.

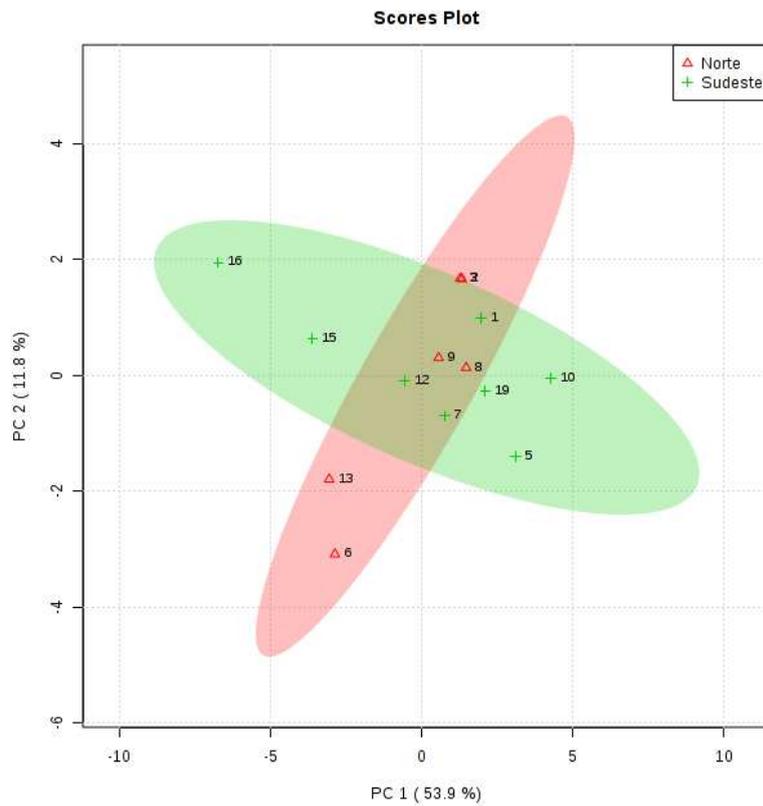
Após a normalização dos dados, uma análise de correlação foi usada para visualizar as correlações gerais entre diferentes características, a partir da qual se obteve-se um *heatmap*, onde cada quadrado colorido corresponde a um valor de concentração, sendo que o vermelho representa maiores concentrações.



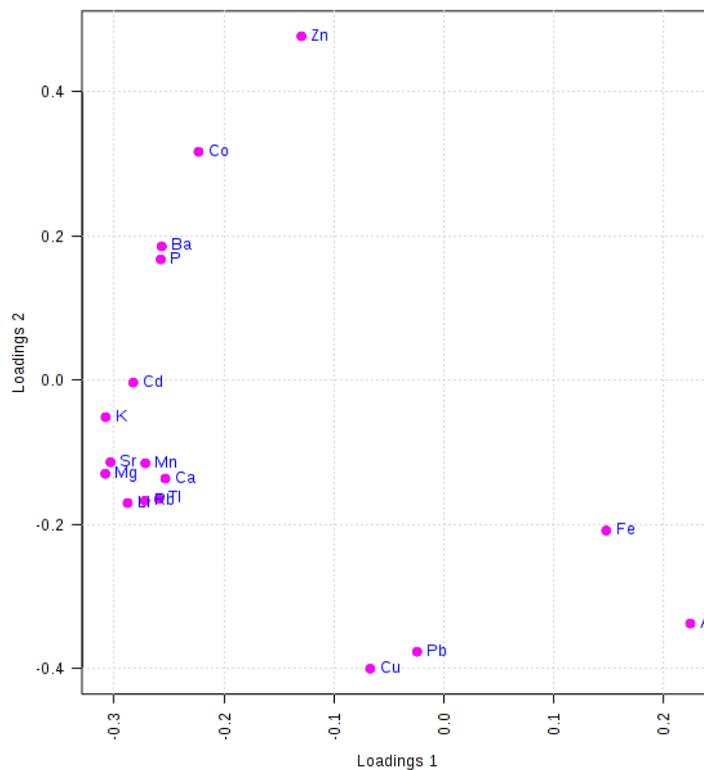
**Figura 11.** Comparação por *heatmap* da abundância dos elementos das amostras provenientes da região Norte (vermelho) e Sudeste (verde).

Pela inspeção do *heatmap* percebe-se que o cobalto está com alta concentração na amostra 16, proveniente da região Sudeste. Checando na Tabela 13, de fato esta é a amostra mais concentrada. Esse recurso é interessante porque permite que sejam identificadas amostras com valores excepcionalmente altos ou baixos mediante uma rápida inspeção, como foi neste caso. No alto da figura, é possível verificar também o grau de similaridade entre as amostras, sendo que são mais similares quanto menor for o tamanho das linhas.

Em seguida, foi realizada a PCA com o intuito de modelar os dados referentes ao conteúdo elementar por duas componentes principais (PC1 e PC2). As Figuras 12 e 13 mostram o resultado para as amostras preparadas com plantas provenientes das regiões Norte e Sudeste do Brasil.



**Figura 12.** Gráfico de *scores* para bebidas Ayahuasca preparadas com *P. viridis* e *B. caapi* provenientes das regiões Norte (vermelho) e Sudeste (verde).



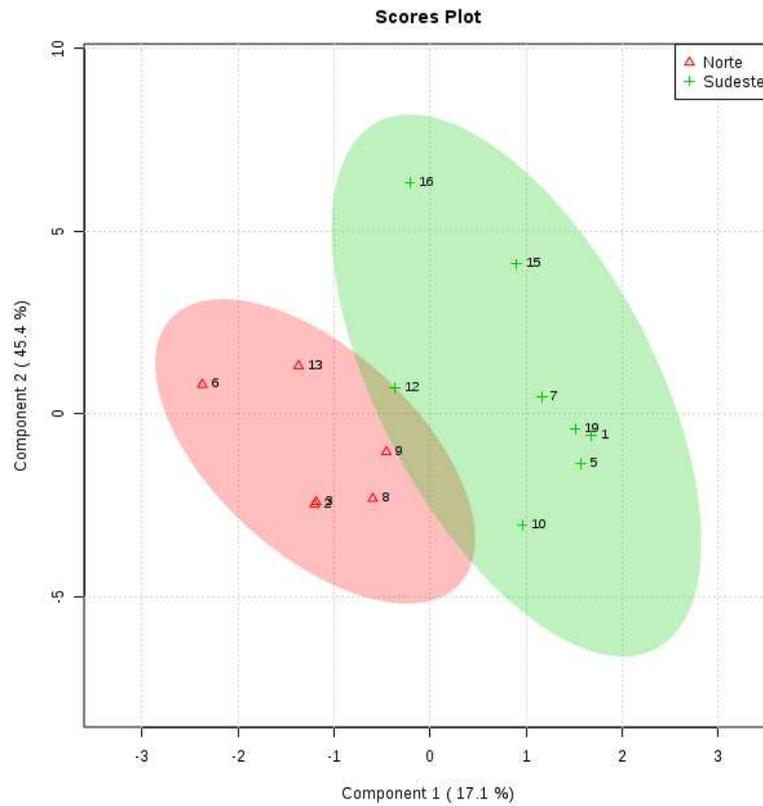
**Figura 13.** Gráfico de *loadings* para bebidas Ayahuasca preparadas com *P. viridis* e *B. caapi* provenientes das regiões Norte e Sudeste.

