

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARCELO CAETANO ALEXANDRE MARCELO

**IDENTIFICAÇÃO DA PROCEDÊNCIA GEOGRÁFICA DA ERVA  
MATE (*Ilex paraguariensis*) MEDIANTE ANÁLISE ELEMENTAR,  
REFLEXÃO NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E QUIMIOMETRIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre em Química

Profa. Dra. Dirce Pozebon

Orientadora

Prof. Dr. Marco Flores Ferrão

Co-orientador

Porto Alegre, outubro de 2013.

*"Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber."*

Confúcio, Analectos.

## Agradecimentos

Aos meus orientadores, Dirce Pozebon e Marco Flores Ferrão, que aguentaram inúmeras batidas na porta com a típica pergunta “Tem um tempinho?”. Agradece-los também pelo conhecimento passado e pelas ricas discussões, e também pelo amadurecimento profissional e pessoal. Pelos conselhos, pelas risadas e, acima de tudo, pela amizade.

Ao Prof. Dr. Valderi Dressler, a Tielle Almeida e ao Laboratório de Espectrometria Atômica da UFSM pela ajuda, contribuição e disponibilidade na construção deste trabalho e pela estrutura fornecida na obtenção de informações indispensáveis para este trabalho. À UFRGS e órgãos de fomento, pela estrutura e pela ajuda financeira necessária na realização do trabalho. Às pessoas que ajudaram na obtenção das amostras, Marquit, Marco e Karin.

Ao MAPA pela estrutura fornecida para a análise das amostras e ao FFA. Me. Tiago Charão, pela amizade, jogatinas e oportunidades para realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório. À Juce (com ou sem o “s”), à Correa, Cerveira, Pamela e ao Mateus pelos diversos momentos de “bagunça” no laboratório. Ao colega Guilherme Scheffler pelas discussões sobre nossa área e sobre nossos trabalhos. A todos os demais colegas de laboratório D217 e D216 também.

À Camila Martins, grande amiga e todos os seis, quem sabe oito, braços deste trabalho. Pela sua ajuda na realização deste, pelas fugas no cafezinho, pelos engates e correrias com as amostras nos braços pelo centro de Porto Alegre. E é claro, pela amizade.

Aos meus amigos, Carlo, Tim, Meia, Richter e Ricardo que compreenderam meu afastamento natural para realização deste trabalho e que sempre estiveram sempre ali no aguardo.

A minha família, pelo suporte emocional, financeiro e tudo mais que tornou possível esse caminho.

À Natália, que suportou uma pessoa muito carrancuda, chata e rabugenta, principalmente nos momentos finais do trabalho. Pelo amor, pelo carinho, pela cumplicidade e compreensão.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
2.1 ERVA MATE .....	18
2.2 COMPOSIÇÃO DA ERVA MATE .....	21
2.3 ANÁLISE DE PROCEDÊNCIA .....	26
2.4 ANÁLISE ELEMENTAR .....	30
2.4.1 Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) .....	30
2.4.2 Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) .....	31
2.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO .....	32
2.6 ANÁLISE MULTIVARIADA .....	34
2.6.1 Métodos de Reconhecimento de Padrões Não Supervisionados ..	34
2.6.1.1 Análise Hierárquica por Agrupamentos (HCA) .....	34
2.6.1.2 Análise por Componentes Principais (PCA) .....	36
2.6.2 Métodos de Reconhecimento de Padrões Supervisionados .....	37
2.6.2.1 Método do k-ésimo vizinho mais próximo (kNN) .....	37
2.6.2.2 <i>Soft Independent Modeling Class Analogy (SIMCA)</i> .....	37
2.6.2.3 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) .....	38

