

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

DÉBORA FERNANDES DE ABREU E SILVA

**Aplicação da Espectrometria de Massas com Ionização por *paper spray* na
Diferenciação de Amostras de Ginsengs e Quantificação de Adulterações Usando
Calibração Multivariada**

Belo Horizonte

2014

UFMG/ ICEx/ DQ 1048^a

D. 572^a

DÉBORA FERNANDES DE ABREU E SILVA

**Aplicação da Espectrometria de Massas com Ionização por *paper spray* na
Diferenciação de Amostras de Ginsengs e Quantificação de Adulterações Usando
Calibração Multivariada**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química – Química Analítica.

Belo Horizonte

2014

S586a Silva, Débora Fernandes de Abreu e
2014 Aplicação da Espectrometria de Massas com Ionização
D por paper spray na Diferenciação de Amostras de
Ginsengs e Quantificação de Adulterações Usando
Calibração Multivariada. [manuscrito] / Débora
Fernandes De Abreu e Silva. 2014
[xii], 63p.

Orientador: Evandro Piccin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Ginseng - Dissertação 2. Espectrometria de massas
- Dissertação 3. Calibração Multivariada - Dissertação
4. Química analítica - Dissertação I. Piccin,
Orientador II. Título.

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



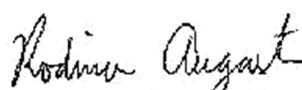
**"Aplicação da Espectrometria de Massas com Ionização por *paper spray* na
Diferenciação de Amostras de Ginsengs e Quantificação de Adulterações
Usando Calibração Multivariada"**

Débora Fernandes de Abreu e Silva

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Evandro Piccin - Orientador
UFMG


Prof. Marcelo Martins de Sena
UFMG


Prof. Rodinei Augusti
UFMG

Belo Horizonte, 21 de novembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por sempre guiar os meus caminhos.

Aos meus pais, exemplos de vida, pelo amor incondicional, pelos ensinamentos e pelo apoio em minhas decisões.

Aos meus irmãos, pela harmoniosa e divertida convivência sempre e especialmente nos últimos 14 anos que moramos juntos em Belo Horizonte.

Ao meu noivo Thomas, pelos maravilhosos momentos que passamos juntos nos últimos 5 anos.

As minhas avós, primos, tios e tias, pelo amor, carinho e lições de vida.

Aos meus amigos, por preencherem minha vida verdadeiramente com alegria, amor, carinho e cumplicidade.

Ao professor Dr. Evandro Piccin, pela boa vontade, dedicação e compromisso nas orientações.

Ao professor Dr. Rodinei Augusti, pelas excelentes aulas ministradas em espectrometria de massas, que muito contribuíram para o meu conhecimento e também pela simpatia e boa vontade em auxiliar nas minhas dúvidas referentes a essa técnica analítica.

Ao CNPq, pela bolsa de pesquisa concedida.

A Priscila, Fernanda, Thaís e Guilherme, pelas palavras de incentivo e carinho.

A Júnia Alves, pela boa vontade e simpatia que demonstrou nos momentos em que contribuiu para o enriquecimento do trabalho.

Aos professores da química, que contribuíram para minha formação.

À UFMG e ao Departamento de química, pelas oportunidades.

Aos funcionários do departamento de química, pela boa vontade e alegria que cuidam do local.

RESUMO

O ginseng é utilizado no mundo inteiro devido às suas propriedades medicinais. Os ginsengs coreano e americano são pertencentes ao gênero *Panax*, enquanto o ginseng brasileiro ao *Pfaffia*. Eles podem apresentar efeitos terapêuticos distintos, já que apresentam componentes químicos diferentes. O ginseng coreano (*Panax ginseng*) e o ginseng Americano (*Panax quinquefolius*) possuem os ginsenosídeos que são responsáveis pelos efeitos terapêuticos da planta medicinal. Estes estão ausentes no ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*), porém suas características fitoquímicas se assemelham às do ginseng coreano.

Nesse trabalho, a diferenciação dessas três espécies de ginseng foi conduzida por espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS). As análises foram executadas com a aplicação direta de 15 µL de extrato de ginseng sobre papel cromatográfico cortado em formato de um triângulo, seguida da aplicação de um potencial de 4,5 kV na base do papel, que estava posicionado na entrada do espectrômetro a uma distância de 7 mm. A diferenciação foi realizada mediante a comparação dos espectros de massas das diferentes espécies de ginseng. Ou seja, pela análise da “impressão digital” (*chemical fingerprint*) das amostras. Os resultados mostraram que na faixa de massas de m/z 100 a 1500, foram observados sinais de íons de m/z 156, 543, 705, 867, 1029 e 1119 somente para as amostras de ginseng brasileiro, o que possibilitou a diferenciação com as amostras pertencentes ao gênero *Panax* (ginsengs coreano e americano). Para a diferenciação das amostras das duas espécies do gênero *Panax* outras faixas foram analisadas, observando sinais de m/z referentes aos ginsenosídeos. Alguns ginsenosídeos foram observados em comum para ambas espécies, tais como Rb_1 e o Rc/Rb_2 . Sinais possivelmente referentes aos ginsenosídeos Ra_3 (de m/z 1263) e Ra_1/Ra_2 (de m/z 1249) foram detectados apenas para a espécie *P. ginseng*. Entretanto, somente nas amostras de ginseng americano, *P. quinquefolius*, foram observados sinais referentes aos ginsenosídeos Rg_1 e Rd . Ainda, nessa última espécie, observou-se que a abundância relativa do íon de m/z 1117 foi bem inferior à do íon de m/z 1147 em todas as amostras, enquanto que para

todas as amostras de ginseng coreano essas intensidades de sinais foram mais próximas.

Além disso, a quantificação de adulteração de ginseng coreano com ginseng brasileiro foi realizada utilizando a calibração multivariada, método dos quadrados mínimos parciais PLS (*Partial Least Squares*), aplicada aos dados obtidos por PS-MS. O modelo foi construído com 55 amostras adulteradas (de 7 a 58% m/m), sendo 39 amostras de calibração e 16 amostras de validação. O modelo apresentou a raiz quadrada dos erros médios de previsão e calibração, RMSEP (*Root Mean Square errors of prediction*) e RMSEC (*Root Mean Square errors of calibration*) iguais a 3,97 e 2,16% m/m, respectivamente. O método foi submetido à validação e se mostrou linear, sensível, com ausência de erros sistemáticos e com Relação de Desempenho do Desvio (RPD) para calibração e validação iguais a 3,9 e 3,5, respectivamente.

Palavras chaves: ginseng, *paper spray*, espectrometria de massas, ionização ambiente, *chemical fingerprint*, calibração multivariada, PLS, análise direta.

ABSTRACT

Application of Paper Spray Mass Spectrometry in the Differentiation of Ginseng Samples and Quantification of Adulteration Using Multivariate Calibration

Ginseng is worldwide consumed due to its medicinal properties. The Korean and American ginsengs belong to the genus *Panax* while the Brazilian to the genus *Pfaffia*. They may have distinct therapeutic effects since they have different chemical components. The Korean ginseng (*Panax ginseng*) and the American ginseng (*Panax quinquefolius*) possess chemical compounds called ginsenosides, whose are responsible for the therapeutic effects of the medicinal plant. These components are absent in the Brazilian ginseng (*Pfaffia paniculata*), although its phytochemical characteristics are similar to those of Korean ginseng.

In this work, the differentiation of these three ginseng species was carried out by paper spray mass spectrometry (PS-MS). The analyzes were performed with the direct application of 15 μL of ginseng extract on a chromatography paper cut into a triangle shape, followed by the application of 4.5 kV potential on the basis of the paper, which was positioned at a distance of 7 mm from the MS inlet. The differentiation was performed by comparing the mass spectra of the different ginseng species, by means of a chemical fingerprint analysis. The results showed that in the mass range of m/z 100-1500, with ions of m/z 156, 543, 705, 867, 1029 and 1119 were only observed for Brazilian ginseng samples, which allowed differentiation with the samples of the genus *Panax* (Korean and American ginsengs). For differentiating samples of the two species of the genus *Panax*, other ranges were analyzed and MS signals related to ginsenosides were detected. Some ginsenosides were observed in common for both species, such as Rb_1 and Rc/Rb_2 . MS signals ascribed to ginsenosides Ra_3 (m/z 1263) and Ra_1/Ra_2 (m/z 1249) were detected only for *P. ginseng* species. In contrast, only in American ginseng samples, *P. quinquefolius*, MS signals ascribed to ginsenosides Rg_1 and Rd were noticed. In addition, in the American ginseng, the relative abundance of the ion m/z 1117 was lower than that the of ion m/z 1147 in all samples, while all the Korean ginseng samples showed these intensities of signals much closer.

Furthermore, quantification of adulteration from Korean ginseng with Brazilian ginseng was carried out using multivariate calibration, Partial Least Squares (PLS), with the data obtained by PS-MS. The model was built with 55 adulterated samples (7-58% w/w), split in 39 and 16 samples for calibration and validation sets, respectively. The model showed root mean square errors of prediction (RMSEP) and of calibration (RMSEC) of 3.97 and 2.16% w/w, respectively. The method was validated and it was linear, sensitive, unbiased and showed a Residual Prediction Deviation (RPD) for calibration and validation of 3.9 and 3.5, respectively.

Keywords: ginseng, paper spray, mass spectrometry, ambient ionization, chemical fingerprint, multivariate calibration, PLS, direct analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Desenho esquemático dos componentes do espectrômetro de massas. (Adaptado de HOFFMAN; STROOBANT, 2007).....	2
Figura 1.2 - Representação esquemática do mecanismo de ionização eletrospray. (Adaptado de BANERJEE; MAZUMDAR, 2011).	6
Figura 1.3 – Desenho esquemático de um típico experimento utilizando a PS-MS (Adaptado de MANICKE <i>et al.</i> , 2011).....	7
Figura 1.4 – Representação esquemática de um experimento de análise de DBS usando a PS-MS (Adaptado de MANICKE <i>et al.</i> , 2011).....	9
Figura 1.5 – Análise por PS-MS com a secagem da amostra no papel e posterior aplicação de eluente (Adaptado de DENG; YANG, 2013).	10
Figura 1.6 – Estruturas químicas dos ginsenosídeos. (Adaptado de FUZZATI <i>et al.</i> , 1999).	14
Figura 3.1 – Conector elétrico de cobre do tipo jacaré fixado em uma lâmina de vidro com auxílio de fita adesiva. Sistema utilizado para aplicação do potencial da ionização por <i>paper spray</i>	28
Figura 3.2 – Circuito eletrônico que possibilitou o funcionamento do equipamento na ausência da fonte comercial ESI.....	28
Figura 3.3 – Fotografia da fonte <i>paper spray</i> acoplada ao espectrômetro de massas (visão ampla).....	29
Figura 3.4 – Fotografia da fonte de ionização por <i>paper spray</i> posicionada na entrada do espectrômetro de massas (visão aproximada).....	30
Figura 3.5 – Extratos de ginseng após a centrifugação: a) ginseng coreano – amostra G; b) ginseng americano – amostra D; c) ginseng brasileiro – amostra C.	32
Figura 4.1 – Espectro de massas para o ginseng coreano na faixa de m/z 1000 a 1500, após todas as condições otimizadas.....	37

Figura 4.2 – Espectros de massas obtidos por PS-MS no modo positivo para amostras de ginsengs na faixa de m/z entre 100 a 1500. Ginsengs brasileiros (A-C); ginsengs americanos (D-F); ginsengs coreanos (G-H).	41
Figura 4.3 – Espectros obtidos por PS-MS na faixa de m/z entre 1000 e 1500: a) <i>P. paniculata</i> (brasileiro) – amostra A; b) <i>P. quinquefolius</i> (americano) – amostra E; c) <i>P. ginseng</i> (coreano) – amostra G.....	42
Figura 4.4 – Espectros de ginsengs brasileiros na faixa de 1000 a 1500: (a) amostra A, (b) amostra B, (c) amostra C.....	45
Figura 4.5 – Espectro obtido por PS-MS de uma amostra de ginseng comercializada pela internet como sendo coreano, registrado na faixa de 100 a 1500. Em vermelho, foram selecionados os principais íons de m/z , que caracterizam ginseng brasileiro e, portanto, a adulteração da amostra.....	46
Figura 4.6 - Espectros de massa obtidos por PS-MS na faixa de m/z 100 a 1000 para amostras adulteradas: a) adulteração de 7% m/m, b) adulteração de 38 % m/m. Os íons característicos do ginseng brasileiro estão destacados em vermelho.....	48
Figura 4.7 – Gráfico de valores de referência <i>versus</i> valores preditos obtidos pelo modelo PLS com os dados de PS-MS na adulteração de ginseng coreano com ginseng brasileiro.....	50
Figura 4.8 – Gráfico de distribuição normal dos resíduos, em que eles se aproximam do ajuste de uma linha reta.	52
Figura 4.9 – Gráfico de erros relativos para amostras individuais do conjunto de validação.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados detalhados em relação a todas as amostras de ginseng utilizadas neste trabalho.	31
Tabela 2 - Variáveis estudadas no processo de otimização da análise PS-MS e seus respectivos níveis.....	33
Tabela 3 – Valores de adulteração de ginseng coreano com ginseng brasileiro. Quantidades totais, quantidades teóricas a serem pesadas e quantidades reais pesadas de ginseng brasileiro e coreano.....	34
Tabela 4 – Ginsenosídeos encontrados nas amostras de ginsengs do gênero <i>Panax</i> estudadas nesse trabalho e suas razões massa-carga, m/z, para os adutos de sódio e potássio (KITE <i>et al.</i> , 2003; LAI <i>et al.</i> , 2012. LIGOR; LUDWICKZUK; BUSZEWSKI, 2005).....	43
Tabela 5 – Sinais relacionados aos ginsenosídeos observados para as amostras de ginseng brasileiro, coreano e americano.....	44
Tabela 6 – Otimização do modelo por meio de detecção de <i>outliers</i>	49
Tabela 7 – Parâmetros estimados para o modelo PLS obtido com os dados de PS(+)-MS para amostras de ginseng coreano adulteradas com ginseng brasileiro	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BH – Belo Horizonte

BF- Brown-Forsythe

CA - Califórnia

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

DBS - *Dried blood spot*

DESI – *Desorption electrospray ionization*

DPR – Desvio Padrão Relativo

DW – Durbin-Watson

EASI – *Easy ambient sonic-spray ionization*

ELDI - *Electrospray assisted laser desorption/ionization*

ESI – Ionização por eletrospray (*electrospray ionization*)

FdM – Figuras de mérito

FULL SCAN – Varredura total de íons

ICS – Sociedade Internacional de Quimiometria (*International Chemometrics Society*)

LTDA - limitada

m/z – Razão massa sobre carga

MALDI – *Matrix assisted laser desorption/ionization*

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MLR – Regressão Linear Múltipla (Multiple Linear Regression)

MS – Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry*)

NAS – Sinal Analítico Líquido (*Net Analyte Signal*)

NL – Número total de íons dentro do íon trap

PCA – Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*)

PCR – Regressão por componentes principais (*Principal Component Regression*)

PLS – Quadrados Mínimos Parciais (*Partial Least Squares*)

PS – *Paper spray*

RJ - Ryan-Joneir

RMSEC – Raiz quadrada do erro médio de calibração (*Root Mean Square Error of Calibration*)

RMSECV – Raiz quadrada do erro médio de validação cruzada (*Root Mean Square Error of Cross Validation*)

RMSEP - Raiz quadrada do erro médio de previsão (*Root Mean Square Error of Prediction*)

RPD - Relação de Desempenho do Desvio

SP – São Paulo

USA – Estados Unidos da América (*United States of America*)

UK – Reino Unido (*United Kingdom of Great Britan*)

VL – variáveis latentes

v/v – volume sobre volume

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Espectrometria de massas	1
1.1.1 Analisador <i>Ion Trap</i>	2
1.1.2 Fontes de ionização	3
1.1.2.1 Ionização por <i>Eletrospray</i>	4
1.1.2.2 Ionização por <i>Paper Spray</i> (PS)	6
1.2 Modos de operação e aplicações da ionização por <i>paper spray</i> - PS	8
1.3 Impressão digital química	10
1.4 Substâncias testadas por PS-MS	12
1.4.1 Ginsengs brasileiro, coreano e americano	12
1.5 Quimiometria e calibração multivariada	17
1.5.1 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)	18
1.5.1.1 Detecção de amostras anômalas (<i>outliers</i>)	19
1.5.2 Figuras de mérito (FDM)	20
1.5.2.1 Veracidade	20
1.5.2.2 Precisão	21
1.5.2.3 Linearidade	21
1.5.2.4 Viés (<i>Bias</i>)	22
1.5.2.5 Seletividade	23

1.5.2.6	Sensibilidade	23
1.5.2.7	Sensibilidade analítica (γ).....	24
1.5.2.8	Relação de Desempenho do Desvio, RPD (<i>Residual Prediction Deviation</i>) ...	24
1.5.2.9	Limites de detecção e de quantificação	25
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivos gerais do trabalho.....	26
2.2	Objetivos específicos	26
2.2.1	Montagem de uma fonte de ionização <i>Paper Spray</i>	26
2.2.2	Otimização dos experimentos para análise de ginsengs por PS-MS	26
3	PARTE EXPERIMENTAL	27
3.1	Montagem da fonte de ionização <i>paper spray</i>	27
3.2	Materiais, amostras e reagentes	30
3.3	Preparação dos extratos de ginseng.....	31
3.4	Otimização das condições experimentais para análise dos extratos de ginseng por PS-MS.....	32
3.5	Análise dos extratos de ginseng por PS-MS	33
3.6	Análise de quantificação de adulteração de ginseng coreano com ginseng brasileiro utilizando PS-MS e calibração multivariada	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
4.1	Otimização do procedimento PS-MS para análise dos extratos de ginseng ..	36
4.2	Otimização da preparação dos extratos de ginseng.....	38
4.3	Diferenciação de ginseng brasileiro, coreano e americano por PS-MS	38
4.3.1	Constatação de adulteração em uma das amostras	45
4.4	Quantificação de adulteração de ginseng brasileiro em ginseng coreano utilizando calibração multivariada.....	47

5 CONCLUSÕES	55
6 REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (do inglês *Mass Spectrometry – MS*) é uma das técnicas analíticas mais seletivas e sensíveis, com aplicações em diversas áreas da química e bioquímica (PYREK, 1997). Além disso, ela proporciona informações moleculares altamente específicas, sendo assim, uma poderosa ferramenta para análises de compostos presentes em amostras complexas. Entre as diversas aplicações da MS, citam-se: monitoramentos ambientais, desenvolvimento de drogas, análises forenses, diagnósticos clínicos e análise proteômica (SHEN *et al.*, 2012).

A espectrometria de massas progrediu de maneira extremamente rápida nas últimas décadas. Esse progresso conduziu a novos equipamentos altamente especializados, que aliados a métodos de ionização suaves permitiram a análise de moléculas de alto peso molecular, como por exemplo, proteínas e peptídeos. (HOFFMAN; STROOBANT, 2007; PYREK, 1997)

Nessa técnica analítica, átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados(as) e separados(as) de acordo com suas razões massa-carga (m/z) e, então, detectados(as). Assim, um espectrômetro de massas, mostrado esquematicamente na Figura 1.1, é composto por: entrada (*inlet*) da amostra, onde ela é introduzida para ser analisada; fonte de ionização, que é responsável pela produção de íons na amostra; um ou mais analisadores de massas, que realizam a separação dos íons de acordo com as suas razões massa-carga (m/z); um detector que detecta os íons do último analisador e mede a sua abundância por meio da conversão dos íons em sinais elétricos; e por último um sistema de processamentos de dados (computador) que gera o espectro de massas. Dessa forma, o espectro de massas é o resultado da abundância de um íon *versus* a relação massa carga (m/z). (HOFFMAN; STROOBANT, 2007). Neste trabalho a amostra foi introduzida por inserção direta.