Os *scores* representam as coordenadas das amostras no sistema de eixos formado pelos PCs. Estas variáveis são ponderadas pelos *loadings*, que mostram a contribuição de cada variável original para o modelo.

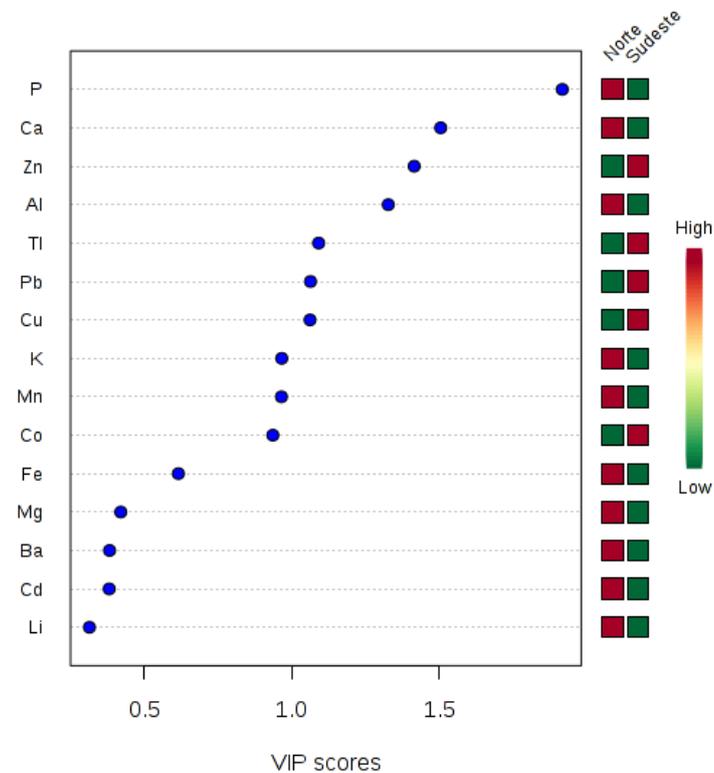
No gráfico de *scores* (Figura 12), a porcentagem de variância explicada pela PC1 foi de 53,9 %, enquanto a da PC2 foi de 11,8 %. Essas duas componentes, portanto, explicaram 65,7 % dos dados. Há uma porcentagem dos dados que não puderam ser modelados pelas PCs, que representam o resíduo.

Essa modelagem por PCA parece não sido adequada para este conjunto de dados, pois a maior parte das amostras se concentrou no centro do gráfico, não sendo possível a distinção clara entre elas. Dessa forma, uma análise do gráfico de *loadings* (Figura 13), que deveria permitir que fossem feitas correlações entre os agrupamentos e as concentrações dos elementos, não fornece informação conclusiva. A primeira vista, parece que os elementos Cu, Pb, na parte inferior do gráfico contribuíram mais para as amostras 6 e 13, Al e Fe para as amostras que estão mais deslocadas para a direita enquanto que todos os outros elementos contribuíram mais para as amostras que estão deslocadas para a esquerda.

De acordo com Worley e Powers (2013), a análise de PCA fornece um primeiro olhar informativo sobre as relações entre os grupos, podendo ser utilizadas para formular uma conclusão inicial que PLS-DA pode verificar e testar com mais detalhes [34]. A aplicação do método PLS-DA sobre as mesmas amostras forneceu o resultado apresentado nas Figuras 14 e 15.



**Figura 14.** Gráfico de *scores* de análise PLS-DA para bebidas Ayahuasca preparadas com *P. viridis* e *B. caapi* das regiões Norte (vermelho) e Sudeste (verde).



**Figura 15.** Características importantes identificadas na análise PLS-DA para bebidas Ayahuasca preparadas com *P. viridis* e *B. caapi* provenientes das regiões Norte e Sudeste.

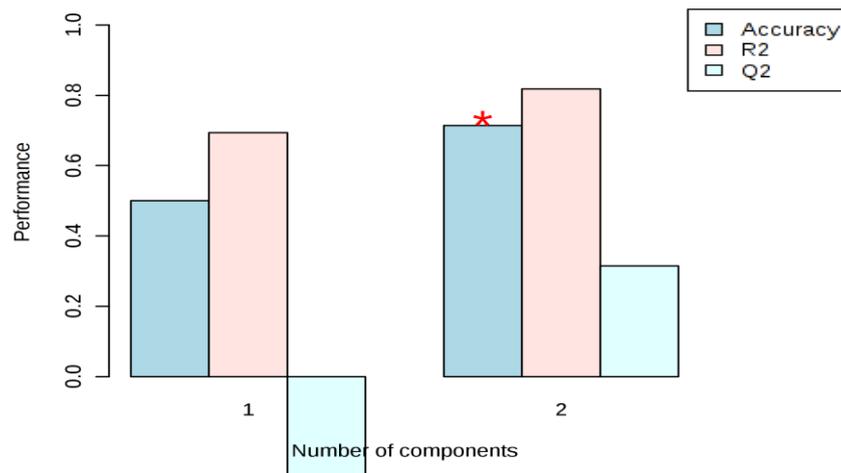
Pelo gráfico de *scores* da análise PLS-DA (Figura 14) foi possível verificar a formação dos dois agrupamentos das amostras, sendo que a porcentagem de dados explicados por PC1 foi de 17,1 % e PC2 foi de 45,4 %, o que fornece uma porcentagem de 62,5 % de dados explicados.

Para visualização do nível de intensidade de cada elemento para essa separação utilizou-se um dos métodos de medida de importância de cada variável, VIP (do inglês *Variable Importance in Projection*) (Figura 15), em que se faz a soma ponderada dos quadrados dos PLS *loadings* levando em consideração a quantidade de variação em Y em cada dimensão. As caixas coloridas à direita indicam as concentrações de cada elemento, sendo que o vermelho representa maior concentração e o verde menor. Quanto aos círculos em azul, quanto mais para a direita, maior é a importância dessa variável para a separação dos grupos. Observa-se que P, Ca, Zn e Al foram os que mais contribuíram para essa separação, sendo que P, Ca e Al estão em maior concentração nas amostras da região Norte enquanto que Zn está em maior concentração nas amostras da região Sudeste.

O método de PLS-DA tem uma tendência para ajustar modelos, às vezes identificando uma excelente separação de classes em variáveis completamente aleatórias, de modo que é necessário uma validação para garantir a confiabilidade do modelo [34]. A validação fornecida pelo *MetaboAnalyst* é baseada na validação cruzada, em que são calculados os valores de Q2 e R2.