2.6.2.4	Análise Discriminante por Máquinas de Vetor de Suporte (SVM-DA).....	39
3.	PARTE EXPERIMENTAL .....	43
3.1	INSTRUMENTAÇÃO .....	43
3.2	MATERIAIS E REAGENTES .....	45
3.3	AMOSTRAS .....	46
3.4	PREPARO DE AMOSTRAS .....	47
3.5	ANÁLISE MULTIVARIADA .....	48
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
4.1	REFLEXÃO NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO.....	50
4.2	QUANTIFICAÇÃO DOS ELEMENTOS INVESTIGADOS .....	61
4.2.1	Concentração dos Elementos e Análise Univariada .....	64
4.2.2	Análise Multivariada .....	77
4.3	ANÁLISE DE PROCEDÊNCIA E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	90
5.	CONCLUSÕES .....	95
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da América do Sul mostrando as regiões onde a erva mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) é nativa. 1 - Argentina; 2 - Brasil; 3 - Paraguai; 4 - Uruguai. <sup>1</sup> .....	16
Figura 2. Fotografia de uma árvore nativa de erva mate.....	18
Figura 3. Fluxograma simplificado dos processos de produção da erva mate utilizada no preparo de infusões.....	20
Figura 4. Compostos bioativos na erva mate: A - saponina, B - teobromina, C - cafeína, D - ácido clorogênico, E - 4,5-dicafeoilquinico.....	22
Figura 5. Representação da reflexão especular e difusa. ....	34
Figura 6. Exemplo de separação segundo o SVM-DA, no qual hiperplano ótimo é indicado pela cor verde. <sup>96</sup> .....	40
Figura 7. (a) Hiperplano com margem pequena e (b) hiperplano com margem máxima. <sup>96</sup> .....	41
Figura 8 Transformação de um problema não linearmente separável em um problema linearmente separável. <sup>96</sup> .....	42
Figura 9. Amostra de erva mate moída sobre o espectrômetro de infravermelho para obtenção do espectro de reflexão. ....	45
Figura 10. Influência do tamanho das partículas da erva mate na obtenção dos espectros por NIR, segundo os escores da PCA. ....	51
Figura 11. Espectros normalizados das 54 amostras de erva mate obtidos no NIR, em destaque a faixa utilizada para a análise multivariada. ....	52
Figura 12. Espectros normalizados e derivados (primeira ordem) para as 54 amostras de erva mate, em destaque a faixa utilizada para a análise multivariada. ....	52
Figura 13. Dendrograma das amostras de erva mate segundo a reflexão no intervalo de 4435 a 4318 $\text{cm}^{-1}$ , no NIR. O conjunto de dados foi normalizado, derivados em primeira ordem, e posteriormente centrados na média. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.....	54
Figura 14. Escores no espaço da três primeiras componentes principais para o intervalo de 4435 a 4318 $\text{cm}^{-1}$ . O conjunto de dados foi normalizado, derivados em	

primeira ordem, e posteriormente centrados na média. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai. ....	55
Figura 15. Escores no espaço das três primeiras componentes principais para o intervalo de 4435 a 4318 $\text{cm}^{-1}$ . O conjunto de dados foi normalizado, derivados em primeira ordem e posteriormente centrados na média. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai. ....	56
Figura 16. Classificação por PLS-DA das amostras de erva mate de acordo com o grupo de treinamento para a Argentina, mediante o espectro de reflexão no NIR no intervalo de 4435 a 4318 $\text{cm}^{-1}$ . Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. O conjunto de dados foi normalizado, aplicou-se a primeira derivada, e posteriormente centrou-se na média. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai. ....	59
Figura 17. Classificação por PLS-DA das amostras de erva mate de acordo com o grupo de treinamento para o Brasil, mediante o espectro de reflexão no NIR no intervalo de 4435 a 4318 $\text{cm}^{-1}$ . Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. O conjunto de dados foi normalizado, aplicou-se a primeira derivada, e posteriormente centrou-se na média. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai. ....	60
Figura 18. Classificação por PLS-DA das amostras de erva mate de acordo com o grupo de treinamento para o Uruguai, mediante o espectro de reflexão no NIR no intervalo de 4435 a 4318 $\text{cm}^{-1}$ . Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. O conjunto de dados foi normalizado, aplicou-se a primeira derivada, e posteriormente centrou-se na média. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai. ....	60
Figura 20. Dispersão Whisker-Box mostrando a amplitude das concentrações dos elementos nas amostras de erva mate. As linhas horizontais de cada dispersão são, de baixo para cima: o valor mínimo, o desvio padrão inferior, a mediana, o desvio padrão superior e o valor máximo. O ponto central marcado em cada caixa é a média aritmética e os demais pontos são as amostras. ....	72
Figura 21. Dispersão Whisker-Box mostrando a amplitude das concentrações dos elementos nas amostras de erva mate. As linhas horizontais de cada dispersão são, de baixo para cima: o valor mínimo, o desvio padrão inferior, a mediana, o desvio	