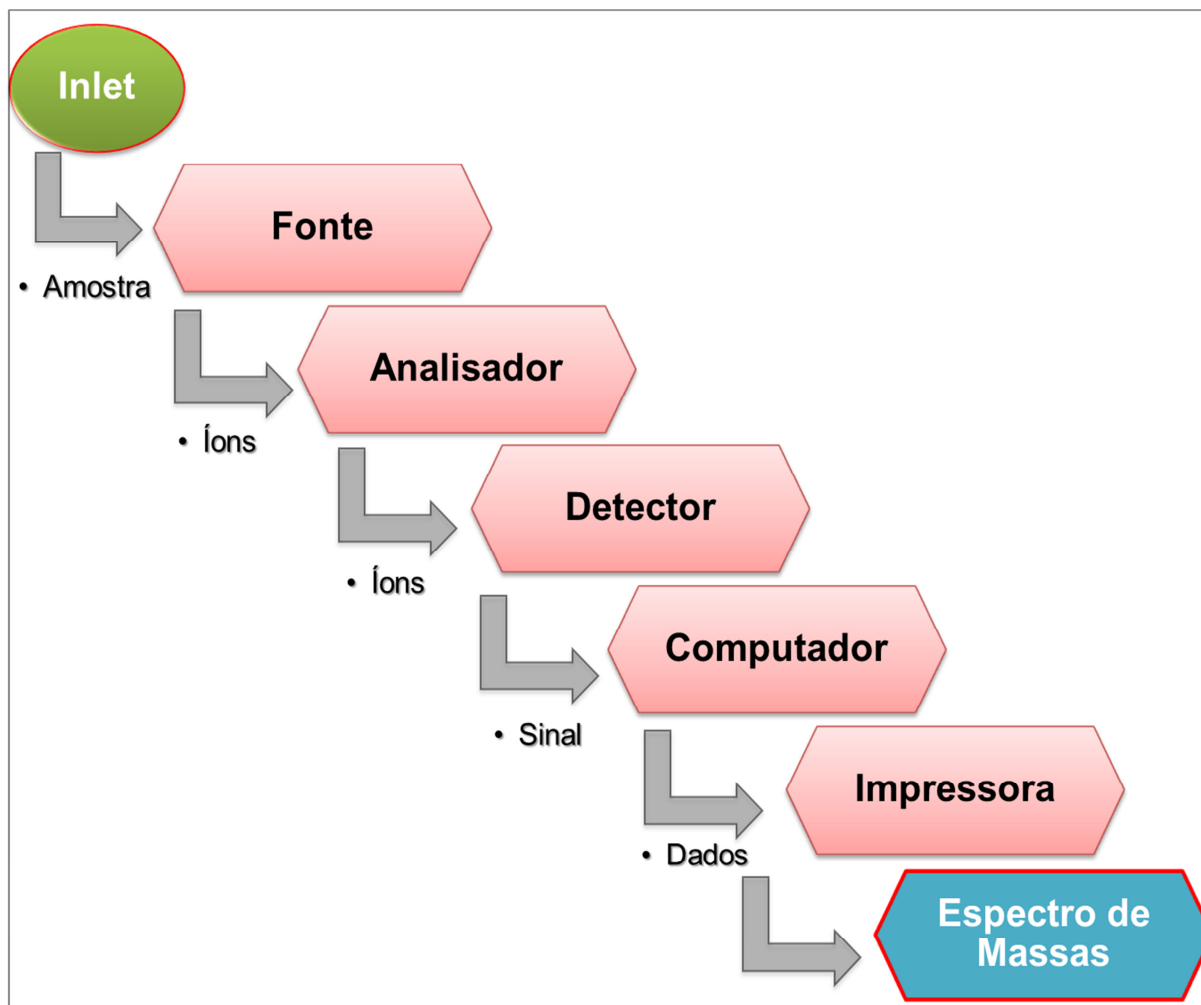


Figura 1.1 – Desenho esquemático dos componentes do espectrômetro de massas. (Adaptado de HOFFMAN; STROOBANT, 2007).

1.1.1 Analisador *Ion Trap*

Os autores Hoffman e Stroobant (2007) descrevem o analisador *ion trap* como um dispositivo que armazena os íons por meio de uma oscilação de campo elétrico. Song *et al.* (2006) ressaltam a capacidade de identificação e quantificação de componentes de alto e baixo peso molecular, até mesmo em misturas complexas desse dispositivo. Além disso, eles destacam também que a grande vantagem desse analisador, que não é muito caro, é a possibilidade da execução de espectrometria de

massas sequencial, permitindo análises mais sensíveis e seletivas. Por esses motivos, o analisador *ion trap* é bastante atrativo.

Descrito em 1960 por Paul e Steinweden (1960 citado por HOFFMAN; STROOBANT, 2007), o analisador *ion trap* foi modificado por Stafford *et al.* (1984) e, então, passou a ser usado em análises por espectrometria de massas. Esse dispositivo é classificado em dois tipos: *ion trap* 3D e *ion trap* 2D (HOFFMAN; STROOBANT, 2007). Os primeiros analisadores *ion trap* desenvolvidos foram os 3D, que são compostos de um eletrodo circular, com duas cápsulas elipsóides na parte superior e inferior, responsáveis pela criação de um campo eletrostático (CHATTOPADHYAY; VERMA.; MOHANTY, 2009; HOFFMAN; STROOBANT, 2007). O princípio que guia este tipo de analisador é que os íons de diferentes massas estão presos dentro do *trap* (dispositivo de aprisionamento dos íons). Esses íons são expelidos de acordo com suas massas pela aplicação de uma frequência de ressonância e, conseqüentemente, o espectro de massas é gerado (HOFFMAN; STROOBANT, 2007).

A execução de todos os experimentos deste trabalho foi feita por meio de um analisador *ion trap* 3D.

1.1.2 Fontes de Ionização

É importante ressaltar que nas análises por MS, os componentes de uma amostra somente podem ser analisados no espectrômetro de massas se forem previamente ionizados. Sendo assim, é fundamental que os íons sejam gerados na amostra e esse processo ocorre na fonte de ionização. Existem várias técnicas de ionização e algumas são altamente energéticas e podem causar fragmentações dos compostos. (HOFFMAN; STROOBANT, 2007).

Os métodos clássicos de ionização, tais como ionização por elétrons e ionização química, são realizados em alto vácuo e, assim, o uso de tais métodos está restrito a compostos voláteis e termicamente estáveis (HOFFMAN; STROOBANT, 2007).

Nos últimos anos, métodos distintos de ionização ambiente foram introduzidos. Eles se diferem de outras técnicas de ionização, pois produzem íons à pressão atmosférica (CHEN; HU; ZHANG, 2010; VENTER *et al.*, 2013). Os autores Chen, Hu e Zhang (2010) se referem à espectrometria de massas ambiente como métodos que são capazes de conduzir à análise, direta, rápida e sem preparo, de amostras reais contidas em matrizes complexas. Esses métodos são mais corretamente interpretados como métodos que não requerem preparo adicional de amostras (VENTER *et al.*, 2013). A vantagem deles é que permitem análises diretas ou em tempo real de moléculas maiores e não voláteis (CHEN; HU; ZHANG, 2010; VENTER *et al.*, 2013). Destacam-se o ESI (*electrospray ionization*) (FENN *et al.*, 1989), DESI (*desorption electrospray ionization*) (TAKATS *et al.*, 2004), MALDI (*Matrix assisted laser desorption/ionization*) (ZENOBI; KNOCHEMNUSS, 1998), EASI (*easy ambient sonic-spray ionization*) (HADDAD *et al.*, 2008) e PS (*Paper Spray*) (WANG *et al.*, 2009).

1.1.2.1 Ionização por *Eletrospray*

A ionização por *eletrospray* (do inglês *Electrospray ionization-ESI*) é um tipo de ionização à pressão ambiente (HOFFMAN; STROOBANT, 2007). Essa fonte de ionização foi desenvolvida por John Fenn e seus colaboradores na década de 70, permitindo que íons na fase gasosa fossem gerados provenientes de espécies em soluções aquosas (MANICKE *et al.*, 2011). Essa técnica de ionização mais suave é caracterizada pela formação de íons mais estáveis e pela ausência de fragmentações (HOFFMAN; STROOBANT, 2007). Dessa forma, esse método foi considerado uma tecnologia transformadora no estudo de biomoléculas, permitindo pesquisas farmacêuticas e proteômicas e contribuindo para o acoplamento da MS à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (MANICKE *et al.*, 2011).

Como discutido por Banerjee e Mazumdar (2011), o processo de transferência de solução para fase gasosa, *via* ESI, pode ser entendido em três etapas principais: a) produção de partículas carregadas quando a alta voltagem é aplicada na ponta do capilar onde a amostra é injetada; b) evaporação contínua do solvente e desintegração

da microgota carregada; c) transferência de íons para a fase gasosa. No instante em que a amostra líquida é bombeada no capilar metálico de alta voltagem, há uma reação eletroquímica do solvente, ocorrendo a migração de íons em solução de acordo com a sua polaridade, ou seja, existe a separação dos íons positivos e negativos (Figura 1.2). Então, as cargas positivas ou negativas na solução são repelidas pela mesma polaridade apresentada pelo capilar onde a alta voltagem é aplicada e, conseqüentemente, seguem em direção à ponta do capilar. Influenciadas por um campo elétrico bastante elevado, essas cargas acumuladas na ponta do capilar são desestabilizadas e são deformadas na superfície até a constituição do cone de Taylor (Figura 1.2). Essas cargas elétricas de mesmo sinal, acumuladas na extremidade, sofrem repulsão coulômbica e se quebram em uma grande gota carregada. Em seguida, acontece a evaporação do solvente e, conseqüentemente, há a diminuição do tamanho da gota carregada. Dessa forma, ocorre o aumento da densidade de cargas e a repulsão entre elas é intensificada, até o momento em que ocorre a fissão ou explosão coulômbica (LORDEIRO, 2011). Esse processo se repete várias vezes até que, finalmente, nanogotas contendo as moléculas do analito carregadas são formadas na fase gasosa (BANERJEE; MAZUMDAR, 2011). Posteriormente, essas moléculas carregadas que entram no espectrômetro são separadas no analisador (LORDEIRO, 2011).

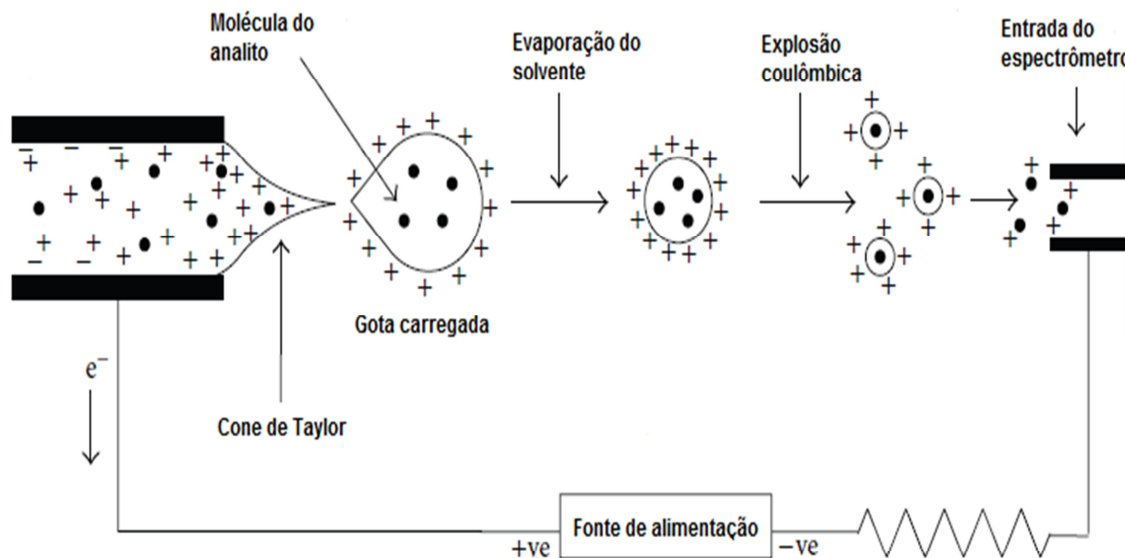


Figura 1.2 - Representação esquemática do mecanismo de ionização eletrospray. (Adaptado de BANERJEE; MAZUMDAR, 2011).

Os estudos atuais se interessam por fontes de ionização menos agressivas para as amostras e, por isso, as variantes da ESI continuam surgindo (CHEN; HU; ZHANG, 2010; LORDEIRO, 2011; MANICKE *et al.*, 2011; VENTER *et al.*, 2013). Entre esses métodos recentes que utilizam o fenômeno *eletrospray*, destacam-se a *desorption electro spray ionization mass spectrometry* (DESI-MS) (TAKATS *et al.*, 2004), *electrospray assisted laser desorption/ionization* (ELDI) (SHIEA *et al.*, 2005), *paper spray ionization* (PS) (WANG *et al.*, 2009) entre outras. (MANICKE *et al.*, 2011).

1.1.2.2 Ionização por *Paper Spray* (PS)

A *paper spray* (PS) é uma técnica de ionização recente que permite que amostras complexas sejam analisadas por espectrometria de massas, de forma direta e ao ar livre (ESPY *et al.*, 2012; NACCARATO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2011). Essa técnica de ionização ambiente foi demonstrada pela primeira vez há cinco anos em uma publicação de Wang *et al.* (2009), sendo que seu desenvolvimento foi conduzido

pela necessidade de procedimentos simples e rápidos para análises de compostos em matrizes complexas (MANICKE *et al.*, 2011).

A PS é uma técnica promissora e que tem sido bastante explorada nos últimos anos (MANICKE *et al.*, 2011; NACCARATO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2011). Nessa técnica, o papel cromatográfico ou outro substrato poroso é cortado em forma triangular e então é carregado com a amostra. Em seguida, o solvente é aplicado e uma alta voltagem é fornecida na base do papel para que um *spray* de gotículas carregadas seja induzido na ponta do papel posicionado na entrada do espectrômetro de massas, Figura 1.3 (MANICKE *et al.*, 2011; SHEN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2011). Dessa forma, o processo pelo qual os íons são gerados é semelhante àquele descrito em ESI (NACCARATO *et al.*, 2013; VENTER *et al.*, 2013). Comumente utiliza-se papel cromatográfico cortado nas dimensões de um triângulo com 10 mm de altura e 5 mm de largura (DENG; YANG, 2013). No presente trabalho, ao invés de carregar o papel previamente com a amostra, a mesma foi aplicada diretamente junto com o solvente eluente.

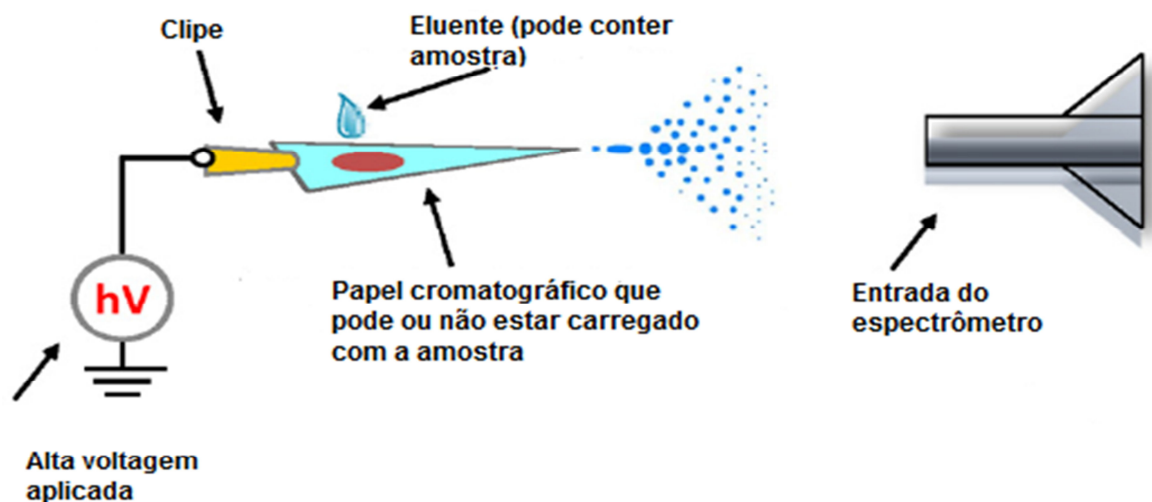


Figura 1.3 – Desenho esquemático de um típico experimento utilizando a PS-MS (Adaptado de MANICKE *et al.*, 2011)

Dentre as vantagens dessa fonte de ionização ressaltam-se o baixo custo, baixo consumo de amostra, consumo de um volume mínimo de solvente, rapidez (análise pode ser realizada em menos de um minuto), minimização do tratamento de amostras e a simplicidade refletida pela não necessidade do uso de gases, como é o caso da DESI e EASI. (SHEN *et al.*, 2012; VENTER *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011).

Vale salientar também que não somente análises qualitativas são possíveis com esse tipo de ionização, mas também análises quantitativas já foram realizadas com a adição de padrão interno. Em seus trabalhos, Shen *et al.* (2012), Su *et al.* (2013) e Wang *et al.* (2011) utilizaram padrões internos adicionados à amostra para obter resultados quantitativos utilizando métodos univariados. No presente trabalho, análises qualitativas e quantitativas foram realizadas utilizando a PS-MS para discriminação e quantificação de adulteração de amostras de ginseng. Para as análises quantitativas utilizou-se ferramentas quimiométricas de calibração multivariada.

Entre as desvantagens reportadas no uso da PS-MS, cita-se a dificuldade de reprodutibilidade que pode ser apresentada em alguns experimentos, sobretudo devido ao posicionamento do papel na entrada do espectrômetro de massas. (VENTER *et al.*, 2013).

1.2 Modos de operação e aplicações da ionização por *paper spray* - PS

A PS-MS tem se mostrado bastante eficiente na análise de amostras de interesse para diversas áreas, tais como monitoramento de drogas terapêuticas em sangue (MANICKE *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2009), controle de qualidade de chás de plantas (DENG; YANG, 2013), análise direta de fármacos em tecidos biológicos (WANG *et al.*, 2011), análises de corantes e contaminantes em alimentos (LI *et al.*, 2013; ZHANG; COOKS; OUYANG, 2012), análises de drogas de abuso em diversas matrizes (SU *et al.*, 2013) e discriminação da origem de amostras de café (GARRET; REZENDE; IFA, 2013). Recentemente, a PS-MS foi utilizada como plataforma para a

condução de reações orgânicas, permitindo a caracterização imediata de produtos (Yan *et al.*, 2013).

Uma aplicação bastante comum da PS-MS é na análise direta de fármacos em manchas secas de sangue (DBS, do inglês *dried blood spot*) aplicadas em dispositivos (“cartões”) confeccionados especialmente para essa finalidade. Os cartões de DBS oferecem um método simples de armazenamento e transporte de pequenas quantidades de amostra de sangue (Figura 1.4). Normalmente, cerca de 10 a 20 μL de sangue são adicionados a um cartão de DBS em círculos de 3 a 6 milímetros. O sangue pode ser coletado com uma picada no dedo, já que a quantidade necessária é ínfima. Trata-se de um método pouco invasivo e que tem sido muito utilizado em investigações por PS-MS. A análise de DBS usando a PS-MS é bastante simples, pois é realizada simplesmente recortando o cartão DBS em formato de um pequeno círculo e o colocando sobre o papel triangular. Em seguida, o solvente é aplicado e uma alta voltagem é fornecida (Figura 1.4). Análises de drogas de abuso, como a cocaína, bem como a quantificação de fármacos como o propranolol e o atenolol, foram realizadas com sucesso utilizando a DBS e a PS-MS. (KISSINGER, 2011; MANICKE *et al.*, 2011, SU *et al.*, 2013)

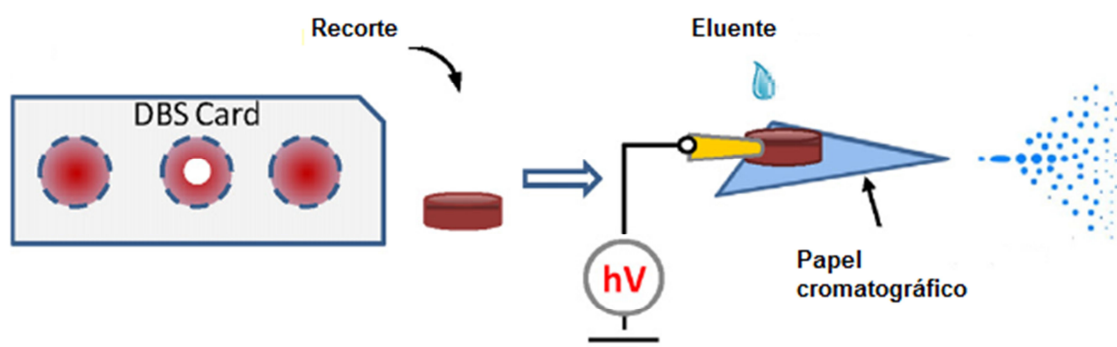


Figura 1.4 – Representação esquemática de um experimento de análise de DBS usando a PS-MS (Adaptado de MANICKE *et al.*, 2011).