O valor de Q2 normalmente é relatado como resultado da validação cruzada e fornece uma medida qualitativa de consistência entre os dados previstos e os originais, enquanto R2, embora não seja estritamente uma medida de validação cruzada, pode ser usado para avaliar seu grau de ajuste aos dados. Valores R2 e Q2 altamente díspares ou valores de Q2 negativos são um indicador de possível ajuste excessivo do modelo em análises supervisionadas [34], ou seja, o modelo não é previsível ou está excessivamente ajustado.

A validação cruzada para o modelo PLS-DA (Figura 16) forneceu valores de Q2 negativos, ou seja, muito provavelmente este modelo tem baixa relevância estatística, devendo ser avaliado com cautela.



**Figura 16.** Validação cruzada para modelo PLS-DA de bebidas Ayahuasca preparadas com *P. viridis* e *B. caapi* provenientes das regiões Norte e Sudeste.

Tanto PCA quanto PLS-DA forneceram modelos que explicaram aproximadamente 60 % dos dados, o que indica que, embora uma parcela das variações no conteúdo elementar encontradas entre as amostras possam ser decorrentes das regiões de procedência das plantas, ainda assim, há uma grande parcela que não pode ser explicada desse modo.

Sendo assim, pode-se concluir que essas variações são ocasionadas por variações decorrentes do modo de preparo, da quantidade das plantas empregada, proporção entre as duas espécies, tempo de cozimento, recipiente de preparo, armazenamento, entre outros, como mencionado anteriormente. Este resultado é muito compreensível, uma vez que cada amostra foi preparada de modo artesanal, em núcleos da UDV diferentes, sem a utilização de um protocolo padrão, sendo de se esperar, portanto, que as concentrações dos elementos seriam diferentes em cada uma delas.

#### 4.7. Potenciais efeitos psicoterapêuticos da Ayahuasca

Para a avaliação dos efeitos psicoterapêuticos dos elementos, tanto individualmente como quando combinados com os ativos orgânicos, é necessário o conhecimento das propriedades antidepressivas dos elementos, se presentes.

O papel dos íons metálicos no cérebro está ligado ao desenvolvimento e manutenção de atividades enzimáticas, aprendizado e memória, função

mitocondrial, mielinização e neurotransmissão. O rompimento de qualquer um desses mecanismos ou a absorção de metais tóxicos gera um desequilíbrio da homeostase do metal no cérebro, que inicia uma cascata de eventos que leva à neurodegeneração e morte celular, resultando na doença [49].

Dados obtidos a partir de estudos clínicos têm mostrado a importância de alguns elementos na fisiopatologia de transtornos como depressão e ansiedade. Isso porque muitos deles têm influência na transmissão neural envolvida em processos emocionais, principalmente aqueles relacionados aos sistemas serotoninérgicos, dopaminérgicos, glutamatérgicos e GABAérgicos [50], responsáveis pela regulação dos neurotransmissores serotonina, dopamina, glutamina e GABA, respectivamente. Uma descrição dos mecanismos com que cada elemento atua nesses sistemas, no entanto, foge do escopo deste trabalho.

Uma vez que muitas dessas doenças podem ser influenciadas por um excesso de alguns desses íons metálicos no organismo, é plausível supor que se estes estão presentes na Ayahuasca, provocaria um efeito antagônico, prejudicando a ação antidepressiva dos ativos orgânicos. Por outro lado, se um dado íon metálico é essencial para que uma função cerebral ocorra de forma adequada, e sua deficiência tem papel no surgimento ou agravamento dos sintomas da doença, então, se está presente na Ayahuasca, poderia apresentar um efeito sinérgico, melhorando as propriedades antidepressivas quando combinadas com os alcaloides.

Estas relações podem fornecer informações interessantes a respeito das diversas amostras, mostrando aquelas que, por terem menor concentração dos alcaloides talvez não tivessem importante papel antidepressivo, mas que, ao se somar com a concentração dos íons metálicos, teriam suas propriedades melhoradas pelo sinergismo. Evidentemente, um estudo mais detalhado depende do conhecimento das concentrações das espécies orgânicas suficientes para se atingir o efeito psicoativo.

#### 4.7.1. Avaliação das concentrações dos alcaloides

Paralelamente à realização deste trabalho, também foram determinadas as concentrações de DMT, HME, HML e THH nas mesmas amostras em estudo [51]. Os valores encontrados podem ser visualizados na Tabela 16.

**Tabela 16.** Concentrações dos ativos orgânicos (alcaloide psicoativo DMT e alcaloides beta-carbônicos THH, HME e HML) determinadas por UHPLC-MS/MS ( $\bar{X} \pm s$ , n = 3)

Concentração, mg L <sup>-1</sup>				
Amostra	DMT	Tetraidro-harmina	Harmina	Harmalina
1	80 ± 7	1217 ± 56	1193 ± 53	128 ± 7
2	69 ± 1	825 ± 6	844 ± 3	64
3	68 ± 2	831 ± 6	844 ± 3	64
4	181 ± 12	636 ± 30	845 ± 20	45 ± 2
5	65 ± 3	403 ± 8	549 ± 12	48 ± 2
6	189 ± 2	560 ± 14	825 ± 14	53 ± 2
7	117 ± 2	577 ± 5	660 ± 6	60
8	105 ± 2	1321 ± 2	1700 ± 7	149 ± 2
9	129 ± 6	1470 ± 81	1717 ± 33	155 ± 5
10	62 ± 2	673 ± 6	549 ± 7	61 ± 15
11	93 ± 2	1205 ± 9	1816 ± 7	157 ± 2
12	109 ± 5	648 ± 18	907 ± 19	89 ± 5
13	340 ± 11	667 ± 21	1108 ± 32	44
14	165 ± 6	740 ± 26	1160 ± 31	71 ± 2
15	68	857 ± 8	965 ± 4	107 ± 2
16	116 ± 7	580 ± 29	501 ± 23	48 ± 4
17	115 ± 5	565 ± 21	747 ± 29	72 ± 4
18	13 ± 24	840 ± 115	415 ± 62	57 ± 12
19	140 ± 17	3088 ± 325	1412 ± 109	392 ± 42

As concentrações de DMT variaram de 62 a 340 mg L<sup>-1</sup> e as das β-carbônicas de 402 a 3088 mg L<sup>-1</sup>, de 414 a 1816 mg L<sup>-1</sup> e de 45 a 392 mg L<sup>-1</sup> para THH, HME e HML, respectivamente. As menores concentrações encontradas para HML estão de acordo com estudos anteriores, em que as concentrações desta substância também foram menores [1,2]. Curiosamente, nestes mesmos trabalhos, as doses de HME encontradas foram maiores do que as de THH, mas neste estudo isso nem sempre foi verdadeiro, já que em muitas amostras essa relação se inverteu. Verifica-se também que, da mesma forma que para os elementos inorgânicos, há uma grande variação entre as concentrações dos alcaloides.

Considerando um volume de 200 mL de Ayahuasca, as concentrações mínimas e máximas ingeridas seriam as constantes na Tabela 17.