padrão superior e o valor máximo. O ponto central marcado em cada caixa é a média aritmética e os demais pontos são as amostras. ....	73
Figura 22. Dispersão Whisker-Box mostrando a amplitude das concentrações dos elementos nas amostras de erva mate. As linhas horizontais de cada dispersão são, de baixo para cima: o valor mínimo, o desvio padrão inferior, a mediana, o desvio padrão superior e o valor máximo. O ponto central marcado em cada caixa é a média aritmética, e os demais pontos são as amostras. ....	74
Figura 23. Dispersão Whisker-Box mostrando a amplitude das concentrações dos elementos nas amostras de erva mate. As linhas horizontais de cada dispersão são, de baixo para cima: o valor mínimo, o desvio padrão inferior, a mediana, o desvio padrão superior e o valor máximo. O ponto central marcado em cada caixa é a média aritmética e os demais pontos são as amostras. ....	75
Figura 24. Dispersão Whisker-Box mostrando a amplitude das concentrações de dos elementos nas amostras de erva mate. As linhas horizontais de cada dispersão são, de baixo para cima: o valor mínimo, o desvio padrão inferior, a mediana, o desvio padrão superior e o valor máximo. O ponto central marcado em cada caixa é a média aritmética e os demais pontos são as amostras. ....	76
Figura 25. Escores no espaço das três primeiras componentes principais para as concentrações dos elementos determinados mediante a técnica de ICP OES, com exceção de Sr e Fe. Os dados foram autoescalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai. ....	79
Figura 26. Pesos no espaço das três primeiras componentes principais para as concentrações dos elementos determinados mediante a técnica de ICP OES, com exceção de Sr e Fe. Os dados foram autoescalados. ....	80
Figura 27. Classificação por PLS-DA das amostras de erva mate de acordo com o grupo de treinamento para a Argentina, através das concentrações dos elementos obtidos mediante ICP OES. Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai. ....	82
Figura 28. Classificação por PLS-DA das amostras de erva mate de acordo com o grupo de treinamento para o Brasil, através das concentrações dos elementos obtidos mediante ICP OES. Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi	

utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.....	82
Figura 29. Classificação por PLS-DA das amostras de erva mate de acordo com o grupo de treinamento para o Uruguai, através das concentrações dos elementos obtidos mediante ICP OES. Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.....	83
Figura 30. Classificação por PLS-DA das amostras de erva mate de acordo com o grupo de treinamento para o Paraguai, através das concentrações dos elementos obtidos mediante ICP OES. Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.....	83
Figura 31. Classificação por PLS-DA das amostras de erva mate de acordo com o grupo de treinamento para o Argentina, através das concentrações de todos os elementos determinados (exceto Li e Be). Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai. ....	86
Figura 32. Classificação por PLS-DA das amostras de erva mate de acordo com o grupo de treinamento para o Brasil, através das concentrações dos todos os elementos determinados (exceto Li e Be). Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai. ....	86
Figura 33. Classificação por PLS-DA das amostras de erva mate de acordo com o grupo de treinamento para o Uruguai, através das concentrações dos todos os elementos determinados (exceto Li e Be). Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai. ....	87
Figura 34. Classificação PLS-DA das amostras de erva mate de acordo com o grupo de treinamento para o Paraguai, através das concentrações dos todos os elementos determinados (exceto Li e Be). Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros instrumentais e condições utilizados nas determinações por ICP OES e ICP-MS. ....	44
Tabela 2. Nebulizador, técnica de medição e diluição da solução da amostra utilizados para cada elemento determinado. ....	44
Tabela 3. Identificação das amostras de erva mate analisadas, país de origem e informações retiradas do rótulo. ....	47
Tabela 4. Limite de detecção (LD) dos elementos determinados por ICP-MS. ....	62
Tabela 5. Limite de detecção (LD) dos elementos determinados por ICP OES. ....	62
Tabela 6. Concentrações dos elementos encontrados mediante ICP-MS em uma amostra de erva mate adicionada de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ dos elementos antes de ser decomposta. Os desvios padrão são de três determinações em paralelo. ....	63
Tabela 7. Concentrações dos elementos encontrados mediante ICP OES em uma amostra de erva mate adicionada dos elementos de interesse antes de ser decomposta. Os desvios padrão são de três determinações em paralelo. ....	64
Tabela 8. Concentrações médias dos elementos encontrados na erva mate. ....	65
Tabela 9. Valores encontrados de F para a ANOVA para cada elemento. ....	67
Tabela 10. Concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) dos elementos nas amostras de erva mate, obtidas mediante a técnica de ICP OES. ....	68
Tabela 11. Concentrações ( $\text{ng g}^{-1}$ ) dos elementos nas amostras de erva mate, obtidas mediante a técnica de ICP-MS. ....	70
Tabela 12. Percentual médio de extração dos elementos na erva mate relativo à concentração total, simulando o preparo da infusão. A média é para 5 amostras de erva mate.....	77
Tabela 13. Sensibilidade da análise de procedência da erva mate mediante a reflexão no NIR.....	91
Tabela 14. Especificidade da análise de procedência da erva mate mediante reflexão no NIR. ....	91
Tabela 15. Sensibilidade da análise de procedencia da erva mate mediante a técnica de ICP OES, para os elementos do G1.....	92