Outra forma de análise descrita utilizando *paper spray* é aquela que faz uso da aplicação direta da amostra dissolvida em solução no papel triangular e, em seguida, o

solvente é adicionado e uma alta voltagem é fornecida. Esse tipo de análise foi feita na determinação do corante 4-metilimidazol em bebidas (LI *et al.*, 2013).

Finalmente, o terceiro modo de análise de amostras utilizando essa técnica de ionização é aquele em que a amostra é aplicada sobre o papel e seca em temperatura ambiente por alguns minutos antes da análise. Amostras de extratos de grãos de café foram analisadas por Garrett, Rezende e Ifa (2013) utilizando essa metodologia. Após o processo de secagem, aplica-se o potencial e adiciona-se 5 μL de solvente eluente (metanol, no caso do café) para a geração do espectro de massas (Figura 1.5). Assim, foi possível a discriminação de procedência de amostras de café por PS-MS. Metodologia semelhante foi utilizada na análise de chás verdes (do tipo bancha) visando o controle de qualidade pela discriminação da origem e autenticidade (DENG; YANG, 2013).

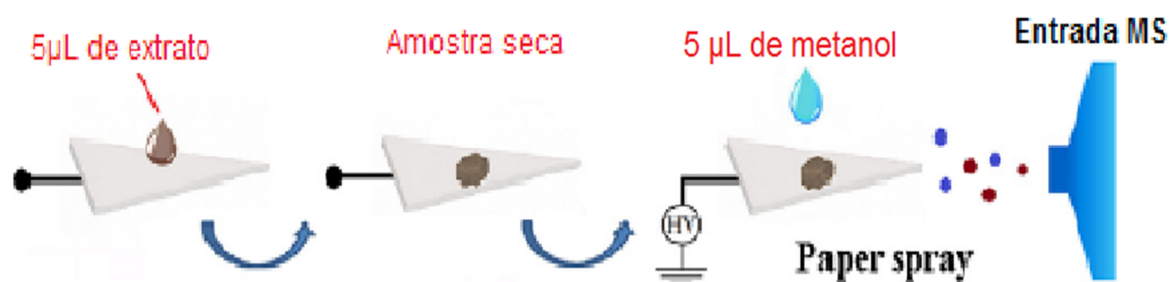


Figura 1.5 – Análise por PS-MS com a secagem da amostra no papel e posterior aplicação de eluente (Adaptado de DENG; YANG, 2013).

1.3 Impressão digital química

A impressão digital química (do inglês *chemical fingerprint*), que pode ser obtida por meio de diferentes técnicas analíticas, é baseada no perfil químico holístico. É um método que pode ser utilizado para a diferenciação e identificação da autenticidade de amostras, dentre elas, as plantas medicinais. Plantas medicinais são altamente usadas em todo mundo, devido a suas propriedades benéficas à saúde. Elas são complexas e

ervas de espécies diferentes podem apresentar semelhanças químicas, apesar de poder apresentar efeitos terapêuticos distintos. (DENG; YANG, 2013; LAI *et al.*, 2012).

As técnicas cromatográficas são as mais utilizadas em estudos envolvendo a obtenção de impressão digital química. Entre elas citam-se a CLAE, eletroforese capilar e cromatografia gasosa acopladas à espectrometria de massas. As grandes vantagens inerentes a essas técnicas cromatográficas são a robustez e as capacidades quantitativas e qualitativas satisfatórias. Entretanto, elas apresentam desvantagens, tais como o enorme tempo gasto para a corrida cromatográfica e a realização de várias etapas de pré-tratamento de amostras anteriormente à análise, resultando em mais gasto de solventes e mais geração de resíduos. (DENG; YANG, 2013).

Devido ao crescente uso de plantas medicinais, é imprescindível o desenvolvimento de métodos de alta eficiência para análises baseadas em *chemical fingerprint* que auxiliem no controle de qualidade. Tais métodos devem apresentar as seguintes características: fornecer o máximo possível de informações moleculares, proporcionar o rápido monitoramento sem que ocorra contaminação cruzada e efeito de memória, apresentar alta sensibilidade e especificidade para que sejam capazes de detectar componentes traços em matrizes complexas. Dessa maneira, as técnicas de ionização ambiente, que requerem nenhum ou mínimo pré-tratamento de amostras e que não necessitam de separação cromatográfica são uma excelente escolha, já que apresentam as referidas características. (DENG; YANG, 2013; LAI *et al.*, 2012).

Neste contexto, o desenvolvimento de técnicas analíticas rápidas, simples e capazes de obter o *chemical fingerprint* para identificação e diferenciação de espécies/amostras, destacando-se as plantas medicinais, é de extrema importância para o controle de qualidade. Uma escolha adequada seria o PS-MS.

1.4 Substâncias testadas por PS-MS

1.4.1 Ginsengs brasileiro, coreano e americano

O ginseng é uma planta medicinal muito utilizada em países orientais. Vários estudos mostrando seus benefícios difundiram o uso dessa planta no mundo inteiro. O ginseng auxilia no tratamento da fadiga, fraqueza e estresse físico e mental. Além disso, estudos relatam a sua eficácia em controle de enfermidades, tais como diabetes e hipertensão. (BRAGA; DINIZ; ALMEIDA, 2011).

O ginseng pertence à família *Araliaceae*, ao gênero *Panax* e é encontrado no Hemisfério Norte, principalmente na Coreia do Norte. O gênero *Panax* possui 11 espécies conhecidas (BRAGA; DINIZ; ALMEIDA, 2011). No presente trabalho, duas espécies de ginseng do gênero *Panax* foram estudadas: *Panax ginseng* e *Panax quinquefolius*.

Entre as diversas espécies existentes de ginseng, o *P. ginseng*, também conhecido como ginseng coreano ou asiático e o *P. quinquefolius*, conhecido como ginseng americano, são as mais consumidas (BRAGA; DINIZ; ALMEIDA, 2011; LAI *et al.*, 2012). Apesar de possuir alguns componentes químicos semelhantes, essas duas espécies podem exercer efeitos terapêuticos diferentes. Enquanto a primeira é famosa por “reabastecer” o “calor do corpo”, a segunda é conhecida por remover o excesso de “calor” (LAI *et al.*, 2012; SUN; CHEN, 2011). Por isso, essas duas espécies não devem ser usadas concomitantemente ou misturadas, já que apresentam diferenças e até mesmo funções opostas. Normalmente, o ginseng coreano é mais barato que o americano e, por isso, misturas e comercializações de produtos adulterados já foram reportadas (LAI *et al.*, 2012).

O ginseng é constituído quimicamente por frações saponínicas e não-saponínicas. As frações saponínicas representam os ginsenosídeos, enquanto que as não saponínicas englobam as vitaminas, minerais, aminoácidos, fenóis, proteínas e polipetídeos. Os ginsenosídeos possuem estruturas químicas semelhantes, contendo um núcleo esteróide de 17 átomos de carbono (ciclopentanoperidrofenantreno) que estão dispostos em quatro anéis, Figura 1.6 (BRAGA; DINIZ; ALMEIDA, 2011). Porém,

eles se diferem na posição e número de moléculas de açúcar ligadas ao núcleo esteróide nos C-3 e C-6 (BRAGA; DINIZ; ALMEIDA, 2011). Os ginsenosídeos podem ser classificados em três grupos distintos: o grupo panaxadiol (que contem os ginsenodídeos Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd, Rg₃, Rh₂, Ra₁, Ra₂, Ra₃, malonil-Rb₁, malonil-Rb₂, malonil-Rc, malonil-Rd), o grupo panaxatriol (com os ginsenosídeos Re, Rf, Rg₁, Rg₂, Rh₁) e o grupo do ácido oleanólico (ginsenosídeo Ro) (BRAGA; DINIZ; ALMEIDA, 2011; BREEMEN *et al.*, 1995; FUZZATI *et al.*, 1999).

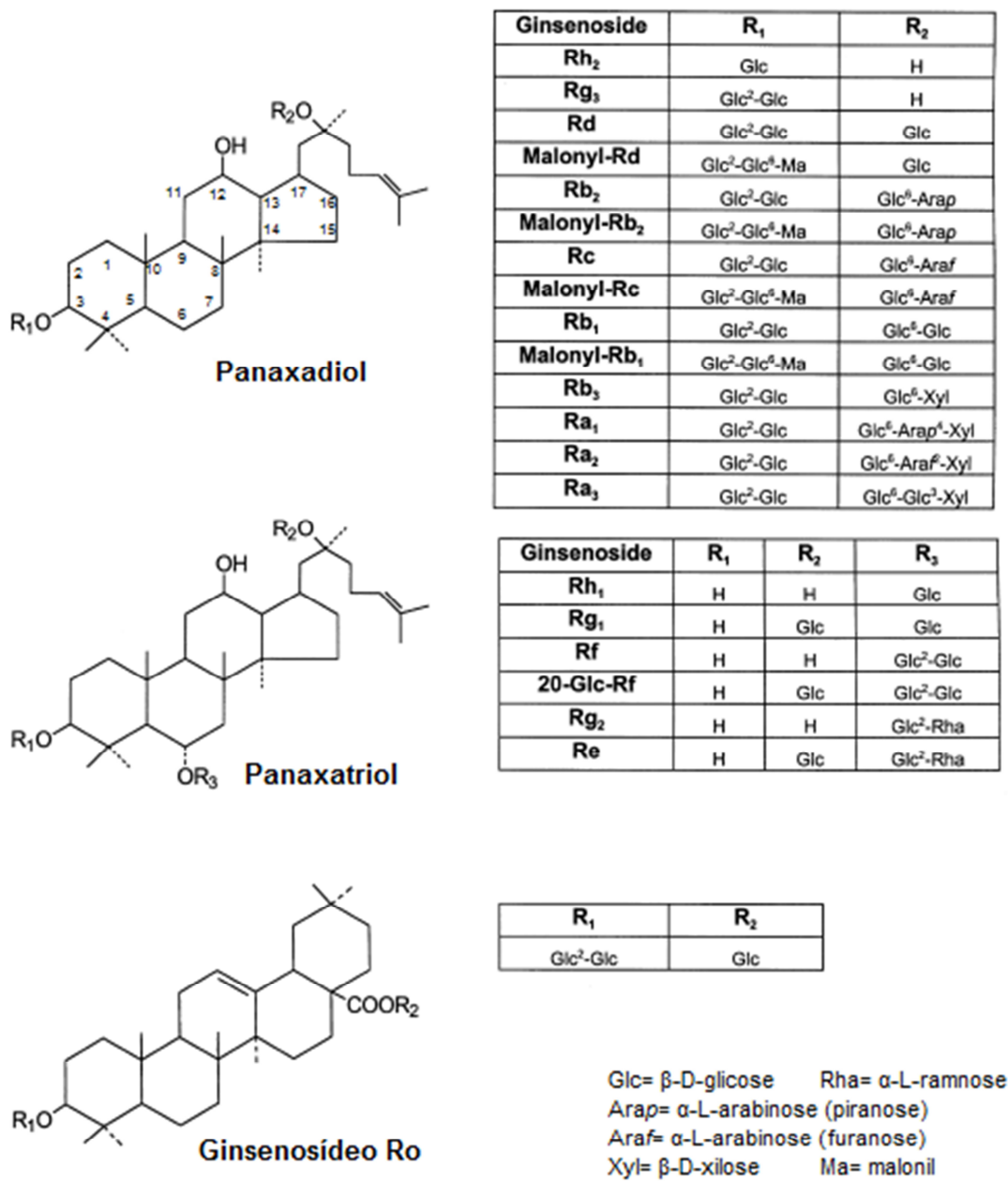


Figura 1.6 – Estruturas químicas dos ginsenosídeos. (Adaptado de FUZZATI *et al.*, 1999).

Os ginsenosídeos pertencem a um dos grupos de componentes químicos responsáveis pelas atividades terapêuticas das espécies *Panax*. As análises desses

componentes por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização *eletrospray* (*liquid chromatography - electrospray ionization*) para a diferenciação das espécies do gênero *Panax* é comum (BREEMEN *et al.*, 1995; LAI *et al.*, 2012). Portanto, já existem estudos discriminando as espécies de ginseng americano e coreano.

Breemen *et al.* (1995) realizaram análises de ginsenosídeos de extratos das raízes de *P. ginseng* e *P. quinquefolius* por cromatografia líquida com ionização *eletrospray*, demonstrando as diferenças de quantidades relativas de ginsenosídeos para cada espécie. Esses autores mostraram também que as duas espécies podem ser diferenciadas usando essa técnica, pois três ginsenosídeos, de m/z 939, 955 e 1101, foram detectados apenas para o ginseng coreano.

Em um trabalho mais recente, Lai *et al.* (2012) demonstraram a rápida diferenciação de ginseng americano e coreano por MALDI-MS, comparando os espectros obtidos para cada espécie. Observando os espectros, concluíram que alguns íons pais referentes a alguns ginsenosídeos estavam presentes em apenas uma das espécies, como, por exemplo, os íons de m/z 1249 e 1279 que foram observados apenas para o ginseng coreano. Além disso, as intensidades de íons característicos de ginsenosídeos apresentaram-se distintas para as duas espécies, como por exemplo, os íons de m/z 1117 e 1147, que apresentaram picos de intensidades próximas para o ginseng coreano, enquanto que para o americano o íon de m/z 1117 apresentou-se com baixa intensidade e o íon de m/z 1147 com intensidade elevada.

No Brasil, espécies do gênero *Pfaffia* são amplamente utilizadas devido às suas propriedades medicinais, sendo que a espécie *Pfaffia paniculata* apresenta altos valores de vendas na indústria nacional de fitoterápicos. As características fitoquímicas deste gênero se assemelham às do ginseng coreano (MAGALHÃES, 2012).

A raiz *P. paniculata*, também conhecida como ginseng brasileiro, possui diversas propriedades terapêuticas, como tônica, afrodisíaca, antiinflamatória e antidiabética. Além disso, alguns estudos têm atribuído capacidades antineoplásicas à essa raiz. Os principais componentes da raiz dessa espécie são o triterpeno ácido páfico e as

saponinas derivadas, conhecidas como pfaosídeos, que são estruturalmente semelhantes aos ginsenosídeos do ginseng coreano, *P. ginseng*. (MAGALHÃES, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Os preços das diferentes espécies de ginsengs são diferentes no mercado brasileiro. O ginseng americano é difícil de ser encontrado no mercado nacional, sendo comumente importado dos Estados Unidos ou Canadá. Já o ginseng coreano é encontrado no mercado brasileiro, porém existe pouca variedade de marcas. O ginseng brasileiro apresenta valor bastante inferior ao coreano, o que pode estimular a adulteração, já que não é possível a detecção visual de adulteração, uma vez que as raízes, após trituradas, possuem cores semelhantes. Uma estimativa de preços para o mercado nacional das três espécies de ginsengs brasileiro, coreano e americano, seria de R\$ 0,10, R\$ 0,50 e R\$ 1,50, respectivamente.

Existem poucos estudos na área de química analítica relacionados à diferenciação e à identificação de compostos no ginseng brasileiro, especialmente aqueles relacionados à impressão digital química e que são realizados de maneira rápida e simples. Grande parte dos estudos sobre o ginseng brasileiro possui relação com sua possível ação antitumoral, atribuída aos pfaosídeos e ao ácido páfico (MAGALHÃES, 2012; NISHIMOTO *et al.*, 1984; RODRIGUES *et al.*, 2013). Não há trabalhos na literatura relacionados a análises de diferenciação de gêneros *Panax* e *Pfaffia* por espectrometria de massas. O desenvolvimento de trabalhos envolvendo a análise de diferenciação desses dois gêneros seria bastante interessante, pois os mesmos apresentam componentes químicos diferentes, apesar das similiaridades terapêuticas que lhes são atribuídas. A espectrometria de massas é uma ferramenta analítica bastante adequada nesse tipo de análise.

No presente trabalho, é apresentada a diferenciação das espécies *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius* e *Pfaffia paniculata* pela técnica PS-MS.

1.5 Quimiometria e calibração multivariada

Devido aos grandes avanços tecnológicos das últimas décadas, o uso de computadores no meio científico para auxiliar as análises de dados químicos é cada vez mais comum. Os dados coletados nas análises químicas passaram a gerar grande quantidade de informação, especialmente na química analítica, quando ocorreu o interfaceamento de instrumentos analíticos com os computadores (FERREIRA *et al.*, 1999). Por isso, surgiu uma necessidade de uso de ferramentas que facilitassem as análises desses dados complexos, permitindo a interpretação química. Assim, há cerca de quarenta anos a quimiometria foi estabelecida (FERREIRA *et al.*, 1999; KETTANEH; BERGLUND, 2005).

Uma definição para quimiometria dada pela Sociedade Internacional de Quimiometria (ICS, do inglês *International Chemometrics Society*) traduzida é:

A disciplina da química que usa métodos matemáticos, estatísticos e outros métodos, empregando uma lógica formal: 1) para planejar ou selecionar procedimentos e experimentos em condições ótimas; e 2) para fornecer o máximo de informação química relevante pela análise de dados químicos. (ICS, 1988).

Em química analítica, calibração pode ser entendida como uma função que relaciona os valores medidos, como, por exemplo, intensidades de espectros, com grandezas analíticas, caracterizando as quantidades ou concentrações dos analitos (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002).

A diferença entre calibração univariada e multivariada, já sugerida pelos nomes, é que a primeira utiliza apenas uma variável, enquanto a segunda leva em consideração várias variáveis na construção do modelo. Assim, os interferentes presentes na calibração multivariada não inviabilizam a construção do modelo, pois eles podem ser modelados conjuntamente com o(s) analito(s). Já a calibração univariada é realizada na ausência de interferentes, pois considera apenas uma variável. (FERREIRA *et al.*, 1999, GUIMARÃES, 2014; PEREIRA, 2013).

Diversas aplicações de modelos multivariados nas diferentes áreas da química têm sido mostradas. Por isso, é de extrema importância a harmonização entre a validação de métodos univariados e multivariados para englobar os métodos

multivariados, já que a grande maioria das regulamentações oficiais são concebidas de forma univariada (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014; GUIMARÃES, 2014).

Existem vários métodos de regressão que podem ser empregados em modelos de calibração multivariada, dentre eles, destacam-se a regressão linear múltipla (MLR), a regressão por componentes principais (PCR) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) (FERREIRA *et al.*, 1999, GUIMARÃES, 2014). A escolha do método mais adequado deve levar em consideração as características da técnica analítica utilizada e o perfil das informações. O PCR e PLS, por exemplo, normalmente são empregados quando o número de variáveis é grande (FERREIRA *et al.*, 1999).

É importante salientar que após a construção do modelo, ele deve ser validado antes de sua aplicação, para testar sua capacidade preditiva (FERREIRA *et al.*, 1999).

No presente trabalho, a adulteração de ginseng coreano com ginseng brasileiro foi quantificada construindo-se um modelo PLS, por meio de dados obtidos por PS-MS. Até o momento, não há na literatura científica trabalhos que utilizam o PLS com dados obtidos por PS-MS.

Nos últimos anos, muitos estudos demonstram o emprego da ESI-MS com o tratamento quimiométrico dos dados, tais como PCA e PLS-DA, para análises qualitativas (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014). Amostras de diversos óleos vegetais (CATHARINO *et al.*, 2005), bebidas alcoólicas (SOUZA *et al.*, 2009), café (MENDONÇA *et al.*, 2008) e azeite de oliva (LAW *et al.*, 2010) já foram analisadas por essa metodologia. Porém, apenas poucos trabalhos, cerca de sete estudos, descrevem a aplicação de métodos de calibração multivariados com dados obtidos por ESI-MS, de maneira quantitativa (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014).