**Tabela 17.** Valores mínimos e máximos de ingestão dos ativos orgânicos, estimando consumo de um volume de 200 mL de Ayahuasca

<b>Quantidades ingeridas com Ayahuasca (mg)</b>		
<b>Ativo</b>	<b>Mínima</b>	<b>Máxima</b>
DMT	12,4	68,0
Tetraidro-harmina	80,4	617,6
Harmina	82,8	363,2
Harmalina	9,0	78,4

Em administração por via parenteral, a DMT apresentou atividade psicoativa em doses de 0,2 a 0,4 mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo [16,52], o que corresponde a uma dose mínima de 14 a 28 mg em uma pessoa de 70 kg.

Algumas amostras apresentaram concentração inferior a este limiar (amostras 2, 3, 5, 10 e 15). No entanto, deve-se ressaltar que, neste trabalho, essa estimativa foi realizada para uma pessoa de 70 kg ingerindo um volume de 200 mL, mas esta dosagem poderia ser modificada no sentido de atingir o efeito desejado. Além disso, essa concentração limiar para atividade foi relatada para administração por via parenteral, sendo que por via oral o efeito sinérgico com as  $\beta$ -carbonilas não pode ser esquecido. Por fim, é possível também que o efeito antidepressivo poderia estar ocorrendo abaixo desse limiar, já que estes estudos focaram no aparecimento dos sintomas físicos e psicoativos, e não na atividade antidepressiva propriamente dita. Todas estas possibilidades requerem maior número de estudos clínicos para melhor avaliação.

Com relação às  $\beta$ -carbonilas, as doses presentes na bebida estão muito abaixo do limiar de sua atividade alucinógena, quando administradas individualmente [4]. No entanto, como já mencionado, a principal função destas na Ayahuasca é permitir a ação da DMT através da inibição das MAOs. Este efeito é observado a partir da ingestão da bebida Ayahuasca contendo  $\beta$ -carbonilas numa concentração suficiente para permitir uma dose de 1,0 mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo de harmalina e 1,5 mg kg<sup>-1</sup> de harmina [53], o que corresponde a 70 e 105 mg em uma pessoa de 70 kg, respectivamente.

Observa-se que para a harmalina, considerando-se ingestão de 200 mL, todas as amostras apresentaram quantidade inferior ao limiar para inibição das MAOs. Para a harmina, apenas as amostras 16 e 18 apresentam concentração

inferior ao limiar de atividade. Já para a tetraidro-harmina, não foram encontrados estudos indicando concentração mínima para inibição das MAOs, mas, considerando seu limiar para psicoatividade, verifica-se que ela é menos ativa que a harmina [53], de tal modo que o seu limiar para inibição das MAOs deve ser um pouco inferior a  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ . Sendo assim, apenas a amostra 5 apresenta quantidade inferior. Esses dados permitem concluir que a atividade de inibição das MAOs nestas amostras é devido à presença de HME e THH, sendo que HML contribui pouco, se considerada individualmente.

#### 4.7.2. Avaliação de efeitos sinérgicos e antagônicos entre ativos orgânicos e inorgânicos

##### 4.7.2.1. Alumínio

O alumínio é um elemento que tem efeito cumulativo no organismo. O principal carregador de Al no plasma é a transferrina, uma proteína transportadora de Fe, através da qual, após a sua absorção, o Al se distribui para os tecidos, acumulando-se principalmente nos ossos e podendo alcançar o cérebro [48]. Algumas investigações relataram a presença do Al no tecido cerebral, permitindo supor que o Al contribui para a progressão da Doença de Alzheimer [48,54], doença degenerativa relacionada à idade e caracterizada por uma perda progressiva de memória, declínio na capacidade e deficiências cognitivas [54].

Não foram encontrados estudos relacionando a depressão com deficiência ou exposição a Al. Contudo, como ele parece ser uma componente importante no desenvolvimento da doença de Alzheimer, e essa doença afeta funções cognitivas, é possível imaginar que a presença desse elemento na Ayahuasca provocaria efeitos antagônicos. Isso só ocorreria em doses acima do recomendado, o que não é o caso destas amostras.

##### 4.7.2.2. Cálcio

No sistema nervoso central, o cálcio é necessário para o funcionamento normal dos neurônios, incluindo sinalização intracelular e liberação de neurotransmissores. Uma possível causa para os transtornos afetivos se deve a um influxo de Ca para dentro das células, o que pode ser explicado pelo fato de Ca e

Mg competirem pelos mesmos sítios de ligação, de modo que uma deficiência de Mg ou uma alta ingestão de Ca (e baixa de Mg) permitiria a entrada do primeiro no citosol [55].

Como, ao que tudo indica, as ações dos dois elementos se antagonizam, uma abundância de Ca impediria a absorção de Mg [50] e há fortes evidências de que uma deficiência deste pode estar relacionada aos sintomas da depressão. Além disso, Konopka, Cooper e Crayton (1996) demonstraram que os níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular se encontravam muito mais elevados em pacientes deprimidos do que em indivíduos saudáveis [56]. Um mecanismo que impeça esse influxo de Ca para dentro das células, como é o caso de fármacos bloqueadores dos canais de Ca, poderia ter efeito antidepressivo [50].

Desse modo, é possível que a presença de Ca na Ayahuasca provoque um efeito antagônico, diminuindo seu potencial antidepressivo, principalmente nas amostras com maior concentração do elemento. Ao se avaliar a Tabela 14, entretanto, verifica-se que os níveis de Ca estão muito abaixo dos valores diários recomendados, de tal modo que, é razoável supor, esse antagonismo não ocorreria no caso destas amostras.

Além disso, a bebida contém tanto Ca como Mg, portanto, é de se esperar também um efeito antagônico entre estes, em que o Ca bloquearia a absorção do Mg. Nestes casos, talvez a melhor combinação na Ayahuasca fosse: alta concentração dos ativos orgânicos e Mg e baixa concentração de Ca. Como se vê, as relações entre estes elementos são complexas e, evidentemente, necessita de maiores estudos.

#### 4.7.2.3. Cobalto

O cobalto é constituinte da vitamina B12, também chamada de cobalamina, essencial ao funcionamento normal do cérebro e do sistema nervoso [57]. No estudo de Lopez *et al.* (2016) [58], a deficiência de cobalto provocou o aparecimento de sintomas depressivos, o que é um indício de que este elemento também está envolvido nos mecanismos da depressão, embora a literatura a esse respeito seja escassa. Este dado é corroborado em um estudo em que os níveis plasmáticos de Co foram estudados em pacientes com depressão e em grupos controle, observando-se que os níveis deste elemento no plasma dos pacientes depressivos estavam menores quando comparados ao segundo grupo. Notaram

ainda que, nos pacientes recuperados, os níveis estavam significativamente maiores em comparação aos níveis encontrados em pacientes deprimidos, indicando que o nível plasmático de Co aumentou após a recuperação da depressão [59].

Este estudo indica que, possivelmente, uma deficiência de Co poderia levar ao aparecimento de sintomas depressivos, de modo que podemos supor que a presença deste na Ayahuasca levaria a um efeito sinérgico, melhorando as suas propriedades, no sentido de fornecer quantidades deste elemento. Todas as amostras estudadas apresentaram níveis de Co superiores à ingestão diária recomendada, de modo que, ao ser ingerida a cada 15 dias, contribuiria para impedir a deficiência.

#### 4.7.2.4. Cobre

O interesse no papel do cobre na depressão não é difundido, embora este elemento seja um importante componente de enzimas que estão envolvidas na fisiopatologia da depressão. Alterações imunológicas que ocorrem durante a fase aguda da depressão são caracterizadas por um aumento da síntese de ceruloplasmina [60], proteína responsável por carregar mais de 90 % do cobre sérico.

De fato, a concentração de Cu no soro e no plasma de pacientes depressivos foi relatada como significativamente maior (em 21 %) do que no grupo controle, mesmo em pacientes submetidos a tratamentos antidepressivos eficazes. Desse modo, sugere-se que este elemento é um "marcador de características" (permanece constante, independentemente do tratamento bem-sucedido) da depressão unipolar [61].

No tocante à sua interação com os ativos orgânicos presentes na Ayahuasca, não parece haver qualquer tipo de interação.

#### 4.7.2.5. Ferro

O ferro é um elemento essencial para diversas funções cerebrais, como produção de energia, síntese e reparo de DNA, metabolismo fosfolipídico, mielinização, oxigenação do parênquima cerebral e produção e oxigenação de neurotransmissores [62,63]. Devido a essa grande quantidade de funções cerebrais, diversos distúrbios neurológicos são associados a uma desregulação do

metabolismo de Fe no cérebro, assim como esclerose múltipla e Doença de Parkinson [49].

De importância para a depressão, está o fato de que o Fe está envolvido na produção e oxigenação dos neurotransmissores serotonina e dopamina. Desse modo, a sua deficiência pode resultar na degradação destes neurotransmissores [64], levando ao aparecimento ou agravamento dos sintomas depressivos. Esta hipótese foi corroborada em estudos clínicos que evidenciaram uma associação entre depressão, transtornos de ansiedade e transtorno bipolar, entre outros, com a deficiência de Fe [65,66].

Nesse sentido, amostras com alto conteúdo deste elemento poderiam apresentar um efeito sinérgico, aumentando as propriedades antidepressivas da Ayahuasca. A mesma analogia pode ser feita com as amostras onde a concentração de DMT está abaixo do limiar para atividade. Como todas elas contêm Fe, os efeitos antidepressivos podem ser maiores do que na ausência deste elemento.

#### 4.7.2.6. Lítio

O lítio é amplamente utilizado para o tratamento de transtorno bipolar desde as décadas de 1950 e 1960. Suas propriedades terapêuticas foram descobertas em 1949, após uma observação de sedação acidental em porquinhos da Índia [67]. Mais recentemente, na década de 1980, as potencialidades do Li para o tratamento de depressão também começaram a ser estudadas [68]. Seu mecanismo de ação, entretanto, ainda não é completamente conhecido, mas no caso da depressão, é provável que o alívio dos sintomas é resultado da atuação do Li no sistema serotoninérgico [69].

Muitos antidepressivos têm um início tardio de ação e é possível que o Li poderia ser usado para acelerar a resposta. No entanto, tem havido relatos conflitantes sobre sua atuação: produção de um efeito sinérgico quando utilizado em adição aos antidepressivos clássicos ou maior efetividade em casos em que os pacientes não responderam ao tratamento inicial com antidepressivo. Nestes casos, as doses empregadas foram de 300 a 1200 mg/dia [50].

Deste modo, há uma possibilidade de ação sinérgica do Li com a Ayahuasca. No entanto, as concentrações de Li nas amostras estão muito abaixo desta concentração necessária para a atividade antidepressiva relatada, de tal modo que não é possível avaliar a existência desse efeito.

#### 4.7.2.7. Magnésio

O magnésio é um elemento essencial para a homeostase fisiológica. É cofator de aproximadamente 300 enzimas e está envolvido na produção de ATP, ácidos nucleicos e proteínas. Este papel está relacionado à sua habilidade para formar quelatos com importantes ligantes aniônicos intracelulares, como o ATP, e sua capacidade de competir com o cálcio por sítios de ligação em proteínas e membranas [70]. Além disso, é um importante modulador dos receptores para GABA, de tal modo que não é de surpreender que a sua deficiência tenha sido associada a sintomas de depressão, comportamento suicida e ansiedade [71].

O tratamento com doses de 125 a 300 mg de taurinato e glicinato de magnésio aliviaram todos os sintomas desses transtornos, enquanto que pequenas doses de alguns antidepressivos clássicos que atuam como antagonistas dos receptores para GABA, ao serem administrados individualmente em ratos, não foram capazes de provocar diminuição dos efeitos depressivos e de ansiedade. No entanto, quando administrados juntamente com Mg, provocaram uma redução nestes sintomas [50].

Nesse último caso, percebe-se claramente que há uma interação sinérgica entre o Mg e alguns antidepressivos. Este dado fornece evidências de que doses menores de antidepressivos poderiam ser empregadas combinadas com Mg, diminuindo os efeitos colaterais dos tratamentos antidepressivos convencionais. No caso das amostras de Ayahuasca é ainda mais interessante, pois o Mg já está naturalmente presente na bebida, não sendo necessária a sua adição. Nas amostras em que a concentração de DMT é inferior ao limiar para atividade psicotrópica, este mesmo efeito sinérgico é possível de ocorrer. A maior intensidade seria observada nas amostras 2 e 3, que apresentam uma concentração de Mg, em um volume de 200 mL, superiores a dose de 125 mg.

#### 4.7.2.8. Manganês

O manganês é um elemento essencial para o organismo de mamíferos, sendo responsável, entre outras funções, por modular a ação de neurotransmissores. Em excesso, porém, pode desencadear efeitos neurotóxicos, sendo que essa toxicidade está relacionada ao fato de que ele é capaz de aumentar

a produção de espécies reativas de oxigênio e induzir a auto-oxidação da dopamina. A maioria dos estudos diz respeito à intoxicação por altas doses de Mn, e, neste caso, tem-se relatado que pode provocar alterações na homeostase da dopamina, além de danos motores [72]. Além disso, sua deficiência ou excesso pode causar sintomas de transtorno depressivo [73].

Em estudos conduzidos em ratos, os animais nos quais foram administrados excesso de Mn apresentaram comportamento depressivo, além de ter sido observada uma perda de neurônios dopaminérgicos [72]. Em humanos, há dados que indicam também o envolvimento do Mn na depressão. Abdalian *et al.* (2013) [74], por exemplo, investigaram pacientes com nutrição via parenteral que incluía suplementação de Mn, sendo que 66 % dos pacientes relataram vários distúrbios mentais, incluindo depressão. Por outro lado, uma dieta deficiente em Mn também pode resultar em sintomas depressivos, como foi observado em um estudo em que a ingestão de Mn foi menor nos participantes com sintomas depressivos do que no grupo com sintomas não depressivos [58].

Estes dados indicam que o Mn tanto pode apresentar efeito sinérgico com a Ayahuasca, contribuindo para a diminuição dos sintomas depressivos em pacientes que, eventualmente, poderiam ter deficiência na ingestão desse elemento, como também efeito antagônico, sobretudo nas amostras em que a sua concentração está acima do limite tolerável de ingestão, como é o caso da amostra 13.