1.5.1 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

O método PLS, proposto pelo estatístico sueco Herman Wold, foi desenvolvido na área da economia, porém suas principais aplicações atuais são comumente observadas na área da química (BRERETON, 2007; KRISHNAN, *et al.*, 2011).

Para a compreensão desse método, é importante ressaltar que ele se baseia em PCA, conforme descreve Pereira (2013, p.4 e 5):

O método de mínimos quadrados parciais é baseado no conceito de análise de componentes principais (PCA – *principal component analysis*), no qual a matriz de dados de sinais analíticos é decomposta em componentes principais. Porém, a decomposição feita no PLS difere da PCA, por também utilizar o vetor de valores de referência. Assim, o algoritmo usado faz a decomposição em variáveis que não só modelam os sinais analíticos (variáveis independentes, em \mathbf{X}), mas também explicam a variância relacionada aos valores de referência (variáveis dependentes, em \mathbf{Y}). Devido a esta diferença, ocorre uma pequena perda de ortogonalidade das componentes principais, e por isso, elas recebem um nome diferente, variáveis latentes (VL).

O PLS é um método de calibração inversa, ou seja, a resposta analítica \mathbf{Y} (e.g. concentração) é uma função do sinal analítico \mathbf{X} (e.g. espectro). Assim, o modelo é calculado pela decomposição simultânea de \mathbf{X} e \mathbf{Y} em uma soma de A variáveis latentes. \mathbf{X} é uma matriz $n \times p$, composta por n amostras e p variáveis, e \mathbf{Y} é uma matriz $n \times k$, composta por n amostras e k respostas analíticas. No caso mais simples e mais usual, k é igual a um, sendo o modelo criado para prever apenas uma resposta analítica (PLS-1), mas a decomposição utilizando mais de uma propriedade também é utilizada (PLS-2).

Entre os diversos métodos utilizados na calibração multivariada, o PCR e o PLS são os mais empregados na construção de modelos que utilizam técnicas analíticas com ruídos experimentais. A diferença do PCR em relação ao PLS é que no PCR as informações referentes às concentrações (y) não são consideradas, assim, os principais componentes (variáveis latentes) são calculados somente a partir das respostas relacionados aos dados espectrais (X). Na construção do modelo PLS, a determinação do número de variáveis latentes é muito importante e deve-se realizar também a detecção de *outliers* (FERREIRA *et al.*, 1999).

1.5.1.1 Detecção de amostras anômalas (*outliers*)

Segundo Kettaneh e Wold (2005, p. 5), os *outliers*, também conhecidos como amostras anômalas, “são pontos de dados (vetores) que distam tanto dos outros dados que severamente distorcem os resultados se eles fossem incluídos no desenvolvimento do modelo”. Outra definição para *outliers* é que são amostras que pertencem a outras populações. Por isso, durante o desenvolvimento do modelo, eles precisam ser eliminados por testes estatísticos (GUIMARÃES, 2014).

Portanto, a remoção das amostras anômalas é uma etapa crucial para a otimização dos conjuntos de calibração e validação, e quando essas amostras anômalas são eliminadas, modelos com melhor capacidade preditiva são construídos (FERREIRA *et al.*, 1999, GUIMARÃES, 2014).

1.5.2 Figuras de mérito (FdM)

Quando um modelo é construído, é preciso verificar se ele é adequado ao fim ao qual se destina e é através da validação analítica que essa constatação é possível (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). A validação pode ser atestada por meio de parâmetros, que são as figuras de mérito, que garantem a confiabilidade do modelo proposto (GUIMARÃES, 2014; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

As FdM averiguadas no presente trabalho foram: veracidade, precisão, linearidade, viés, seletividade, sensibilidade, sensibilidade analítica, relação de desempenho do desvio (RPD) e limites de quantificação e detecção.

1.5.2.1 Veracidade

Botelho, Mendes e Sena (2013, p.1417) descrevem a veracidade como o “termo atualizado, que substitui o antigo significado de exatidão”. Ela é avaliada pela raiz quadrada do erro médio de calibração, RMSEC (*Root Mean Squares Error of Calibration*) e principalmente pela raiz quadrada do erro médio de previsão RMSEP (*Root Mean Squares Error of Prediction*). A fórmula, na qual o RMSEP pode ser calculado é (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009):

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n_v}} \quad (\text{Equação 1})$$

em que n_v é o número de amostras do conjunto de validação, y_i e \hat{y}_i correspondem aos valores de referência e aos previstos pelo modelo, respectivamente. Já na publicação

de Alves, Sena e Augusti (2014), a veracidade também foi averiguada pelos erros relativos médios para as amostras individuais.

1.5.2.2 Precisão

A precisão é uma estimativa da variação dos valores de um conjunto de medidas. Ela é estimada de maneira semelhante aos métodos univariados, levando em consideração o desvio padrão relativo (DPR) (PEREIRA, 2013). No presente trabalho considerou-se a precisão no nível de repetitividade.

1.5.2.3 Linearidade

Em estudos realizados por Alves, Sena e Augusti (2014) e Botelho, Mendes e Sena (2013) a linearidade foi avaliada por meio do coeficiente de correlação (r) da reta estimada para os valores de referência contra os valores previstos. Porém, o uso apenas desse critério foi considerado insuficiente em modelos multivariados pelos autores. Assim, testes estatísticos foram empregados com o intuito de avaliar também a aleatoriedade dos resíduos da regressão.

Existem três testes estatísticos utilizados em trabalhos de calibração multivariada para verificar a linearidade (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014; BOTELHO; MENDES; SENA, 2013). Esses testes, que são descritos detalhadamente em uma publicação de Souza e Junqueira (2005), são usados para avaliar a normalidade, a homocedasticidade e a independência dos resíduos. O teste de Ryan-Joiner (RJ) é utilizado para avaliar a normalidade dos resíduos. O teste Brown-Forsythe (BF) é empregado na avaliação da homocedasticidade dos resíduos. O último teste que atesta a aleatoriedade dos resíduos é o Durbin-Watson (DW), conhecido também como teste da independência.

1.5.2.4 Viés (*Bias*)

O *bias* se refere aos erros sistemáticos do modelo, que deve ser calculado de acordo com a norma E1655-00 da ASTM, que emprega um teste *t* para as amostras de validação com 95% de confiança. O viés médio pode ser estimado, para o conjunto de validação, empregando a equação 2 (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009):

$$\text{bias} = \frac{\sum_{i=1}^{n_v} (y_i - \hat{y}_i)}{n_v}$$

(Equação 2)

Logo após, o desvio padrão dos erros de validação (SDV – *Standard Deviation of Validation*) é estimado por:

$$\text{SDV} = \sqrt{\frac{\sum [(y_i - \hat{y}_i) - \text{bias}]^2}{n_v - 1}}$$

(Equação 3)

Finalmente, o valor de *t* pode ser calculado por:

$$t_{\text{bias}} = \frac{|\text{bias}| \sqrt{n_v}}{\text{SDV}}$$

(Equação 4)

em que n_v é o número de amostras de validação (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

Se o valor de *t* encontrado apresentar valor superior ao *t* crítico para n_v graus de liberdade, os erros sistemáticos no modelo multivariado são significativos (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

1.5.2.5 Seletividade

A seletividade mede o grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e os interferentes da amostra (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). Vale ressaltar que para métodos multivariados não se exige um sinal seletivo (BOTELHO; MENDES; SENA, 2013). Ela pode ser estimada pela equação 5 (GUIMARÃES, 2014):

$$SEL_i = \frac{n\hat{a}_i}{\|x_i\|}$$

(Equação 5)

sendo que $n\hat{a}_i$ é o escalar do sinal analítico (NAS - *Net Analyte Signal*) que é estimado para a amostra 'i' e $\|x_i\|$ é a norma do respectivo espectro (BOTELHO; MENDES; SENA, 2013; GUIMARÃES, 2014).

O NAS é a parte de sinal proveniente somente do analito, ortogonal aos interferentes (BOTELHO; MENDES; SENA, 2013; BRO; ANDERSEN, 2003; PEREIRA, 2013). O NAS foi estimado a partir do vetor dos coeficientes de regressão.

1.5.2.6 Sensibilidade

A sensibilidade é a figura de mérito que mostra a variação da resposta em relação à concentração do analito. Ela pode ser estimada pela equação 6 (GUIMARÃES, 2014):

$$S\hat{E}N = \frac{1}{\|b\|}$$

(Equação 6)

em que $\|b\|$ representa a norma do vetor dos coeficientes de regressão para o modelo PLS (BOTELHO; MENDES; SENA, 2013; GUIMARÃES, 2014).

1.5.2.7 Sensibilidade analítica (γ)

A investigação da sensibilidade não é a melhor escolha para comparação com outros métodos analíticos, pois ela depende da técnica analítica utilizada. Nesse caso, o parâmetro mais adequado é a sensibilidade analítica (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014; BOTELHO; MENDES; SENA, 2013). Ela pode ser obtida através de:

$$\gamma = \frac{S\hat{E}N}{\|\delta x\|}$$

(Equação 7)

em que δx representa o ruído experimental (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

O inverso da sensibilidade analítica (γ^{-1}) estabelece a mínima diferença de concentração que o método é capaz de discernir (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014; BOTELHO; MENDES; SENA, 2013; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

1.5.2.8 Relação de Desempenho do Desvio, RPD (*Residual Prediction Deviation*)

A RPD, figura de mérito mais recente, é utilizada para estimar a capacidade preditiva dos métodos de maneira absoluta, independente da faixa analítica (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014; BOTELHO; MENDES; SENA, 2013, GUIMARÃES, 2014; WILLIAMS; NORRIS, 2001). Ela é calculada pelas equações abaixo:

$$RPD_{cal} = \frac{DP_{cal}}{RMSECV}$$

(Equação 8)

$$RPD_{val} = \frac{DP_{val}}{RMSEP}$$

(Equação 9)

em que DP_{cal} e DP_{val} são os desvios padrões dos valores de referência dos conjuntos de calibração e validação, respectivamente (BOTELHO; MENDES; SENA, 2013, GUIMARÃES, 2014).

Os modelos que possuem RPD de calibração acima de 2,4 são considerados bons. E não devem ser empregados os modelos que apresentam valores de RPD inferiores a 1,5 (BOTELHO; MENDES; SENA, 2013; GUIMARÃES, 2014).

1.5.2.9 Limites de detecção e de quantificação

Segundo Valderrama, Braga e Poppi (2009, p. 1280), o limite de detecção é a “menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada”. Já o limite de quantificação pode ser definido como “a menor concentração da substância de interesse que pode ser medida”.

Para a estimativa dessas duas FdM, as seguintes equações foram utilizadas (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014):

$$LD = 3,3 \times \gamma^{-1} \quad (\text{Equação 10})$$

$$LQ = 10 \times \gamma^{-1} \quad (\text{Equação 11})$$

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais do trabalho

Os principais objetivos deste trabalho consistem na diferenciação de três espécies de ginseng por PS-MS, mediante a obtenção das impressões digitais químicas, e na quantificação de adulteração de uma espécie de ginseng com outra espécie distinta utilizando PS-MS e calibração multivariada. A diferenciação foi realizada entre três espécies: *P. ginseng*, *P. quinquefolius* e *P. paniculata*. Na quantificação de adulteração foi avaliada a adulteração de ginseng coreano com ginseng brasileiro. O método de calibração multivariada utilizado foi o PLS.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Montagem de uma fonte de ionização *Paper Spray*

Propõe-se a montagem de uma fonte de ionização *paper spray*, acoplada ao espectrômetro de massas, em substituição da fonte ESI originalmente existente.

2.2.2 Otimização dos experimentos para análise de ginsengs por PS-MS

Propõe-se a otimização das análises de extratos de ginseng de forma univariada por PS-MS, avaliando-se quatro parâmetros distintos.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Montagem da fonte de ionização *paper spray*

Os instrumentos utilizados para a montagem da fonte de ionização *paper spray* foram os seguintes:

- Suporte com microposicionador *xyz*, que permitiu o alinhamento do papel na entrada do espectrômetro de massas.
- Conector elétrico de cobre do tipo jacaré fixado em uma lâmina de vidro com auxílio de fita adesiva. A esse conector foi soldado um fio condutor que, plugado ao espectrômetro de massas, possibilitou a aplicação do potencial elétrico no papel, Figura 3.1;
- Circuito eletrônico que possibilitou o funcionamento do equipamento na ausência da fonte comercial ESI, Figura 3.2;

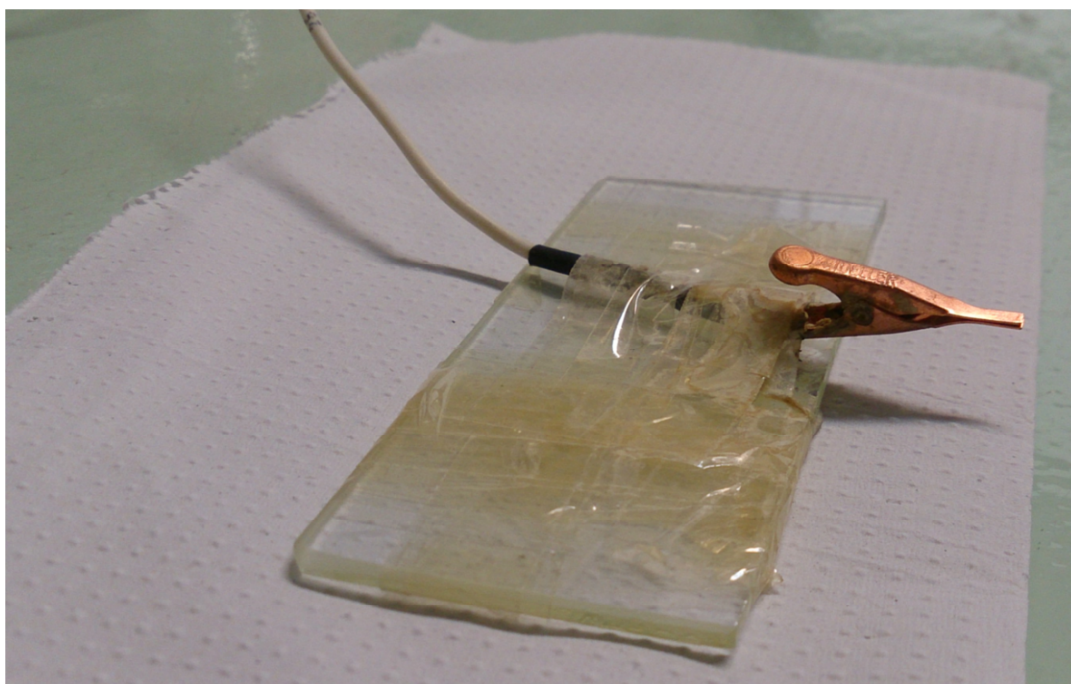


Figura 3.1 – Conector elétrico de cobre do tipo jacaré fixado em uma lâmina de vidro com auxílio de fita adesiva. Sistema utilizado para aplicação do potencial da ionização por *paper spray*.

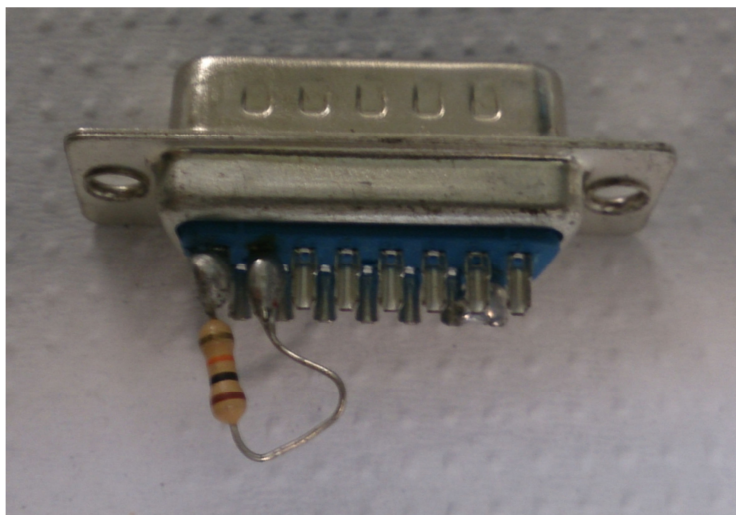


Figura 3.2 – Circuito eletrônico que possibilitou o funcionamento do equipamento na ausência da fonte comercial ESI.

Uma visão geral da montagem da interface para ionização do tipo *paper spray* pode ser obtida nas Figuras 3.3 e 3.4, a seguir:



Figura 3.3 – Fotografia da fonte *paper spray* acoplada ao espectrômetro de massas (visão ampla).

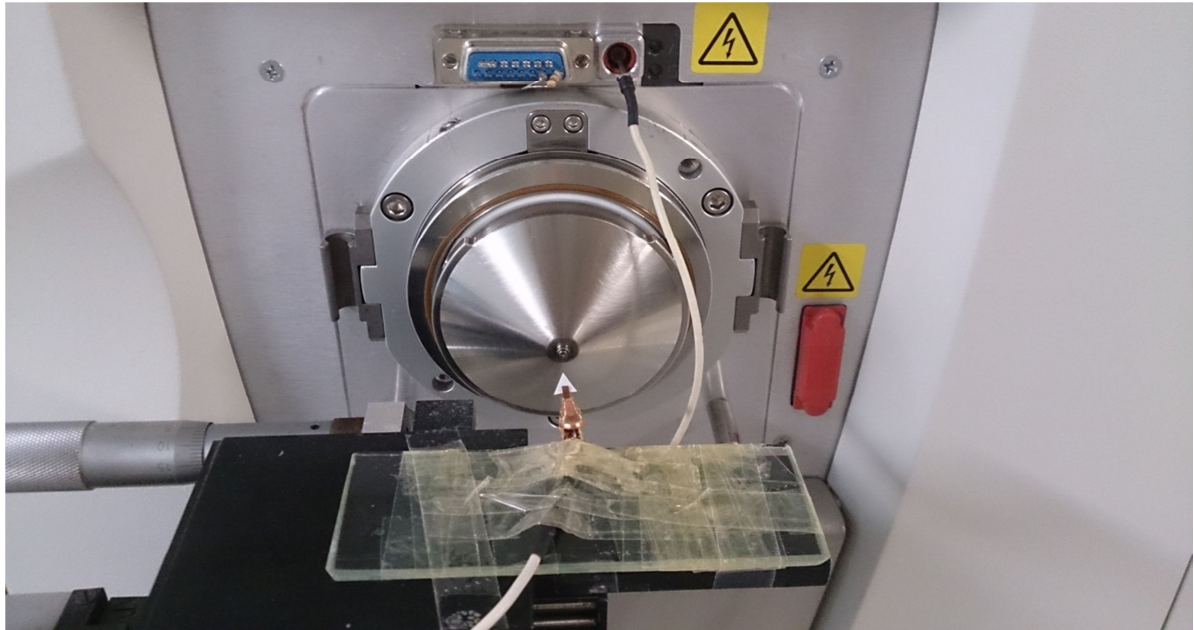


Figura 3.4 – Fotografia da fonte de ionização por *paper spray* posicionada na entrada do espectrômetro de massas (visão aproximada).

3.2 Materiais, amostras e reagentes

As diversas amostras de ginseng, a maioria na forma de pó e chá, foram adquiridas comercialmente nos mercados de Belo Horizonte e de São Paulo, e pela internet. As amostras foram adquiridas no Brasil e Canadá, Tabela 1. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e foram utilizados sem realizar purificação prévia. A água deionizada, obtida em um sistema modelo Millipak® 40 Express Final Filter (Mili-Q, Corporação Millipore, Bedford, MA, USA) foi usada em todos os experimentos. Os reagentes acetonitrila (ACN), ácido fórmico e metanol foram adquiridos da J.T. Baker (Center Valley, PA, USA).

As medidas espectrométricas foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas com analisador do tipo *Ion Trap* modelo LCQ-Fleet (Thermo-Scientific, San Jose, CA, USA). Para a etapa de extração, um equipamento de ultrassom modelo Unique (Ultrasonic Clean, Indaiatuba, SP, Brasil) foi utilizado. Na centrifugação, recorreu-se à centrífuga modelo 80-2B (Centribio Co., LTDA, China). O papel

cromatográfico utilizado na análise PS-MS foi o Whatman modelo nº 1 (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra).

Tabela 1 – Dados detalhados em relação a todas as amostras de ginseng utilizadas neste trabalho.

Amostra	País adquirido	Tipo de ginseng	Espécie	Quantidade comercializada(g)
A	Brasil	brasileiro	<i>P. paniculata</i>	20
B	Brasil	brasileiro	<i>P. paniculata</i>	50
C	Brasil	brasileiro	<i>P. paniculata</i>	100
D	Canadá	americano	<i>P. quinquefolius</i>	3
E	Canadá	americano	<i>P. quinquefolius</i>	3
F	Canadá	americano	<i>P. quinquefolius</i>	3
G	Brasil	coreano	<i>P. ginseng</i>	3
H	Brasil	coreano	<i>P. ginseng</i>	3
I	Brasil	coreano	<i>P. ginseng</i>	20

As amostras de A a H foram empregadas na diferenciação das espécies *P. ginseng*, *P. quinquefolius* e *P. paniculata*. Como poderá ser observado nos resultados, a amostra I, comercializada como ginseng coreano, é, na realidade, pertencente à espécie *P. paniculata*, que caracteriza o ginseng brasileiro.

3.3 Preparação dos extratos de ginseng

A extração das amostras de ginseng foi realizada de modo semelhante a um procedimento descrito por Lai *et al.* (2012). Uma porção de 250 mg da amostra (raiz de ginseng na forma de pó) foi pesada e colocada em um tubo do tipo falcon com capacidade para 15 mL. Uma quantidade de 5 mL de uma solução 75/25 (v/v) de ACN/H₂O foi adicionada ao tubo. Após ser agitado, ele foi levado ao banho de

ultrassom por 15 minutos. Em seguida, a solução do extrato foi centrifugada também por 15 minutos a 3000 rpm, para a sedimentação dos resíduos da raiz (Figura 3.5).

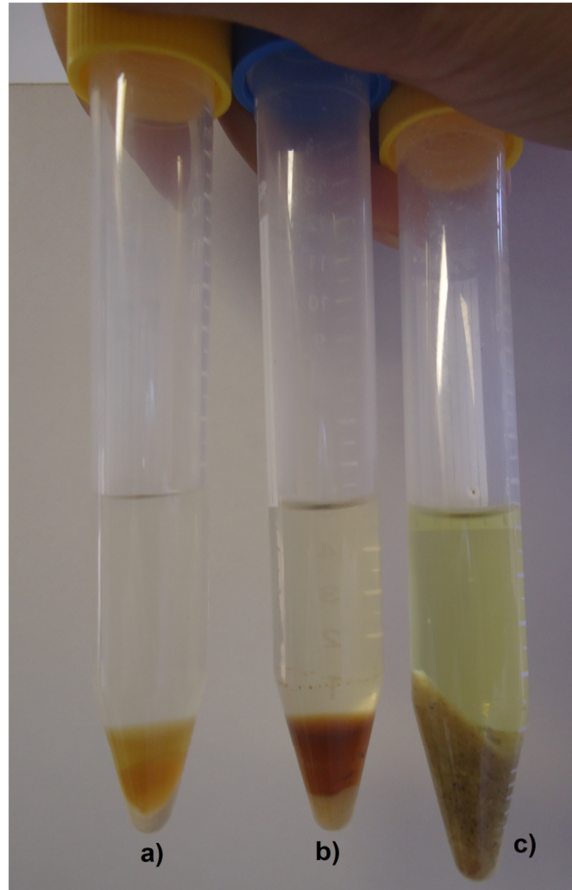


Figura 3.5 – Extratos de ginseng após a centrifugação: a) ginseng coreano – amostra G; b) ginseng americano – amostra D; c) ginseng brasileiro – amostra C.

3.4 Otimização das condições experimentais para análise dos extratos de ginseng por PS-MS

O processo de otimização das condições experimentais para as análises por PS-MS foi executado utilizando a amostra G de ginseng coreano, de forma univariada e em triplicata. As variáveis investigadas e seus níveis podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Variáveis estudadas no processo de otimização da análise PS-MS e seus respectivos níveis.

Variáveis investigadas	Níveis
Aplicação da amostra sobre o papel	Direta; com secagem prévia; utilizando ácido
Potencial aplicado	3 kV; 3,5 kV; 4 kV; 4,5 kV; 5 kV
Distância do papel à entrada do MS	3 mm; 5 mm; 7 mm; 10 mm
Volume de amostra	7 μ L; 10 μ L; 15 μ L

3.5 Análise dos extratos de ginseng por PS-MS

Todos os espectros de massas foram adquiridos no modo positivo. O software utilizado no controle e aquisição de dados foi o Thermo Scientific Xcalibur.

Após a otimização, as análises por PS-MS foram executadas com a aplicação de 15 μ L do extrato de ginseng, diretamente ao papel cromatográfico cortado no formato de triângulo de 5 mm de base por 10 mm de altura e posicionado na entrada do espectrômetro a uma distância de 7 mm. Não foi necessário um solvente de eluição. Imediatamente após a aplicação da amostra, foi aplicado um potencial de 4,5 kV na base do papel para a formação do *spray*. Utilizou-se um tempo de aquisição equivalente a 50 varreduras (*scans*), correspondente de 30 a 50 segundos, dependendo do tamanho da faixa de espectro escolhida. Posteriormente, selecionou-se a região do espectro de maior intensidade e estabilidade de sinal, adquirido das 50 varreduras (*scans*).

3.6 Análise de quantificação de adulteração de ginseng coreano com ginseng brasileiro utilizando PS-MS e calibração multivariada

Para a realização desta etapa, utilizou-se a amostra G de ginseng coreano e realizou-se adulterações com ginseng brasileiro, amostra C. Para facilitar o processo de pesagem, decorrente de pequenos valores de adulteração, dobrou-se os valores totais de pesagem da amostra e de solvente adicionados, ou seja, a quantidade total de pó de raiz pesada passou de 250 mg para 500 mg, assim como a quantidade de solvente adicionada de 5 mL para 10 mL. Os valores de adulteração de ginseng coreano com ginseng brasileiro, assim como as quantidades reais pesadas, podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de adulteração de ginseng coreano com ginseng brasileiro. Quantidades totais, quantidades teóricas a serem pesadas e quantidades reais pesadas de ginseng brasileiro e coreano.

Adulteração %	Total Teórico(g)	Brasileiro/Teórico (g)	Brasileiro/Real (g)	Coreano/Teórico (g)	Coreano/Real (g)
7	0,5000	0,0350	0,0349	0,4650	0,4654
8	0,5000	0,0400	0,0402	0,4600	0,4607
9	0,5000	0,0450	0,0450	0,4550	0,4555
11	0,5000	0,0550	0,0550	0,4450	0,4454
12	0,5000	0,0600	0,0605	0,4400	0,4403
13	0,5000	0,0650	0,0650	0,4350	0,4353
14	0,5000	0,0700	0,0702	0,4300	0,4305
16	3,0000	0,4800	0,4806	2,5200	2,5207
17	0,5000	0,0850	0,0853	0,4150	0,4155
18	0,5000	0,0900	0,0900	0,4100	0,4098
19	0,5000	0,0950	0,0950	0,4050	0,4054
21	0,5000	0,1050	0,1050	0,3950	0,3947
22	0,5000	0,1100	0,1102	0,3900	0,3902
23	0,5000	0,1150	0,1154	0,3850	0,3850
24	0,5000	0,1200	0,1201	0,3800	0,3800
26	0,5000	0,1300	0,1302	0,3700	0,3700
27	0,5000	0,1350	0,1354	0,3650	0,3650
28	0,5000	0,1400	0,1405	0,3600	0,3601
29	0,5000	0,1450	0,1453	0,3550	0,3554
31	3,0000	0,9300	0,9302	2,0700	2,0703

32	0,5000	0,1600	0,1601	0,3400	0,3404
33	0,5000	0,1650	0,1653	0,3350	0,3353
34	0,5000	0,1700	0,1702	0,3300	0,3300
36	0,5000	0,1800	0,1805	0,3200	0,3205
37	0,5000	0,1850	0,1853	0,3150	0,3152
38	0,5000	0,1900	0,1900	0,3100	0,3100
39	0,5000	0,1950	0,1949	0,3050	0,3052
41	0,5000	0,2050	0,2052	0,2950	0,2948
42	0,5000	0,2100	0,2105	0,2900	0,2902
43	0,5000	0,2150	0,2153	0,2850	0,2847
44	0,5000	0,2200	0,2202	0,2800	0,2799
46	3,0000	1,3800	1,3803	1,6200	1,6201
47	0,5000	0,2350	0,2351	0,2650	0,2650
48	0,5000	0,2400	0,2400	0,2600	0,2602
49	0,5000	0,2450	0,2453	0,2550	0,2554
52	0,5000	0,2600	0,2602	0,2400	0,2398
53	0,5000	0,2650	0,2650	0,2350	0,2353
54	0,5000	0,2700	0,2702	0,2300	0,2300
57	0,5000	0,2850	0,2849	0,2150	0,2148
58	0,5000	0,2900	0,2900	0,2100	0,2104

É importante ressaltar que nos valores totais teóricos de 3 g, realizou-se sextuplicata, dividindo o total de 3 g em 6 tubos falcon com aproximadamente 500 mg em cada tubo. Em seguida, prosseguiu-se à etapa de extração, como os demais experimentos. Conseqüentemente, utilizou-se um total de 55 experimentos. Além disso, a análise por PS-MS de todos os experimentos, incluindo as replicatas reais, foi executada em triplicatas, sendo o papel cromatográfico triangular trocado em cada análise. Porém, apenas o espectro com menor ruído e maior intensidade de sinal da triplicata de cada experimento foi utilizado para a calibração multivariada. A faixa de massas selecionada nas análises por PLS foi de 100-1000.

O processamento quimiométrico foi realizado utilizando os programas PLS Toolbox 6.5 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, EUA) e Matlab 7.9 (The Mathworks Inc., Natick, MA, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização do procedimento PS-MS para análise dos extratos de ginseng

A otimização das condições necessárias para a análise dos extratos de ginseng utilizando a PS-MS foi realizada utilizando a amostra G. Os espectros analisados nesse processo de otimização foram obtidos na região de m/z 1000 a 1500, uma vez que nessa faixa de massas são observados os sinais referentes aos adutos de potássio de ginsenosídeos comuns, tais como os de m/z 1117; m/z 1147; m/z 1233 e m/z 1249 (LAI *et al.*, 2012). A leitura foi realizada no modo positivo com a varredura total de íons (modo *full scan*). Todos os parâmetros foram otimizados de forma univariada, sempre buscando o melhor compromisso entre estabilidade e intensidade dos sinais, com o mínimo nível do ruído.

A aplicação da amostra/solvente sobre o papel triangular da PS foi avaliada de três maneiras distintas, que comumente observam-se em trabalhos da literatura: (i) aplicação direta do extrato da amostra (LI *et al.*, 2013); (ii) aplicação da amostra sobre o papel com secagem de três a cinco minutos e posterior aplicação de eluente ACN/H₂O, 90% (v/v) (GARRET; REZENDE; IFA, 2013); e (iii) aplicação da amostra no papel seguida da aplicação de eluente ACN/H₂O, 90% (v/v) com 0,1% de ácido fórmico (NACCARATO *et al.*, 2013). No método (ii), 2 e 5 µL de extratos de amostra foram colocados para secar sobre o papel, com a adição subsequente de 7, 10 e 15 µL de eluente. No método (iii) os volumes de solvente adicionados também foram 7, 10 e 15 µL. A aplicação direta da amostra apresentou os melhores resultados em termos de intensidade de sinal para os ginsenosídeos de interesse, com a menor presença de ruído. As duas outras maneiras de aplicação não apresentaram bons resultados, pois nem todos os sinais dos compostos de interesse foram observados, além dos espectros apresentarem bastante ruído. Dessa forma, a aplicação direta da amostra foi selecionada para estudos posteriores.

O segundo parâmetro otimizado foi o potencial aplicado na base do papel para formação do *spray*. Foram estudados os potenciais de 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 kV, mantendo a distância entre o papel e a entrada do espectrômetro de massas em 10 mm. Os valores de potenciais de 3,0; 3,5 e 4,0 kV apresentaram ruído alto. Já os

valores de 4,5 e 5,0 kV apresentaram ruídos satisfatórios e para 4,5 kV foram observados melhores intensidades de sinal para os ginsenosídeos de interesse. Por isso, o potencial de 4,5 kV foi selecionado.

Em seguida, a distância do papel em relação à entrada do espectrômetro de massas foi avaliada em 3, 5, 7 e 10 mm. As distâncias de 3 e 5 mm apresentaram ruídos muito elevados. Já 7 e 10 mm apresentaram ruídos satisfatórios e para 7 mm foram observadas maiores sinais para os íons de interesse. Assim, a distância de 7 milímetros foi selecionada para estudos posteriores.

Em relação à quantidade de amostra aplicada sobre o papel, as três quantidades, 7 μL , 10 μL e 15 μL , apresentaram intensidade de sinal relativamente alta para os íons de interesse. Porém, os volumes de 7 μL e 10 μL apresentaram ruído mais elevado. Por isso, quantidade de 15 μL foi selecionada, uma vez que apresentou espectro mais limpo e alta intensidade de sinal para os ginsenosídeos de interesse. A Figura 4.1 apresenta um espectro após todas as condições otimizadas.

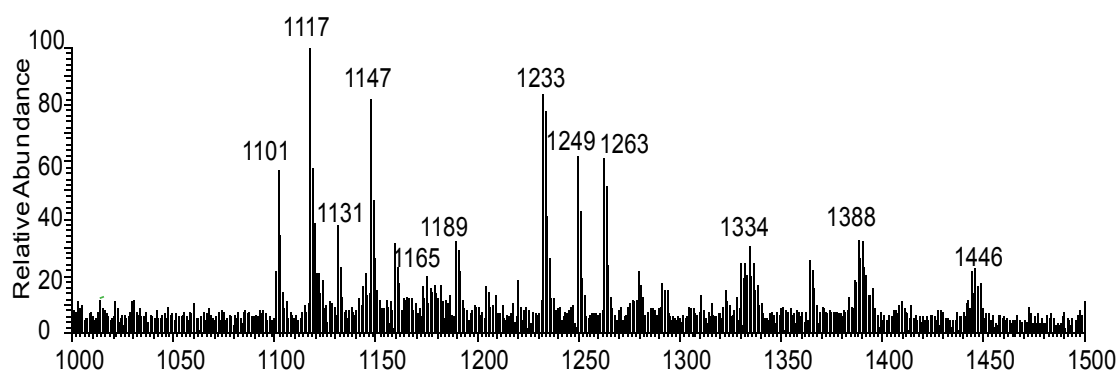


Figura 4.1 – Espectro de massas para o ginseng coreano na faixa de m/z 1000 a 1500, após todas as condições otimizadas.

4.2 Otimização da preparação dos extratos de ginseng

Duas misturas distintas de solventes, ACN/H₂O e metanol/H₂O, foram testadas para extração das amostras de ginseng (LAI *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013, NACARRATO *et al.*, 2013). Porém, o metanol não se mostrou tão eficiente quanto a acetonitrila para gerar sinais de intensidades adequadas para os ginsenosídeos. Assim, o solvente de extração utilizado foi ACN/H₂O, na proporção 75/25 (v/v).

A quantidade de amostra utilizada, 250 mg de chá para 5 mL de solvente de extração originou espectros de massas com sinais de boa intensidade. Outras tentativas de aumentar a quantidade de massa pesada de ginseng, 500 mg e 1000 mg, foram realizadas para melhora da intensidade de sinal. Porém, com o aumento do quantidade, não houve aumento significativo do sinal, por isso a menor massa foi escolhida para a otimização e execução dos experimentos posteriores.

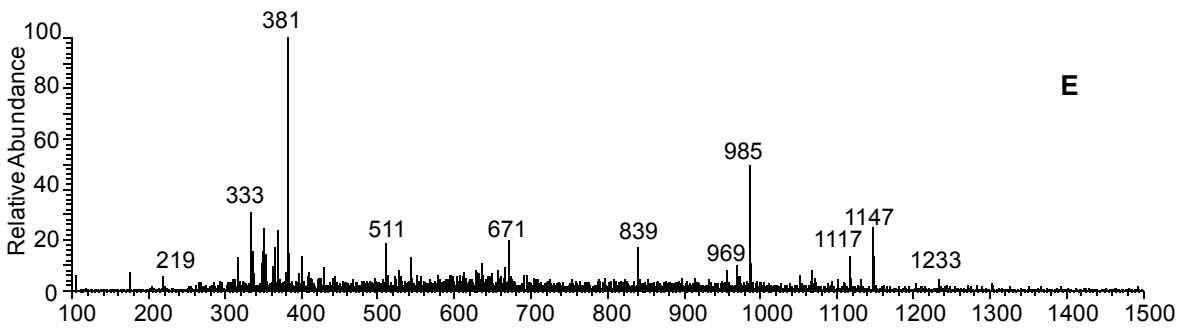
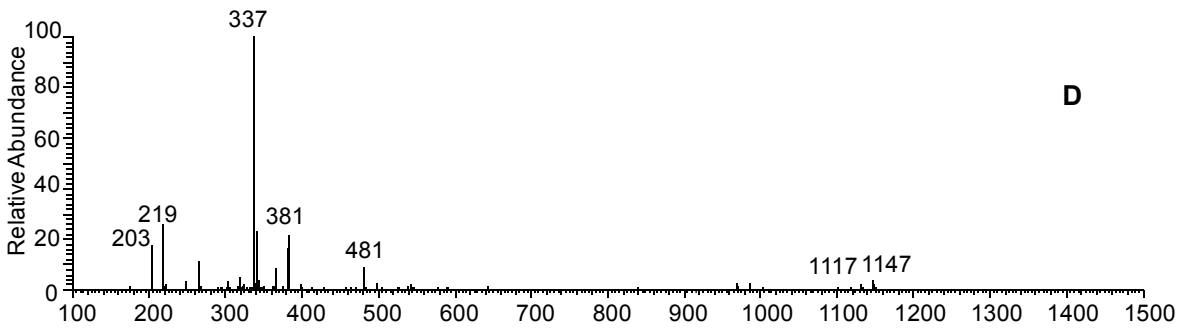
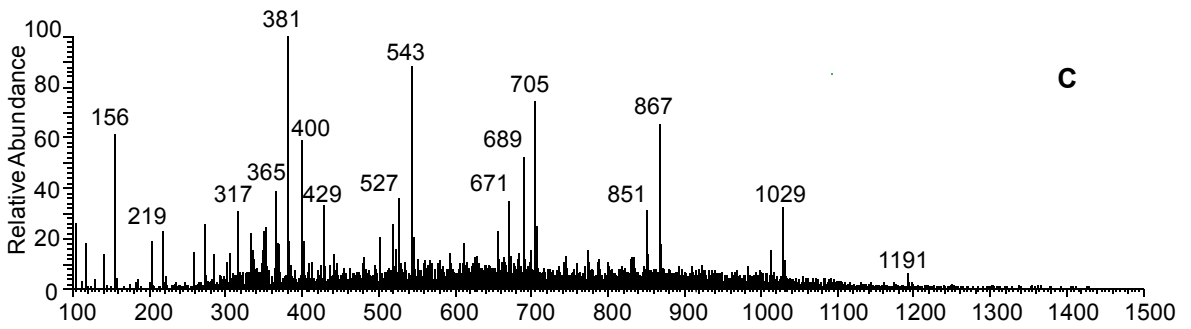
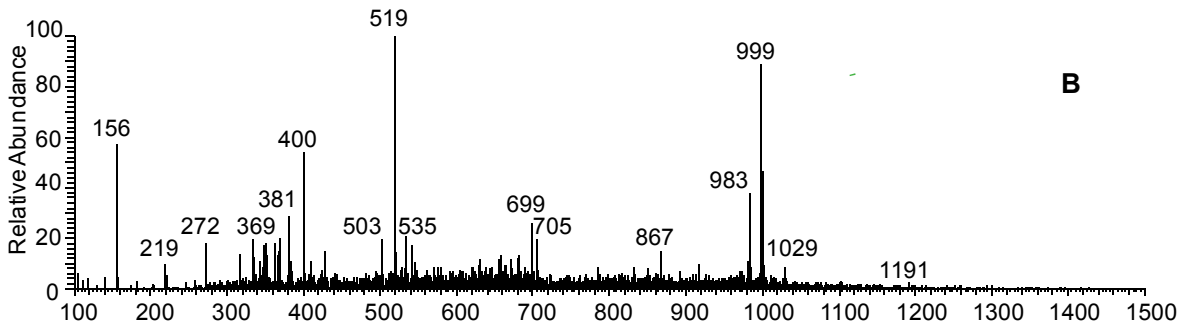
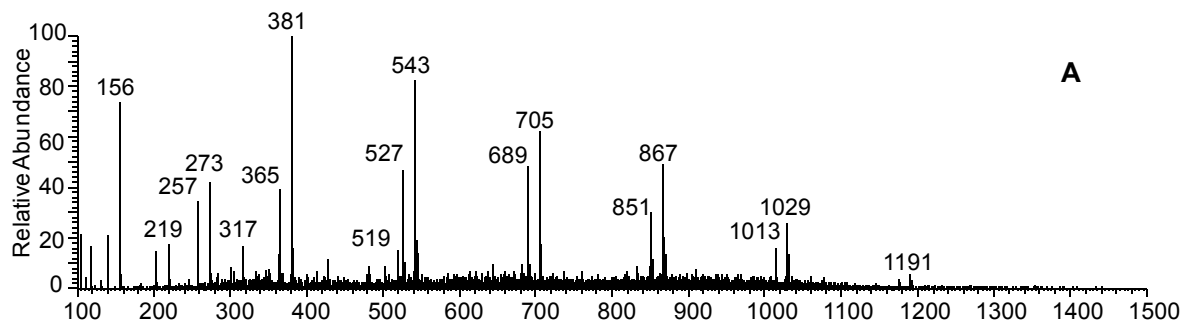
4.3 Diferenciação de ginseng brasileiro, coreano e americano por PS-MS

Cabe ressaltar que previamente à otimização das condições da PS-MS utilizando o modo positivo, foram realizados vários experimentos a fim de se avaliar os resultados obtidos no modo negativo do espectrômetro de massas. Em todos os experimentos, o modo negativo apresentou sinais pouco intensos e instáveis. Conseqüentemente, o modo positivo se mostrou mais apropriado para análise dos extratos de ginseng.