#### 4.7.2.9. Metais pesados

Análises realizadas em fluidos de pacientes com transtorno bipolar mostraram um aumento dos níveis de chumbo e cádmio, de modo que foi sugerido que este transtorno poderia refletir uma alta exposição ao Pb em algum momento da infância ou adolescência dos pacientes [75]. Deste modo, a redução específica dos níveis de Pb no sangue em pacientes poderia contribuir para uma melhora dos sintomas [76].

Portanto, além de apresentarem alta toxicidade a diversos órgãos e ao sistema nervoso, principalmente através do aumento do estresse oxidativo [77], motivo pelo qual as suas concentrações em fitoterápicos devem ser controladas [46], ainda representam um fator de risco a transtornos psicológicos, de tal modo que poderiam apresentar efeito antagônico com a bebida Ayahuasca. Considerando que

as concentrações encontradas estão dentro do recomendado, como visto na seção anterior, este efeito não ocorreria ao se consumir a bebida.

#### 4.7.2.10. Zinco

Dentre os íons metálicos, o zinco parece desempenhar papel de destaque nos mecanismos da depressão. Estudos clínicos indicaram baixos níveis de Zn no soro de pacientes depressivos que, após tratamento com antidepressivos convencionais voltaram aos valores normais [78]. Além disso, a alimentação deficiente em Zn contribuiu para o desenvolvimento de comportamento antidepressivo em modelos animais [79], o que demonstra a importância desse elemento nesse transtorno.

No entanto, talvez o dado mais interessante seja o fato de que a deficiência de Zn prejudicou a eficácia de antidepressivos que atuam com diferentes mecanismos [79,80]. Este dado, aliado ao fato de que a suplementação com zinco reduziu os *scores* da escala Hamilton de depressão se comparado ao tratamento somente com antidepressivo convencional [81], sugere uma interação sinérgica entre este elemento e os antidepressivos clássicos. Portanto, ao se consumir a Ayahuasca como antidepressivo, uma vez que a DMT presente na bebida age de maneira similar aos antidepressivos convencionais, é de se supor que esse mesmo tipo de interação poderia ocorrer.

Na seção anterior foi explicitado que as amostras 2, 3, 5, 10 e 15 apresentam uma concentração de DMT abaixo do limiar para atividade psicotrópica. Estas mesmas amostras apresentam concentrações de Zn que variam de 6,7 a 15,7 mg L<sup>-1</sup>. Neste caso, pode ser possível uma interação sinérgica, de tal modo que as amostras teriam seu potencial antidepressivo melhorado pela presença do Zn.

Um resumo de todas as hipóteses a respeito das interações sinérgicas e antagônicas sugeridas se encontra na Tabela 18.

**Tabela 18.** Resumo das interações possíveis entre Ayahuasca e os elementos inorgânicos

Elemento	Sinergismo	Antagonismo	Dose na Ayahuasca é efetiva?
Al		x	não
Ca		x	não
Co	x		sim
Cu	-	-	não se aplica
Fe	x		sim
Li	x		não
Mg	x		sim (amostras 2 e 3)
Mn	x	x	sim
Pb		x	não
Zn	x		sim

A partir desta tabela, podemos verificar rapidamente que, levando em consideração as doses mínimas necessárias para o efeito (quando estes dados estão disponíveis), somente com relação aos elementos Co, Fe, Mg, Mn e Zn o efeito sinérgico ou antagônico pode, efetivamente, ocorrer.

Em todos estes casos, os efeitos mencionados são hipóteses baseadas no envolvimento destes elementos em transtornos psiquiátricos e neurodegenerativos. No entanto, para conclusões mais detalhadas e com menor margem de erros, são necessários mais estudos clínicos para sua comprovação, que poderiam esclarecer os mecanismos que regulam essas interações e comprovar a sua efetividade.

## 5. CONCLUSÕES

O emprego dos instrumentos ICP OES e ICP-MS mostrou-se adequado para a determinação dos elementos em amostras de Ayahuasca, tendo sido necessário o emprego do método de preparo de amostras por decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas devido ao alto conteúdo de matéria orgânica da amostra.

Embora tenha sido empregado o Rh para avaliação da eficiência das decomposições, os resultados foram considerados como indicativo apenas. Para conclusões a respeito de cada elemento foram necessárias adições e recuperações em três níveis de recuperação, sendo que o resultado foi utilizado também como estimativa da exatidão dos métodos. Após determinações das demais figuras de mérito, os métodos otimizados foram considerados adequados e empregados para a determinação do conteúdo total elementar nas amostras de Ayahuasca.

A determinação do conteúdo total nas amostras permitiu verificar que todas elas apresentaram grande concentração dos macroelementos Ca, Mg, K e P e, com relação aos microelementos, as maiores concentrações encontradas foram para Mn, Zn, Al, Ba e Fe. Embora algumas amostras apresentem doses acima do recomendado por órgãos de controle, deve-se considerar que a ingestão da bebida seria realizada a cada 15 dias, diminuindo o risco. Além disso, não foram encontrados níveis de metais pesados potencialmente tóxicos acima do permitido para potenciais fitoterápicos. Portanto, com relação ao conteúdo total dos elementos estudados, a bebida Ayahuasca se apresenta com níveis seguros de administração em todas as amostras determinadas.

Observou-se grande variabilidade no conteúdo total dos elementos entre as amostras. Após análise multivariada em que foram empregados os métodos de reconhecimento de padrões PCA e PLS-DA, conclui-se que estas variações não permitem formação de agrupamentos por região de origem das plantas e são provavelmente decorrentes de variações aleatórias durante o preparo da bebida. Considerando as características do preparo da bebida, que ocorre de modo artesanal, esta conclusão é muito plausível.

A avaliação dos potenciais efeitos psicoterapêuticos da Ayahuasca com relação aos elementos inorgânicos mostrou que Co, Fe, Li, Mg e Zn podem apresentar efeitos sinérgicos com os ativos orgânicos, contribuindo para um aumento na sua atividade psicoativa, principalmente nas amostras em que o

conteúdo destes é mais baixo. Já Al, Ca e Pb podem apresentar efeito antagônico. Com relação ao Mn, tanto pode apresentar efeito sinérgico como antagônico, dependendo da dose presente na bebida.

Nas amostras estudadas, levando-se em consideração as doses mínimas necessárias para o efeito, somente com relação aos elementos Co, Fe, Mg, Mn e Zn o efeito sinérgico ou antagônico pode, efetivamente, ocorrer. Os demais elementos apresentaram-se em doses menores do que o necessário para psicoatividade ou, quando este dado não estava disponível, menores do que o recomendado para ingestão diária. Deve-se ressaltar que todos estes dados são hipóteses baseadas na literatura, sendo necessários mais estudos clínicos para comprovação.