Todas as amostras dos diferentes tipos de ginseng (A a H) foram analisadas em triplicata por PS(+)-MS. Os ginsengs coreano e americano são pertencentes ao gênero *Panax*, o que sugere que possuem componentes em comum, sobretudo os ginsenosídeos, que são compostos tidos como responsáveis pelas ações terapêuticas da raiz. Já o ginseng brasileiro, sendo de um gênero diferente (*Pfaffia*), espera-se a presença de compostos diferentes em sua composição.

A Figura 4.2 apresenta os espectros de massas obtidos no modo positivo (PS(+)-MS), para as amostras de A a H, que correspondem aos diferentes tipos de ginsengs. Todos os espectros, obtidos no modo *full scan* na faixa de massas entre 100

a 1500, apresentaram sinais relativos aos adutos de sódio e potássio da glicose (m/z 203 $[M+Na]^+$ e m/z 219 $[M+K]^+$) e da sacarose (m/z 365 $[M+Na]^+$ e m/z 381 $[M+K]^+$), que comumente são encontrados em chás de plantas (DENG; YANG, 2013). O ginseng brasileiro apresentou o íon m/z 156 em todas as amostras (A, B e C), provavelmente referente ao aminoácido $[histidina+H]^+$ (DENG; YANG, 2013). Para o gênero *Pfaffia* (ginseng brasileiro) a faixa de massas entre 500-1000 apresentou íons de intensidade de sinal bastante altos para todas as amostras, destacando-se aqueles com m/z de 543, 705 e 867. Porém, para a maioria dos ginsengs do gênero *Panax* não foram observados picos com sinais significantes nessa região. Os espectros de duas amostras de ginseng americano, E e F, que apresentam picos intensos e distintos daqueles observados para o ginseng brasileiro na faixa de massas entre 500-1000, também apresentaram sinais de m/z 1117 e 1147, referentes a ginsenosídeos, sendo portanto facilmente distintos dos ginsengs brasileiros. Em todas as amostras de ginseng brasileiro estão presentes os íons de m/z 1029 e m/z 1191 nessa faixa de m/z 100 a 1500, sendo esses ausentes, nessa faixa, em todas as amostras das duas espécies do gênero *Panax*, ou seja, nos ginsengs coreano e americano. Diante disso, por meio de uma análise visual, é possível diferenciar os dois gêneros distintos *Panax* e *Pfaffia*, porém a diferenciação das duas espécies do mesmo gênero requer uma análise mais criteriosa. Por isso, investigou-se outras faixas de massas para confirmar a diferenciação entre as amostras dos gêneros *Pfaffia* e *Panax*, e permitir uma diferenciação mais objetiva das espécies *Panax*.



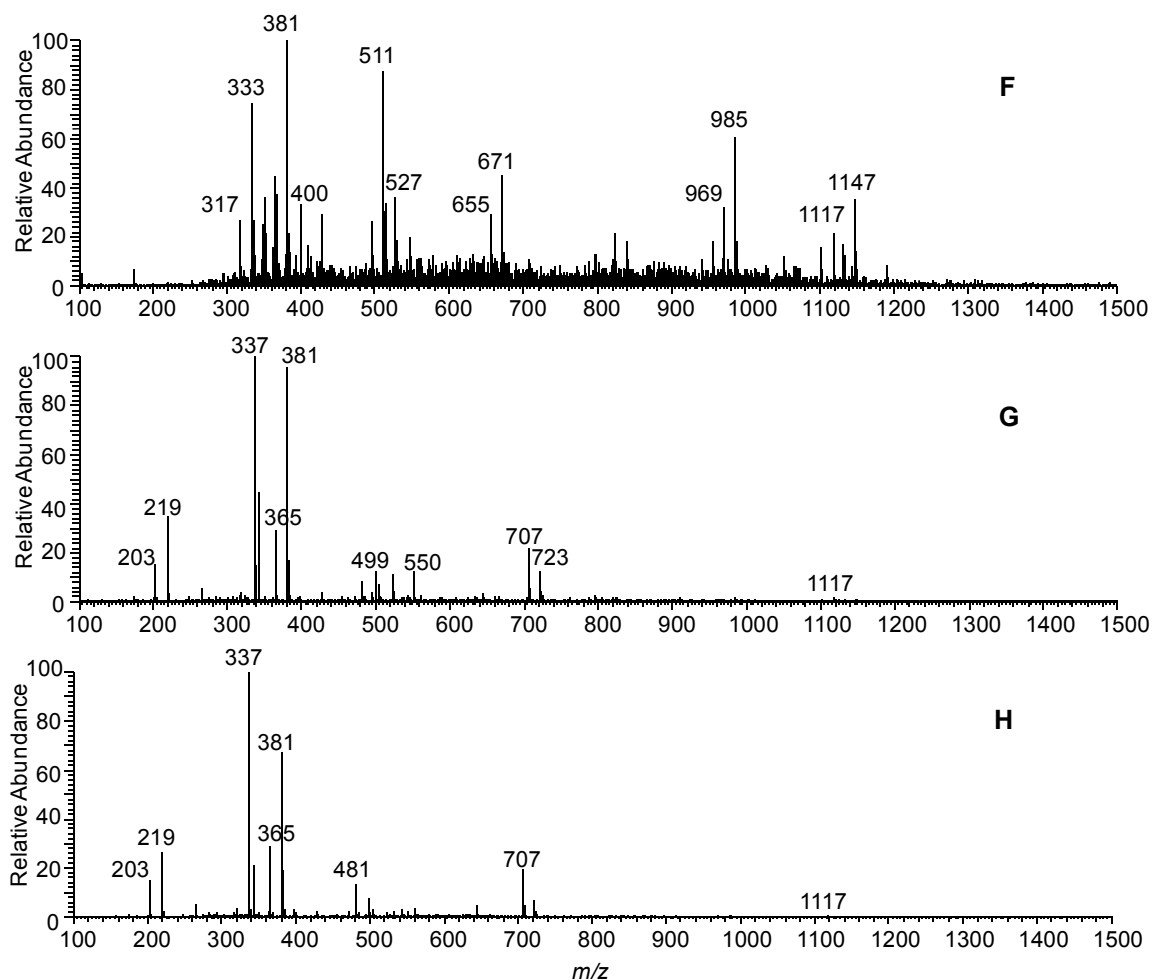


Figura 4.2 – Espectros de massas obtidos por PS-MS no modo positivo para amostras de ginsengs na faixa de m/z entre 100 a 1500. Ginsengs brasileiros (A-C); ginsengs americanos (D-F); ginsengs coreanos (G-H).

A Figura 4.3 apresenta espectros de massas representativos obtidos para os ginsengs dos gêneros *Pfaffia paniculata* (brasileiro), *Panax ginseng* (coreano) e *Panax quinquefolius* (americano) na faixa de massas de m/z 1000-1500. Como pode ser observado em trabalhos presentes na literatura, essa faixa permite identificar os ginsenosídeos comuns às diferentes espécies do gênero *Panax* (KITE *et al.*, 2003; LAI *et al.*, 2012; LIGOR; LUDWICKZUK; BUSZEWSKI, 2005). Como discutido anteriormente, nenhuma das amostras de ginseng brasileiro apresentou íons referentes

aos ginsenosídeos (Figura 4.3a). Isso corrobora a diferenciação dos dois gêneros já observadas na primeira análise visual dos espectros na faixa ampla (m/z 100-1500) de todas as amostras.

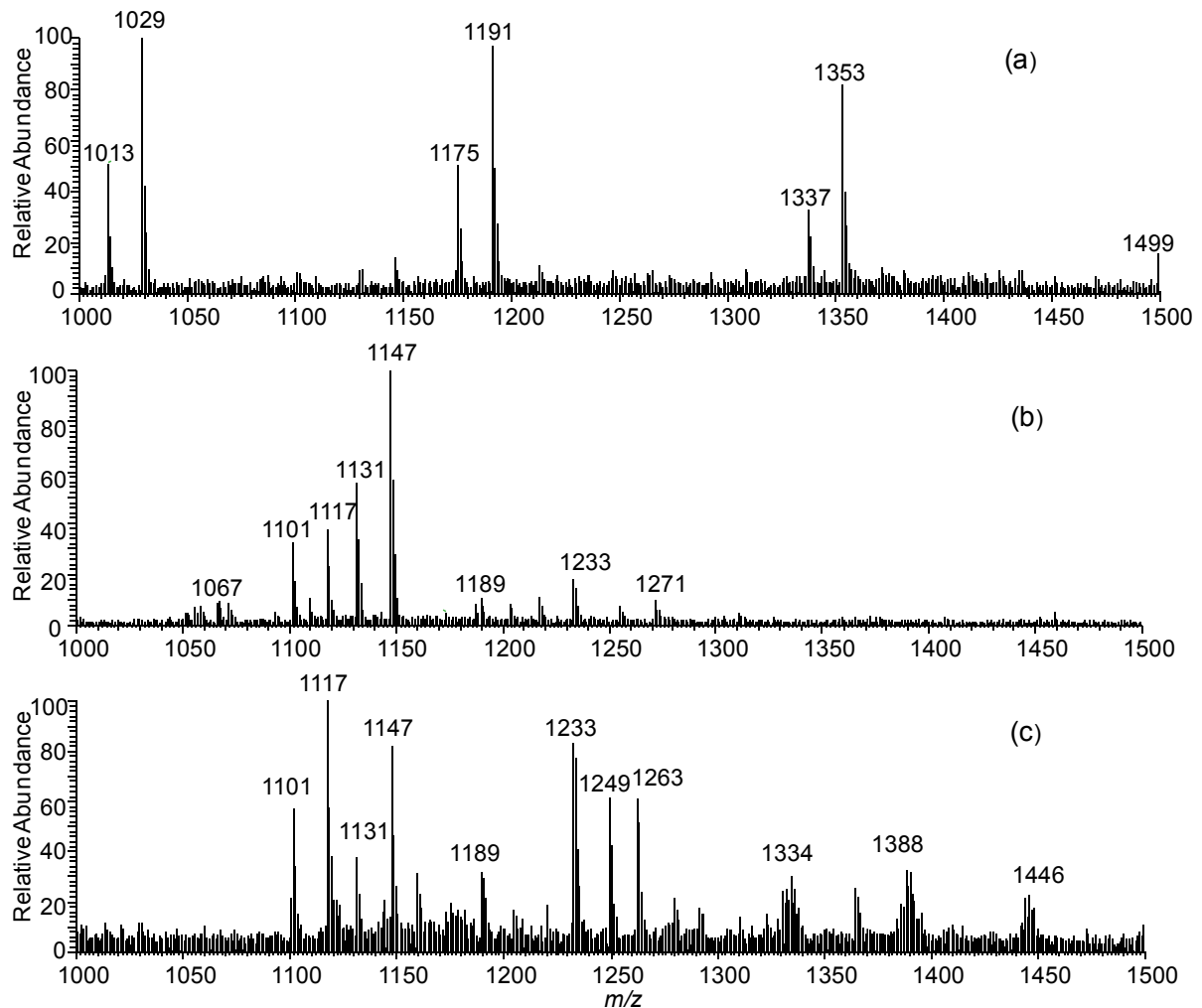


Figura 4.3 – Espectros obtidos por PS-MS na faixa de m/z entre 1000 e 1500: a) *P. paniculata* (brasileiro) – amostra A; b) *P. quinquefolius* (americano) – amostra E; c) *P. ginseng* (coreano) – amostra G.

Todos os ginsenosídeos detectados nas amostras de ginsengs do gênero *Panax* estudadas nesse trabalho são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Ginsenosídeos encontrados nas amostras de ginsengs do gênero *Panax* estudadas nesse trabalho e suas razões massa-carga, m/z , para os adutos de sódio e potássio (KITE *et al.*, 2003; LAI *et al.*, 2012. LIGOR; LUDWICKZUK; BUSZEWSKI, 2005).

Ginsenosídeo*	m/z [M+Na] ⁺	m/z [M+K] ⁺
Rb ₁	1131	1147
Rc/Rb ₂	1101	1117
Rg ₁	823	839
Rd	969	985
Ra ₃	1263	-
Ra ₁ /Ra ₂	-	1249
mRb ₁	-	1233

*Estruturas na Figura 1.6.

Como apresentado na Tabela 5, para todas as amostras do gênero *Panax*, foram identificados os ginsenosídeos Rb₁ (m/z 1131 e m/z 1147), Rc/Rb₂ (m/z 1101 e m/z 1117) como adutos de potássio e sódio (LAI *et al.*, 2012; LIGOR; LUDWICKZUK; BUSZEWSKI, 2005). Apenas na amostra D do gênero *Panax* não foi identificado o aduto de potássio do mRb₁ (m/z 1233) (LAI *et al.*, 2012). Somente para o *Panax ginseng* (coreano, amostras G e H) foram observados os adutos de potássio dos ginsenosídeos Ra₁/Ra₂ (m/z 1249) e os adutos de sódio do Ra₃ (m/z 1263) (KITE *et al.*, 2003; LAI *et al.*, 2012). Já para as espécies de *Panax quinquefolius* (americano, amostras D, E e F) não foram observados o aduto de potássio do Ra₁/Ra₂ (m/z 1249) e os adutos de sódio Ra₃ (m/z 1263) (KITE *et al.*, 2003; LAI *et al.*, 2012). Além disso, somente as três amostras de ginseng americano apresentaram picos intensos na faixa de massas de m/z 500 a 1000 referentes provavelmente aos adutos de sódio e potássio do ginsenosídeo Rg₁ (m/z 823 e m/z 839) e os adutos de sódio e potássio do Rd (m/z 969 e m/z 985, respectivamente) (LIGOR; LUDWICKZUK; BUSZEWSKI, 2005). Cabe ressaltar que os sinais atribuídos para mais de um íon, como por exemplo, o aduto de potássio do Rb₂/Rc (m/z 1117) indicam que o sinal pode ser referente aos ginsenosídeos Rb₂ e/ou Rc, uma vez que estes são isômeros.

Tabela 5 – Sinais relacionados aos ginsenosídeos observados para as amostras de ginseng brasileiro, coreano e americano.

Amostra	Rb₁	Rc/Rb₂	Rg₁	Rd	Ra₃	Ra₁/Ra₂	mRb₁
A	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-
D	1131/1147	1101/1117	823/839	969/985	-	-	-
E	1131/1147	1101/1117	823/839	969/985	-	-	1233
F	1131/1147	1101/1117	823/839	969/985	-	-	1233
G	1131/1147	1101/1117	-	-	1263	1249	1233
H	1131/1147	1101/1117	-	-	1263	1249	1233

Cabe ressaltar que as amostras de ginseng coreano (G e H) apresentaram espectros de massas (*chemical fingerprint*) semelhantes entre si, com a presença de ginsenosídeos característicos. O mesmo pode ser observado para as análises dos ginsengs americanos, uma vez que todas as amostras apresentaram os ginsenosídeos característicos da espécie, à exceção do sinal referente ao íon de m/z 1233, ausente na amostra D. Além disso, também é possível constatar que para o ginseng americano a abundância relativa do íon m/z 1117 é bem inferior a do íon m/z 1147 em todas as amostras, enquanto que no coreano as intensidades de sinal são mais próximas. Essa tendência de relação entre os sinais de m/z 1117 e 1147 para as diferentes espécies também foi observada por Lai *et al.* (2012), sendo um dos parâmetros mais utilizados para a diferenciação entre os ginsengs coreano e americano.

Para o ginseng brasileiro (do gênero *Pfaffia*), como observado na Figura 4.4, todas as amostras apresentaram espectros semelhantes na faixa de massas m/z 1000-1500. É possível constatar que nenhum desses íons citados acima, referentes aos ginsenosídeos, aparece no espectro de massas das três amostras. Os íons mais abundantes encontrados nas três amostras dessa espécie são: m/z 1029, m/z 1191 e m/z 1353. Um estudo mais detalhado seria necessário para a proposição de estruturas

moleculares para esses compostos. Espectrômetros de massas com analisadores de melhor resolução são exigidos para esse tipo de análise.

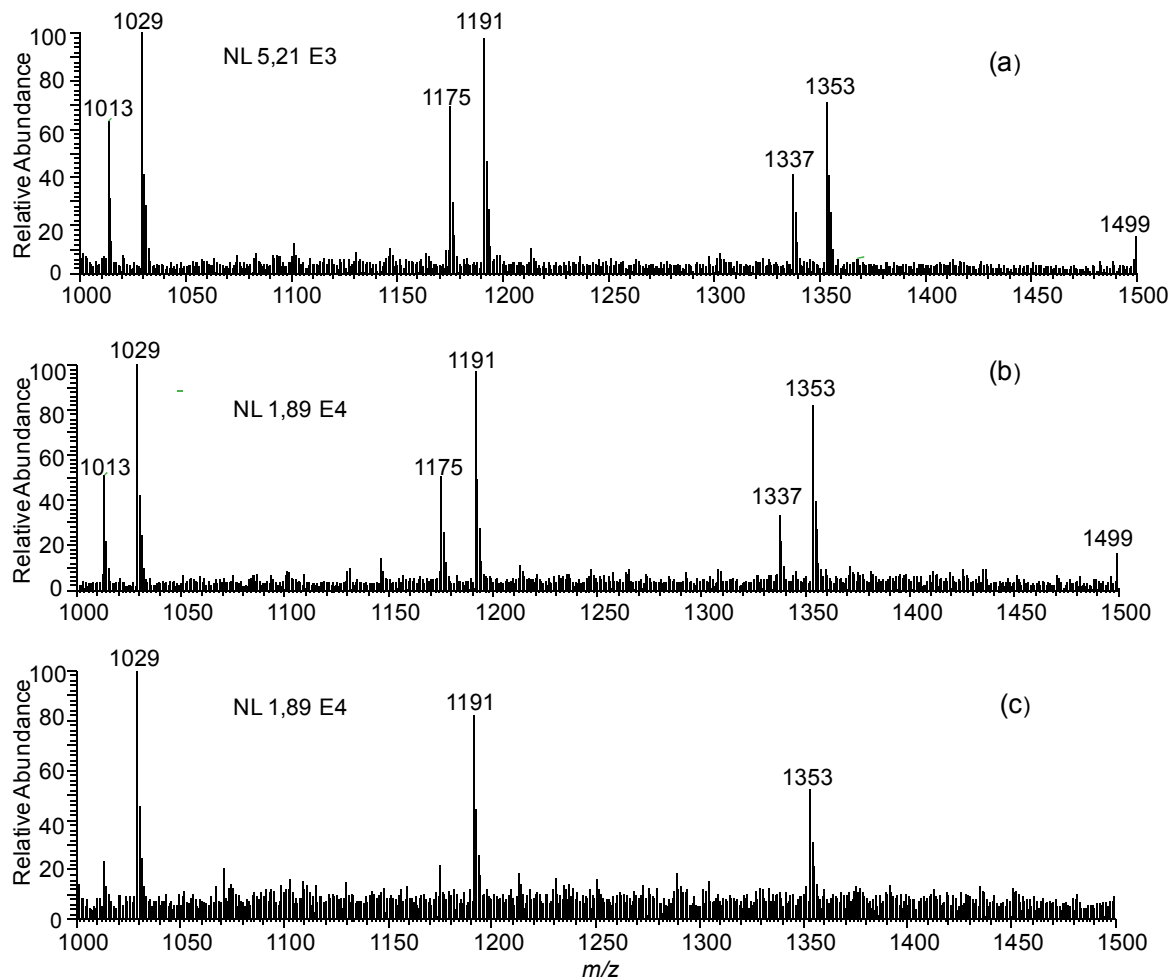


Figura 4.4 – Espectros de ginsengs brasileiros na faixa de 1000 a 1500: (a) amostra A, (b) amostra B, (c) amostra C.