Este trabalho procurou fornecer mais informações a respeito da composição da Ayahuasca, bem como das possíveis interações que possam ocorrer entre os ativos orgânicos e as espécies inorgânicas. Como perspectivas futuras, a avaliação de um maior número de amostras seria interessante, a fim de determinar regiões que fornecem bebida com maior potencial antidepressivo, o que não foi possível neste estudo. Além disso, uma vez que ficou evidente que o modo de preparo afetou de maneira muito significativa os resultados, talvez esse estudo possa abrir novos horizontes, como a permissão para o preparo em laboratórios acadêmicos, o que muito contribuiria para o conhecimento científico. No que tange ao conhecimento do conteúdo inorgânico, bem como do seu benefício no tratamento da depressão, juntamente aos ativos orgânicos, este trabalho pode trazer novas possibilidades para o emprego da Ayahuasca no tratamento desse transtorno.

## REFERÊNCIAS

- [1] CALLAWAY, J.C, GROB, C. S. Ayahuasca preparations and serotonin reuptake inhibitors: a potential combination for severe adverse interactions. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 30, n.4, p.367-369, 1998.
- [2] MCKENNA, D.J., TOWERS, G. H.N, ABBOTT, F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: tryptamine and  $\beta$ -carboline constituents of Ayahuasca. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, p. 195-223, 1984.
- [3] LABATE, B.C.; A reinvenção do uso da ayahuasca nos centros urbanos. **Mercado das Letras/FAPESP**, 2004.
- [4] PIRES, A.P.S., OLIVEIRA, C.D.R., YONAMINE, M. Ayahuasca: uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.1, p.15-23, 2010.
- [5] MCKENNA, D.J. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, v.102, p.111-129, 2004.
- [6] SZEWCZYK, B., *et al.* The involvement of serotonergic system in the antidepressant effect of zinc in the forced swim test. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.33, n.2, p. 323–9, 2009.
- [7] BOUSO, J.C. *et al.* Personality, psychopathology, life attitudes and neuropsychological performance among ritual users of ayahuasca: a longitudinal study. **PLoS One**, v.7, n.8, p.42421, 2012.
- [8] BRASIL. Resolução nº 4 - Conselho nacional antidrogas, 4 de novembro de 2004. Disponível em: <https://www.diariodasleis.com.br/legislacao/federal/66172-dispoe-sobre-o-uso-religioso-e-sobre-a-pesquisa-da-ayahuasca.html>. Acesso em janeiro/2018.

[9] OSORIO, F.L.; SANCHES, R.F.; MACEDO, L.R. Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: a preliminary report. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.37, p.13-20, 2015.

[10] World Health Organization. Depression: A Global Public Health Concern, **WHO**, Geneva, Switzerland, 2012.

Disponível em:

[http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/who\\_paper\\_depression\\_wfmh\\_2012.pdf](http://www.who.int/mental_health/management/depression/who_paper_depression_wfmh_2012.pdf). Acesso em abril/2018.

[11] BRIGITTA, B. Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 7-18, 2002.

[12] CROARKIN, P. E.; LEVINSON, A. J.; DASKALAKIS, Z. J. Evidence for GABAergic inhibitory deficits in major depressive disorder. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.35, n.3, p. 818 - 825, 2010.

[13] PACHER, P., KECSKEMETI, V. Trends in the development of new antidepressants. Is there a light at the end of the tunnel? **Current Medicinal Chemistry**, v.11, p. 925-943, 2004.

[14] DOMÍNGUES-CLAVÉ, E., *et al.* Ayahuasca: Pharmacology, neuroscience and therapeutic potential. **Brain Research Bulletin**, v. 26, p. 89 - 101, 2016.

[15] MORENO, R. A. *et al.* Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 24-40, 1999.

[16] GROB, C.S, *et al.* Human Psychopharmacology of Hoasca, A Plant Hallucinogen Used in Ritual Context in Brazil. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v.184, n.2, p.86-94, 1996.

[17] PALLADINO, L. **Vine of the soul: A phenomenological study of ayahuasca and its effect on depression**. Tese de doutorado, Pacifica Graduate Institute, 2009.

- [18] BARBOSA, P. C. *et al.* Health status of ayahuasca users. **Drug Test and Analyses**, v.4, p.601-609, 2012.
- [19] World Health Organization. Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. **WHO**, Geneva, Switzerland, 2007.  
Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s14878e/s14878e.pdf>  
Acesso em abril/2018.
- [20] S. BAS, GEL, S.B. ERDEMOĞLU. Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey. **Science of the Total Environment**, v.359, p. 82– 89, 2006.
- [21] CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.
- [22] GOYER R.A. Toxic and essential metal interactions. **Annual Review of Nutrition**, v.17, p. 37–50, 1997.
- [23] TOKALIOĞ, S. Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by ICP-MS and multivariate analysis. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2504–2508, 2012.
- [24] IVA, J. C. *et al.* Elemental characterisation of the medical plant *Alchemilla velebitica*. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 3, p. 274–278, 2015.
- [25] PYTLAKOWSKA, K., *et al.* Multi-element analysis of mineral and trace elements in medicinal herbs and their infusions. **Food Chemistry**, v.135, p. 494–501, 2012.
- [26] BROEKAERT, J.A.C. **Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas**. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.
- [27] FASSEL, V. A. Quantitative Elemental Analyses by Plasma Emission Spectroscopy. **Science**, v. 202, n. 4364, p. 183-191, 1978.

[28] SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução de Marco Tadeu Grassi. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

[29] THOMAS, R. **Practical Guide to ICP-MS: A tutorial for Beginners**. 2. ed. New York: CRC Press, 2008.

[30] [77] FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas: Editora da Unicamp, 2015.

[31] BRAGA, J. W. B., POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, v. 27, n.6, p. 1004-1011, 2004.

[32] PEREIRA, P.C.S. *et al.* A quimiometria nos cursos de graduação em química: proposta do uso da análise multivariada na determinação de pKa. **Química Nova**, v. 37, n. 8, p. 1417-1425, 2014.

[33] SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento Didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012.

[34] WORLEY, B., POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Current Metabolomics**, v.1, n. 1, p. 92–107, 2013.

[35] MEIJA, J., *et al.* Isotopic compositions of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 88, n.3, p. 293 - 306.

[36] INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos**. DOQ-CGCRE-008. Rev. 04, 2011.

[37] RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 2004.

[38] AOAC - Association of Official Agricultural Chemists. **Guidelines for Single Laboratory**, 2002.

[39] ARUMUGAM, R. *et al.* Determination of element contents in herbal drugs: Chemometric Approach. **Food Chemistry**, v.135 p. 2372–2377, 2012.

[40] ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico sobre A Ingestão Diária Recomendada (Idr) de Proteínas, Vitaminas e Minerais**, 2004.

[41] World Health Organization. Guideline: Potassium intake for adults and children, **WHO**, Geneva, Switzerland, 2012.

[42] SCHRAUZER, G. N. Lithium: occurrence, dietary intakes, nutritional essentiality. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 14 – 21, 2002.

[43] [MACPHERSON, A; DIXON, J. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, 2. ed, 2003. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/cobalt>.

Acesso em abril/2018.

[44] Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK222332/>.

Acesso em março/2018.