4.3.1 Constatação de adulteração em uma das amostras

Durante a realização dos estudos de diferenciação dos três tipos de ginsengs e a constatação das principais características apresentadas nos respectivos *chemical fingerprinting*, observou-se que uma das amostras (amostra I) adquirida como *P. ginseng* (coreano) não apresentou resultados esperados. No espectro desta amostra obtido na faixa de m/z 100 a 1500, Figura 4.5, não são observados os ginsenosídeos

mais comuns para o gênero *Panax*. Além disso, é possível perceber os íons comuns para ginseng brasileiro encontrados com alta intensidade de sinal para o gênero *Pfaffia*, tais como de m/z 156, 543, 705, 867, 1029 e 1191. Assim, o espectro dessa amostra comercializada como ginseng coreano apresentou picos característicos de ginseng brasileiro.

Nenhuma amostra de ginseng brasileiro mostrou picos somente encontrados no ginseng coreano, o que já era de se esperar, já que, no Brasil, o preço do ginseng brasileiro é inferior ao do coreano.

O ginseng americano foi obtido apenas no Canadá, pois não foi encontrado nenhum fornecedor brasileiro desse chá. Não houve nenhuma verificação de tendência de adulteração desse tipo em outra espécie.

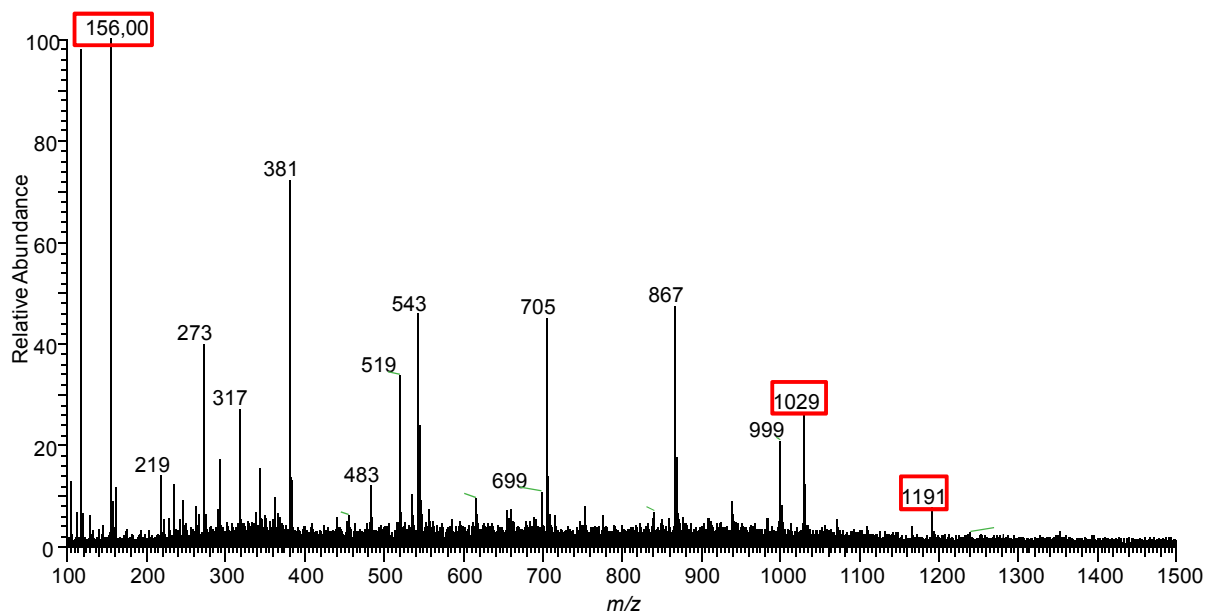


Figura 4.5 – Espectro obtido por PS-MS de uma amostra de ginseng comercializada pela internet como sendo coreano, registrado na faixa de 100 a 1500. Em vermelho, foram selecionados os principais íons de m/z , que caracterizam ginseng brasileiro e, portanto, a adulteração da amostra.

4.4 Quantificação de adulteração de ginseng brasileiro em ginseng coreano utilizando calibração multivariada

Nesta etapa do trabalho, a amostra G de ginseng coreano foi adulterada com amostra C de ginseng brasileiro, com as proporções descritas na seção 3.6 (Tabela 3). Observando os espectros obtidos para as amostras adulteradas (Figura 4.6), é possível identificar íons de m/z característicos do ginseng brasileiro, tais como os de m/z 156, 543, 705 e 867. Dessa forma, em uma primeira análise visual do espectro de massas já é possível perceber uma provável adulteração. Para a quantificação dessa adulteração, foi utilizada a calibração multivariada, método PLS. A estratégia proposta para elaboração da metodologia do modelo PLS baseou-se em um trabalho recente desenvolvido por Alves, Sena e Augusti (2014), que quantificaram adulterações em azeite de oliva extra-virgem por óleos mais baratos usando ESI-MS e calibração multivariada. Foram utilizadas 55 amostras contendo três sextuplicatas. Para a elaboração do modelo de adulteração, foram separadas 39 amostras de calibração e 16 amostras de validação, condizentes com os valores estabelecidos de dois terços de amostras de calibração e um terço de amostras de validação (BOTELHO; MENDES; SENA, 2013; PEREIRA, 2013). As amostras de calibração foram escolhidas de maneira a abranger a faixa analítica entre 7 a 58% m/m de adulteração. O método de pré-processamento do modelo foi centrar os dados na média e o número de variáveis latentes (VL) foi escolhido por validação cruzada em blocos contínuos, considerando o menor RMSECV.

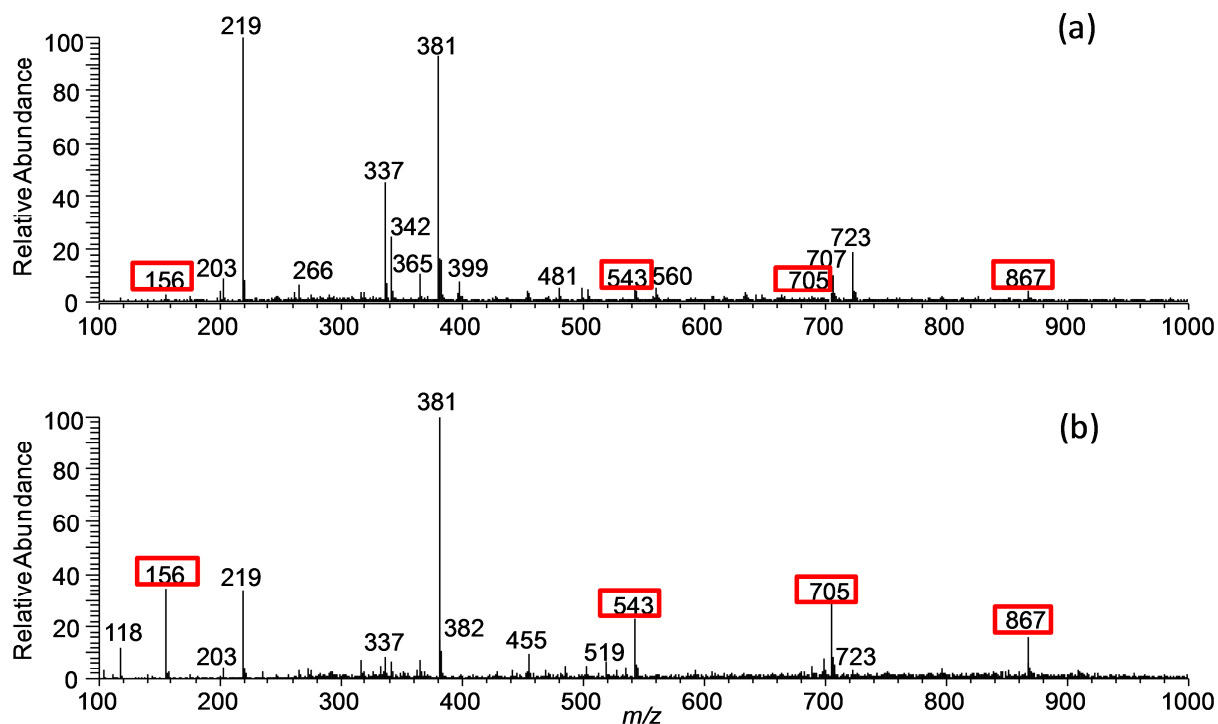


Figura 4.6- Espectros de massa obtidos por PS-MS na faixa de m/z 100 a 1000 para amostras adulteradas: a) adulteração de 7% m/m, b) adulteração de 38 % m/m. Os íons característicos do ginseng brasileiro estão destacados em vermelho.

O modelo foi otimizado pela detecção de *outliers*. Dessa forma, os dados foram submetidos a um procedimento de detecção de *outliers*, que se baseia na identificação de amostras com alta influência (*leverage*), alto resíduo espectral e alto resíduo nos valores de concentração analítica (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013). Após a remoção de amostras anômalas, um novo modelo foi gerado e realizou-se, novamente, mais uma etapa de detecção de *outliers*. Esse procedimento foi limitado a duas vezes, gerando três modelos (Tabela 6), uma vez que no terceiro modelo já não se detectou mais amostras anômalas. Esses *outliers* podem ser removidos até um limite de 2/9 (22,2%) do número total de amostras, respeitando o limite proposto pelos guias de validação brasileiros (MAPA) e internacionais (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014; BOTELHO; MENDES; SENA, 2013). O modelo PLS final (3º modelo da Tabela 6) foi gerado com 34 amostras de calibração e 14 amostras de validação. Além disso, ele

também foi construído utilizando 3 VL, explicando 64,2% da variância em X e 97,7% da variância em Y.

Tabela 6 – Otimização do modelo por meio de detecção de *outliers*.

Modelo	1º modelo	2º modelo	3º modelo
Amostras de calibração	39	36	34
Amostras de validação	16	15	14
Número de VL	3	4	3
RMSEC (%)	3,28	2,07	2,16
RMSECV (%)	5,41	4,17	3,62
RMSEP (%)	4,03	3,63	3,97

O gráfico de valores de referência *versus* valores preditos, obtido pelo modelo PLS com os dados obtidos por PS-MS na adulteração de ginseng coreano com ginseng brasileiro está apresentado na Figura 4.7.

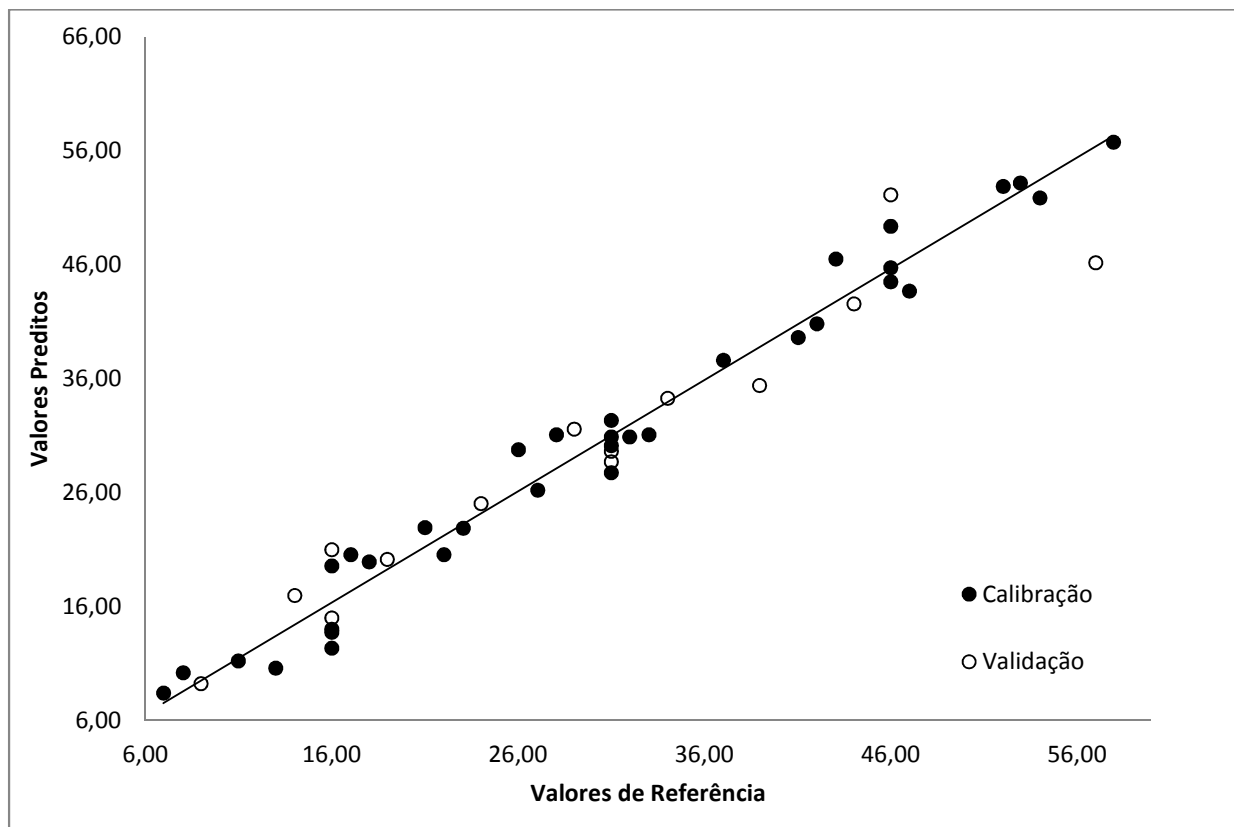


Figura 4.7 – Gráfico de valores de referência *versus* valores preditos obtidos pelo modelo PLS com os dados de PS-MS na adulteração de ginseng coreano com ginseng brasileiro.

Após o modelo ser construído, é necessário verificar se ele possui o comportamento esperado para aquilo que ele foi proposto (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). Dessa forma, figuras de mérito e testes estatísticos foram empregados para testar sua capacidade de previsão. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros estimados para o modelo PLS obtido com os dados de PS(+)-MS para amostras de ginseng coreano adulteradas com ginseng brasileiro.

Figuras de Mérito	Parâmetros	Valor	Limite
Linearidade	Normalidade	$R= 0,9972$	$R > 0,9755$
	Homocedasticidade	$p= 0,8557$	$p > 0,05$
	Independência	1,88	1,58-2,42
	r	0,99	
Viés (<i>Bias</i>)	-	$t= 0,09$	$t < 2,14$
Veracidade	RMSEC (%)	2,2	
	RMSEP (%)	4,0	
	erro médio relativo(%)	9,8	
Precisão	DPR (%)	11,5	
Seletividade	-	0,47	
Sensibilidade	-	1,55	
Sensibilidade analítica(γ)	$(\%m/m)^{-1}$	1,16	
	γ^{-1}	0,9	
Limite de detecção	$(\%m/m)$	2,8	
Limite de quantificação	$(\%m/m)$	8,6	
RPD	RPD calibração	4,0	
	RPD validação	3,5	

De acordo com a Tabela 7, o coeficiente de correlação (r), obtido pelo ajuste dos valores de referência contra valores preditos, foi um dos parâmetros utilizados para estimar a linearidade (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014; BOTELHO; MENDES; SENA, 2013). Considerando apenas o r , o modelo possui boa linearidade, já que apresentou o valor de r 0,99. Como observado na literatura, a avaliação dessa figura de mérito apenas com o parâmetro r não é considerada completa e suficiente, pois é necessário também verificar a distribuição aleatória dos resíduos (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014; BOTELHO; MENDES; SENA, 2013). Para isso, outros três testes foram realizados para comprovar a normalidade (teste RJ), homocedasticidade (teste BF) e ausência de autocorrelação (teste DW) dos resíduos. Todos eles foram feitos com 95% de confiança. O primeiro teste aplicado foi o RJ, que confirmou que os resíduos de regressão seguem uma distribuição normal, já que nesse teste os resíduos são considerados normalmente distribuídos quando o valor de R estimado for superior ao valor crítico de R (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014). A homocedasticidade dos resíduos

foi comprovada pelo teste BF. Quando os resíduos apresentam probabilidade p estimada superior ao valor de p crítico de $p > 0,05$ (ver Tabela 7), eles são considerados homocedásticos (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014). Em relação ao teste de DW, o valor de d 1,88, está dentro dos limites de aceitação (1,58-2,42), confirmando a ausência de autocorrelação dos resíduos (BOTELHO; MENDES; SENA, 2013). Assim, todos os resultados foram satisfatórios para a aleatoriedade dos resíduos. Como observado na Tabela 7, os resíduos são considerados normalmente distribuídos (Figura 4.8), homocedásticos e independentes.

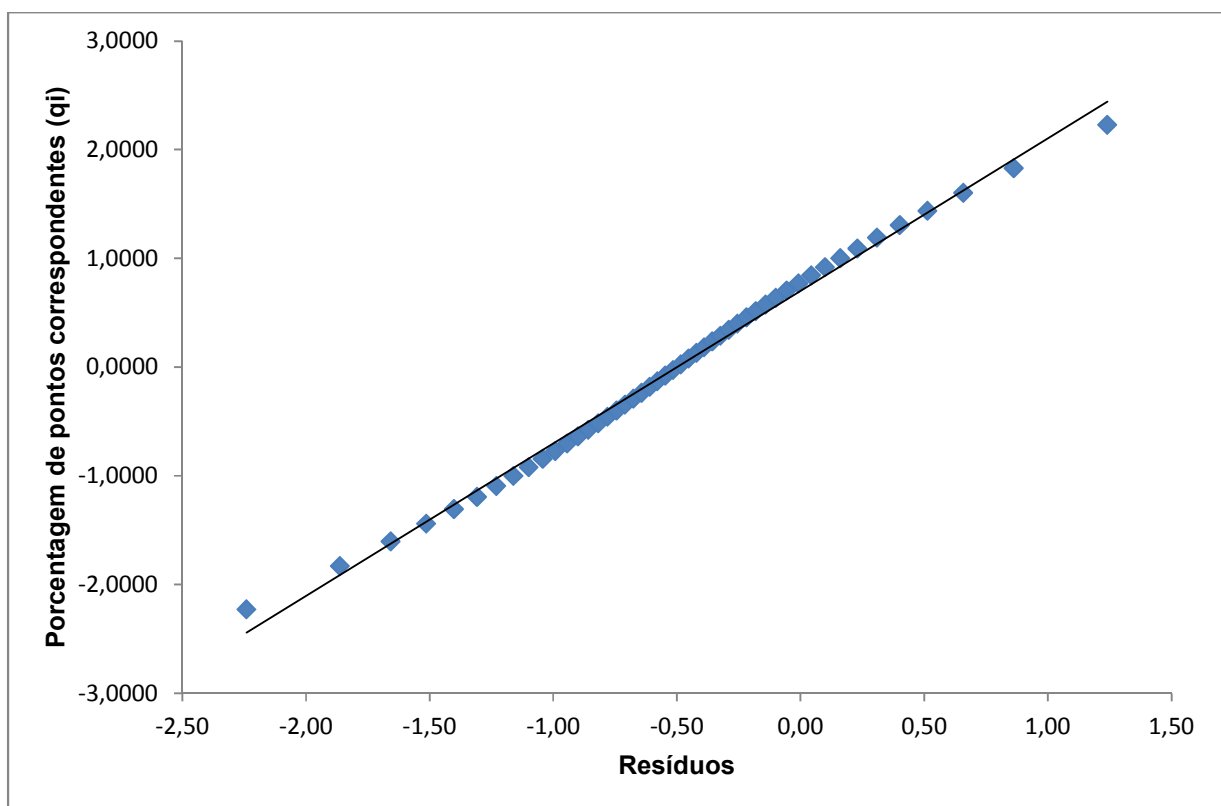


Figura 4.8 – Gráfico de distribuição normal dos resíduos, em que eles se aproximam do ajuste de uma linha reta.

A Figura 4.8 mostra o gráfico que permite avaliar o comportamento dos resíduos. Quando os dados se aproximam ao ajuste de uma linha reta, os resíduos apresentam um comportamento normal, como pode ser observado no gráfico. Se o

gráfico apresentasse algum grau de curvatura, que não é o caso, eles seguiriam uma distribuição alternativa (GUIMARÃES, 2014; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

O teste de Levene foi modificado por Brown-Forsythe é utilizado para averiguar a homocedasticidade dos resíduos, que é a variação absoluta constante de cada ponto de dados da faixa de trabalho. Já a independência, ou ausência de correlação investiga uma correlação em série dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson (GUIMARÃES, 2014; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Para verificar a veracidade do modelo, o RMSEC, o RMSEP e o erro médio relativo para amostras individuais foram calculados. O modelo apresentou valores de RMSEC e RMSEP iguais a 2,16 e 3,97% m/m, respectivamente. Não são preconizados valores de aceitação para esses dois parâmetros pela legislação. Esses valores foram considerados bons. A Figura 4.9 mostra os erros relativos para amostras individuais e apenas três amostras não se encontram dentro dos limites preconizados pelo guia de validação do MAPA, entre -20 e +10%. Em relação ao erro médio relativo para amostras individuais, o valor encontrado de 9,8% se encontra dentro dos limites preconizados pelo guia de validação do MAPA.

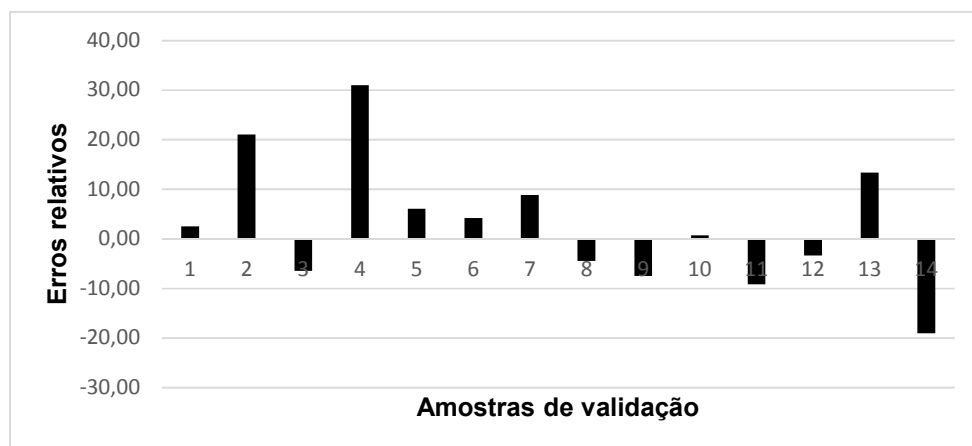


Figura 4.9 – Gráfico de erros relativos para amostras individuais do conjunto de validação.

A precisão foi averiguada pelo cálculo do desvio padrão relativo de sextuplicatas em três níveis. Essa FdM foi estimada no nível de repetitividade e os valores encontrados para cada nível foram: 21,9% para o nível de adulteração de 16,0% m/m, 5,4% para o nível de 31,0% m/m e 7,3% para o nível de 46,0% m/m. O cálculo da média dos valores de DPR desses três níveis resulta em um valor de 11,5%, que é um valor próximo ao valor de 7,5% m/m encontrado para a média dos valores de DPR em um modelo obtido por ESI-MS (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014).

O viés foi calculado usando apenas as amostras de validação. O valor do *bias* encontrado foi de 0,09 e o valor do SDV foi 4,12. O valor de *t* 0,09 obtido está abaixo do *t* crítico de 2,14. Isso indica que erros sistemáticos presentes não são significativos (VALDERRAMA, BRAGA, POPPI, 2009).

Alguns autores destacam que não há significado prático em estimar a seletividade de métodos multivariados. Assim, para esse modelo, o valor de seletividade calculado apenas representa a fração do sinal analítico, de aproximadamente 47%, que foi utilizado na previsão da adulteração (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014; BOTELHO; MENDES; SENA, 2013).

Para o cálculo da sensibilidade analítica (γ), o ruído (ϵ) precisa ser estimado. O valor do ruído (ϵ) encontrado por meio do desvio padrão combinado de 10 replicatas do branco (chá puro de ginseng coreano, sem o ginseng brasileiro) foi de 1,33. Assim, o valor calculado para sensibilidade analítica (γ), razão entre sensibilidade e ruído, foi de 1,16 e o inverso desse parâmetro (γ^{-1}), que representa a mínima diferença de concentração que o modelo é capaz de distinguir, foi 0,9% m/m considerando o ruído instrumental como única fonte de erro (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014; BOTELHO; MENDES; SENA, 2013).

O limite de detecção foi calculado pela multiplicação do inverso da sensibilidade analítica (γ^{-1}) por 3,3. O valor encontrado foi de 2,8% m/m. O limite de quantificação foi estimado de forma semelhante, pela multiplicação do inverso da sensibilidade analítica (γ^{-1}) por 10 e o valor encontrado foi de 8,6% m/m. Isso permite estabelecer uma faixa analítica de 9 a 58% mm para o método (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014).

Para verificar a predição do modelo, o RPD foi calculado. Em muitos trabalhos da literatura é ressaltado que bons modelos possuem valores de RPD superiores a 2,4 (ALVES; SENA; AUGUSTI, 2014; BOTELHO; MENDES; SENA, 2013, GUIMARÃES, 2014). Como pode ser observado na Tabela 7, o modelo apresentou valores de RPD superiores a 2,4 tanto para calibração quanto para a validação.

5 CONCLUSÕES

A metodologia utilizada se mostrou eficiente na diferenciação de chás de ginsengs provenientes de dois gêneros distintos de plantas que apresentam características bastante similares. O PS-MS também auxiliou na distinção entre duas espécies do mesmo gênero, o *P. ginseng* e *P. quinquefolius*.

A rapidez das análises, a pequena quantidade de amostra e a baixa geração de resíduos, quando comparada aos métodos cromatográficos, faz da PS-MS uma técnica vantajosa e promissora na realização de análises do tipo “*chemical fingerprint*” de amostras de ginsengs. Nesse procedimento, cada análise é realizada em segundos (de 45 a 60 segundos).

A análise baseada em “*chemical fingerprint*” utilizando a PS-MS também pode auxiliar na identificação de amostras de ginsengs coreanos adulteradas com ginseng brasileiro, que possui menor preço, contribuindo para o controle de qualidade em relação à comercialização dessas plantas. De fato, como mostram os resultados, uma adulteração de 7% (m/m) do ginseng coreano com ginseng brasileiro é suficiente para identificação de sinais típicos de substâncias exclusivas do adulterante no espectro de massas da mistura.

A quantificação da proporção de adulteração de ginseng coreano com ginseng brasileiro foi possível quando os dados obtidos por PS-MS foram tratados por quimiometria (PLS). O modelo PLS foi desenvolvido e validado por meio da avaliação de suas figuras de mérito e aplicação de testes estatísticos. Os resultados da validação mostraram que o modelo apresentou capacidade de previsão satisfatória. Além disso, o

modelo PLS se mostrou linear, sensível e com ausência de erros sistemáticos. Os resultados obtidos podem ser considerados satisfatórios, já que o modelo pôde ser validado, tendo a grande vantagem do menor tempo de análise quando comparado aos métodos descritos na literatura.

6 REFERÊNCIAS

ALVES, J. O.; SENA, M. M.; AUGUSTI, R. *Multivariate calibration applied to ESI mass spectrometry data: a tool to quantify adulteration in extra virgin olive oil with inexpensive edible oils*. **Analytical Methods**, v. 6, p. 7502-7509, 2014.

Annual Book of ASTM Standards, Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis-E1655-00, ASTM International, West Conshohocken, USA, 2000.

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

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. *Recomendações para calibração em química analítica – parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada)*. **Química Nova**, v. 25, p.856-865, 2002.

BOTELHO, B. G.; MENDES, B. A. P.; SENA, M. M. *Implementação de um método robusto para o controle fiscal de umidade em queijo minas artesanal. Abordagem metrológica multivariada*. **Química Nova**, v. 36, p.1416-1422, 2013.

BRAGA, J.E.F.; DINIZ, M.F.F.M.; ALMEIDA, R.N. *Avanços no Estudo da Atividade Ansiolítica do Panax ginseng C. A. Meyer*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 10, p. 491-499, 2011.

BREEMEN, R. B.; HUANG, C.-R.; Lu, Z.-Z.; RIMANDO, A.; Fong, H. H. S.; FITZLOFF, J. F. *Electrospray Liquid Chromatography/Mass Spectrometry of Ginsenosides*. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 3985-3989, 1995.

BRERETON, R. G. **Applied Chemometrics for Scientists**. Editora Willey, Chicester, 2007.

BRO, R.; ANDERSEN, C. M. *Theory of net analyte signal vectors in inverse regression*. **Journal of Chemometrics**, v. 17, p. 646-652, 2003.

CATHARINO, R. R.; HADDAD, R.; CABRINI, L. G.; CUNHA, I. B. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N. *Characterization of vegetable oils by Electrospray ionization Mass*

Spectrometry Fingerprinting: Classification, Quality, Adulteration, and Aging. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 7429-7433, 2005.

CHATTOPADHYAY, M.; VERMA, N. K.; MOHANTY, A. K. *Composite field approximations for ion traps with apertures on electrodes.* **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 282, p. 112-122, 2009.

CHEN, H. W.; HU, B.; ZHANG, X. *Principle and Application of Ambient Mass Spectrometry for Direct Analysis of Complex Samples.* **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 38, p. 1069-1088, 2010.

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

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

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. *Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial.* **Química Nova**, v. 22, 1999.

FERREIRA, M.H.; BRAGA, J.W.B.; SENA, M.M. *Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy.* **Microchemical Journal**, v. 109, p. 158-164, 2013.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S.F.; Whitehouse, C.M. *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.* **Science**, v. 246, p. 64, 1989.

FUZZATI, N.; GABETTA, B.; JAYAKAR, K.; PACE, R.; PETERLONGO, F. *Liquid chromatography – electrospray mass spectrometric identification of ginsenosides in Panax ginseng roots.* **Journal of Chromatography A**, v. 854, p. 69-79, 1999.

GARRETT, R.; REZENDE, C.M.; IFA, D.R. *Coffee origin discrimination by paper spray mass spectrometry and direct coffee spray analysis*. **Analytical Methods**, v.5, p. 5944-5948, 2013.

HADDAD, R.; SPARRAPAN, R.; KOTIAHO, T.; EBERLIN, M. N. *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization-Membrane Interface Mass Spectrometry for Direct Analysis of Solutions Constituents*. **Analytical Chemistry**, v. 80, p.898-903, 2008.

HOFFMAN, E., STROOBANT, V. **Mass Spectrometry – Principles and Applications**. 3ª Edição, Editora Wiley, Chichester, 2007.

INTERNACIONAL CHEMOMETRICS SOCIETY (ICS). Disponível em < <http://www.namics.nysaes.cornell.edu/> >. Acesso 19/09/2014.

GUIMARÃES, C. C. **Desenvolvimento e validação de modelos quimiométricos baseados em espectroscopia no infravermelho próximo para a predição de parâmetros do caldo e da biomassa do sorgo sacarino visando à produção de etanol**. 2014. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)- Instituto de Ciências Exatas. Universidade Federal de Minas Gerais.

KETTANEH, N.; BERGLUND, A.; WOLD, S. *PCA and PLS with very large data sets*. **Computational Statistics & Data Analysis**, v. 48, p. 69-85, 2005.

KISSINGER, P.T. *Thinking about dried blood spots for pharmacokinetic assays and therapeutic drug monitoring*. **Bioanalysis**, v. 3, p. 2263-2266, 2011.

KITE, G. C.; HOWES, M.-J. R.; LEON, C. J.; SIMMONDS, M. S. J. *Liquid chromatography/mass spectrometry of malonyl-ginsenosides in the authentication of ginseng*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, p. 238-244, 2003.

KRISHNAN, A.; WILLIAMS, L. J.; MCINTOSH, A. R.; ABDI, H. *Partial Least Squares (PLS) methods for neuroimaging: A tutorial and review*. **NeuroImage**, v. 56, p. 455-475, 2011.

LAI, Y.-H.; SO, P.-K.; LO, S. C.-L.; NG, E.W.Y.; POON, T.C.W.; YAO, Z.-P. *Rapid differentiation of Panax ginseng and Panax quinquefolius by matrix-assisted laser*

desorption/ionization mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, v. 753, p. 73-81, 2012.

LAW, W. S.; CHEN, H. W.; BALABIN, R.; BERCHTOLD, C.; MEIER, L; ZENOBI, R. *Rapid fingerprint and classification of extra virgin olive oil by microjet sampling and extractive electrospray ionization mass spectrometry. Analyst*, v. 135, p. 773-778, 2010.

LI, A.; WEI, P.; HSU, H.-C.; COOKS, R.G. *Direct analysis of 4-methylimidazole in foods using paper spray mass spectrometry. Analyst*, v. 138, p. 4624-4630, 2013.

LIGOR, T.; LUDWICZUK, A.; BUSZEWSKI, B. *Isolation and determination of ginsenosides in American ginseng leaves and root extracts by LC-MS. Analytical Bioanalytical Chemistry*, v. 383, p. 1096-1105, 2005.

LORDEIRO, R. A. **Construção de uma fonte EASI-MS (Easy Ambient Sonic-Spray ionization) para análise direta de superfícies e sua aplicação em amostras de interesse forense.** 2011. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)- Instituto de Ciências Exatas. Universidade Federal de Minas Gerais.

MAGALHÃES, W.V. **Avaliação da atividade moduladora da expressão de proteínas de estresse de extratos de *Anadenanthera colubrina*, *Pfaffia paniculata* e *Rhodiola rósea* para aplicação cosmética antienvhecimento.** 2012. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

MANICKE, N.E.; YANG, Q.; WANG, H.; ORADU, S.; OUYANG, Z.; COOKS, R.G. *Assessment of paper spray ionization for quantitation of pharmaceuticals in blood spots. International Journal of Mass Spectrometry*, v. 300, p. 123-129, 2011.

MENDONÇA, J. C. F.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; NUNES, M. *Chemical characterisation of non-defective green arabica and robusta coffees by electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS). Food Chemistry*, v. 111, p. 490-497, 2008.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), *Manual de Garantia da Qualidade*, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2011.

NACCARATO, A.; MORETTI, S.; SINDONA, G.; TAGARELLI, A. *Identification and assay of underivatized urinary acylcarnitines by paper spray tandem mass spectrometry*. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 8267-8276, 2013.

NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMA, S.; KIZU, H.; WADA, Y. *Pfaffosides and Nortriterpenoid Saponins from Pfaffia Paniculata*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 139-142, 1984.

Paul, W. and Steinwedel, H.S. (1960) US Patent, 2939952 apud HOFFMAN, E., STROOBANT, V. **Mass Spectrometry – Principles and Applications**. 3ª Edição, Editora Wiley, Chichester, 2007.

PEREIRA, L. S. A. **Transferência de calibração de misturas de pós para comprimidos intactos: um novo uso em análise farmacêutica para uma ferramenta quimiométrica conhecida**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)- Instituto de Ciências Exatas. Universidade Federal de Minas Gerais.

PYREK, J.S. *Mass spectrometry at low and high mass*. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 1, p. 399-409, 1997.

RODRIGUES, M.V.N.; SOUZA, K.P.; REHDER, V.L.G.; VILELA, G.F.; MONTANARI JÚNIOR, Í.; FIGUEIRA, G.M.; RATH, S. *Development of an analytical method for the quantification of pfaffic acid in Brazilian ginseng (Hebanthe eriantha)*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 77, p. 76-82, 2013.

SHEN, L.; ZHANG, J.; YANG, Q.; MANICKE, N.E.; OUYANG, Z. *High throughput paper spray mass spectrometry analysis*. **Clinica Chimica Acta**, p. 1-6, 2012.

SHIEA, J.; HUANG, M-Z.; HSU, H-J.; LEE, C-H.; YUANG, C-H.; BEECH, I.; SUNNER, J. *Electrospray-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for direct ambient analysis of solids*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 3701-3704, 2005.

SONG, Y.; WU, G.; SONG, Q.; COOKS, R. G.; QUYANG, Z.; PLASS, W. R. *Novel Linear Ion Trap Mass Analyzer Composed of Four Planar Electrodes*. **American Society for Mass Spectrometry**, v. 17, p. 631-639, 2006.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. *A procedure to assess linearity by ordinary least squares method*. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p.25-35, 2005.

SOUZA, P. P.; OLIVEIRA, L. C. A., CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, D. V.; SIEBALD, H. G. L.; AUGUSTI, R. *Brazilian cachaça: "Single shot" typification of fresh alembic and industrial samples via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting*. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1064-1068, 2009.

STAFFORD, G. C.; KELLEY, P. E.; SYKA, J. E. P.; REYNOLDS, W. E.; TODD, J. F. J. *Recent improvements in and Analytical Applications of Advanced Ion Trap Technology*. **International Journal of Mass Spectrometry and Ions Processes**, v. 60, p. 85-98, 1984.

SU, Y.; WANG, H.; LIU, J.; WEI, P.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. *Quantitative paper spray mass spectrometry analysis of drugs of abuse*. **Analyst**, v.138, p. 4443-4447, 2013.

SUN, J.; CHEN, P. *Differentiation of Panax quinquefolius grown in the USA and China using LC/MS-based chromatographic fingerprinting and chemometric approaches*. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 1877-1889, 2011.

TAKATS, Z.; WISEMAN, J. M.; GOLOGAN, B.; COOKS, R. G. *Mass Spectrometry Sampling under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization*. **Science**, v. 306, p. 471-473, 2004.

Thermo Fisher Scientific – **MS Software Xcalibur versão 2.0.7**.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W.B.; POPPI, J. *Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada*. **Química Nova**, v. 32, p. 1278-1287, 2009.

VENTER, A. R.; DOUGLASS, K. A.; SHELLEY, J. T.; HASMAN, G.Jr.; HONARVAR, E. *Mechanisms of Real-Time, Proximal Sample Processing during Ambient Ionization Mass Spectrometry*. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 233-249, 2014.

WANG, H.; LIU, J.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. *Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry*. **Angewandte Chemie**, v. 48, p. 1-5, 2009.

WANG, H.; MANICKE, N.E.; YANG, Q.; ZHENG, L.; SHI, R.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. *Direct Analysis of Biological Tissue by Paper Spray Mass Spectrometry*. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 1197-1201, 2011.

WILLIAMS, P.; NORRIS, K. *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. 2^a Edição, Editora American Association of Cereal Chemists, St. Paul, USA, 2001.

YAN, X.; AUGUSTI, R.; LI, X.; COOKS, R.G. *Chemical Reactivity Assessment Using Reactive Paper Spray Ionization Mass Spectrometry: The Katritzky Reaction*. **ChemPlusChem**, v. 78, p. 1142-1148, 2013.

ZENOBI, R.; KNOCHENMUSS, R. *Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry*. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 17, p. 337-366, 1998.

ZHANG, Z.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. *Paper spray: a simple and efficient means of analysis of different contaminants in foodstuffs*. **Analyst**, v. 137, p. 2556-2558, 2012.