[45] ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 48**, de 16 de março de 2004. Disponível em:

<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/docs/Resolucao%20RDC%2048%20de%2016032004.PDF>. Acesso em março/2018.

- [46] World Health Organization. Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues, **WHO**, Geneva, Switzerland, 2007.
- [47] Committee on toxicity of chemicals in food, consumer products and the environment, 2006.  
Disponível em:  
[https://cot.food.gov.uk/sites/default/files/finalstatementonarsenic\\_0.pdf](https://cot.food.gov.uk/sites/default/files/finalstatementonarsenic_0.pdf).  
Acesso em março/2018.
- [48] AGUILAR, F. *et al.* Safety of aluminium from dietary intake. **The European Food Safety Authority Journal**, 754, p. 1-34, 2008.
- [49] SUSSULINI, A; HAUSER-DAVIS, R. A. Metallomics applied to the study of neurodegenerative and mental diseases, In: ARRUDA, M.A.Z. (ed.) **Metallomics: The Science of Biometals**, Springer, 2018.
- [50] MŁYNIĘC, K. *et al.* Essential elements in depression and anxiety. Part I. **Pharmacological Reports**, v. 66, p. 534 - 544, 2014.
- [51] SOUZA, R. C. Z. *et al.* Quantification of N,N-Dimethyltryptamine and Harmala Alkaloids in Ayahuasca Samples From São Paulo State. In: 46th World Chemistry Congress, 40<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e IUPAC 49th General Assembly, São Paulo, 2017.
- [52] STRASSMAN, R. J. *et al.* Dose-Response Study of N,N-Dimethyltryptamine in Humans: II. Subjective Effects and Preliminary Results of a New Rating Scale. **American Medical Association**, v. 51, n. 2, p. 98-108, 1994.
- [53] OTT, J. Pharmahuasca: Human Pharmacology of Oral DMT Plus Harmine. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 31, n. 2, p. 171-177, 1999.
- [54] GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M.G. A century of Alzheimer's disease. **Science**, v. 314, p. 777–781, 2006.

[55] SHARMA, A. *et al.* Relationship between serum calcium and neuropsychological performance might indicate etiological heterogeneity underlying cognitive deficits in schizophrenia and depression. **Psychiatry Research**, v. 252, p. 80-86, 2017.

[56] KONOPKA, L, M.; COOPER,R.; CRAYTON, J.W. Serotonin-Induced Increases in Platelet Cytosolic Calcium Concentration in Depressed, Schizophrenic, and Substance Abuse Patients. **Biological Psychiatry**, v. 39, p. 708 - 713, 1996.

[57] Vitamin B12 - Chemistry 2211a "Metals in Life".

Disponível em: <http://instruct.uwo.ca/chemistry/2211a/2211a-VitB12-L26-L27.pdf>.

Acesso em abril/2018.

[58] RUBIO-LÓPEZ, N. *et al.* Nutrient Intake and Depression Symptoms in Spanish Children: The ANIVA Study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 13, n. p. 352, 2016.

[59] NARANG, R.L. *et al.* Plasma Cobalt and Manganese in Depression. **Trace Elements in Medicine**, v. 9, p. 43-44, 1992.

[60] SCHLEGEL-ZAWADZKA, M. *et al.* Serum Trace Elements in Animal Models and Human Depression. Part II. Copper. **Human Psychopharmacology: Clinical & Experimental**, v.14, p. 447 – 451, 1999.

[61] SCHLEGEL-ZAWADZKA, M. *et al.* Is serum copper a "trait marker" of unipolar depression? A preliminary clinical study. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 51, n. 6, p. 535-538, 1999.

[62] DUSEK, P.; JANKOVIC, J.; LE, W. Iron dysregulation in movement disorders. **Neurobiological of Disease**, v. 46, p. 1-18, 2012.

[63] CRICHTON, R.R., *et al.* Brain iron metabolism and its perturbation in neurological diseases. **Journal of Neural Transmission**, v. 118, p. 301–314, 2011.

[64] OSKI, F. A. The Nonhematologic Manifestations of Iron Deficiency. **American Journal of Diseases of Children**, v. 133, n. 3, p. 315 - 322, 1979.

- [65] VAHDAT SHARIATPANAAHI, M. *et al.* The relationship between depression and serum ferritin level. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 4, p. 532–535, 2007.
- [66] YI, S. *et al.* Association between serum ferritin concentrations and depressive symptoms in Japanese municipal employees. **Psychiatry Research**, v.189, n.3, p. 368 - 372, 2011.
- [67] SCHOU, M. *et al.* The treatment of manic psychoses by the administration of lithium salts. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v.17, p. 250, 1954.
- [68] BAUER, M. *et al.* Role of Lithium Augmentation in the Management of Major Depressive Disorder. **CNS Drugs**, v. 28, n. 4, p. 331- 342, 2014.
- [69] NIXON, M. K. *et al.* Additive effects of lithium and antidepressants in the forced swimming test: further evidence for involvement of the serotonergic system. **Psychopharmacology**, v. 115, p. 59 - 64, 1994.
- [70] SWAMINATHAN, R. Magnesium metabolism and its disorders. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 24, n. 2, p. 47 - 66, 2003.
- [71] EBY, G.A.; EBY, K. L. Rapid recovery from major depression using magnesium treatment. **Medical Hypotheses**, v. 67, n. 2, p. 362 - 370, 2006.
- [72] YAMAGATA, A, T. *et al.* Gender influence on manganese induced depression-like behavior and Mn and Fe deposition in different regions of CNS and excretory organs in intraperitoneally exposed rats. **Toxicology**, v. 376, p. 137 – 145.
- [73] SLAWINSKA, K. *et al.* Selenium and manganese in depression – preclinical and clinical studies. **Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences**, v. 30, n. 3, p. 151-155, 2017.

[74] ABDALIAN *et al.* Effects of manganese from a commercial multi-trace element supplement in a population sample of Canadian patients on long-term parenteral nutrition. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 37, n. 4, p. 538 – 543, 2013.

[75] GONZÁLEZ-ESTECHA, M. *et al.* (2011) Trace elements in bipolar disorder. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 25, n.1, p. S78-S83, 2011.

[76] ORISAKWE, O. E. The role of lead and cadmium in psychiatry. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 6, n. 8, p. 370-376, 2014.

[77] GAGAN, F.; DEEPESH, G.; TIWARI, A. Toxicity of lead: A review with recent updates. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 47- 58, 2012.

[78] MAES, M. *et al.* Hypozincemia in depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 31, p. 135 -140, 1994.

[79] MŁYNIĘC, K, *et al.* Time course of zinc deprivation-induced alterations of mice behavior in the forced swim test. **Pharmacology Reports**, v. 64 n. 3, p. 567–75, 2012.

[80] TASSABEHJI, N.M. *et al.* Zinc deficiency induces depression-like symptoms in adult rats. **Physiology & Behavior**, v. 95, n. 3, p. 365–369, 2008.

[81] NOWAK, G. *et al.* Antidepressant-like effects of acute and chronic treatment with zinc in forced swim test and olfactory bulbectomy model in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 61, p. 159 - 164, 2003.