Tabela 16. Especificidade da análise de procedencia da erva mate mediante a técnica de ICP OES, para os elementos do G1.....	92
Tabela 17. Sensibilidade da análise de procedencia da erva mate mediante a técnica de ICP-MS, para os elementos do G2.....	93
Tabela 18. Especificidade da análise de procedencia da erva mate mediante a técnica de ICP-MS, para os elementos do G2.....	93
Tabela 19. Sensibilidade da análise de procedencia da erva mate mediante as técnicas de ICP OES e ICP-MS, para os elementos do G3. ....	94
Tabela 20. Especificidade da análise de procedencia da erva mate mediante as técnicas de ICP OES e ICP-MS, para os elementos do G3. ....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

ATR – Reflectância total atenuada (do inglês, *total attenued reflectance*)

DR – Reflectância difusa (do inglês, *diffuse reflectance*)

ETA-AAS – Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (do inglês, *electrothermal atomization atomic absorption spectrometry*)

FAAS – Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês, *flame atomic absorption spectrometry*)

FAES – Espectrometria de emissão atômica com chama (do inglês, *flame atomic emission spectrometry*)

FIR – Infravermelho distante (do inglês, *far infrared*)

FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, *Fourier transformed infrared*)

GFAAS – Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês, *graphite furnace atomic absorption spectrometry*)

HCA – Análise hierárquica por agrupamentos (do inglês, *hierarchical cluster analysis*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)

ICP-MS – Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry*)

ICP OES – Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês, *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*)

IR – Infravermelho (do inglês, *infrared*)

kNN – k-ésimo vizinho mais próximo (do inglês, *k-nearest neighbor*)

LDA – Análise discriminante linear (do inglês, *linear discriminant analysis*)

LV – Variável latente (do inglês, *latent variable*)

MIR – Infravermelho médio (do inglês, *mid infrared*)

NIR – Infravermelho próximo (do inglês, *near infrared*)

NMR – Ressonância magnética nuclear (do inglês, *nuclear magnetic resonance*)

PC – Componente principal (do inglês, *principal component*)

PCA – Análise por componentes principais (do inglês, *principal component analysis*)

PDO – Designação de origem protegida (do inglês, *protection of designation of origin*)

PGI – Indicação de origem protegida (do inglês, *protection of indication of origin*)

PIXE – Espectroscopia de emissão de partículas induzidas por raios X (do inglês, *particle induced x-ray emission*)

PLS-DA – Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (do inglês, *partial least squares discriminant analysis*)

PTFE - Politetrafluoretileno

RE – Reflexão especular (do inglês, *specular reflectance*)

SIMCA – *Soft independent modeling class analogy* (sem tradução)

SVM-DA – Análise discriminante por máquinas de vetor de suporte (do inglês, *support vector machine discriminant analysis*)

TAE – Teoria do aprendizado estatístico

TSG – Garantias de especialidade tradicional (do inglês, *traditional specialty guarantee*)

UPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês, *ultra performance liquid chromatography*)

UV - Ultravioleta

VC - Vapnik-Chervoknenkis

## RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um método de análise de erva mate mediante as técnicas de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), com o intuito de classificar a erva mate por país de origem da América do Sul. Para isto, foram utilizados métodos de análise multivariada supervisionada e não supervisionada, como a análise hierárquica por agrupamentos (HCA), a análise por componentes principais (PCA), o método do k-ésimo vizinho mais próximo (kNN), *soft independent modeling class analogy* (SIMCA), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e análise discriminante por máquinas de vetor de suporte (SVM-DA). Foram analisadas 54 amostras de erva mate provenientes da América do Sul (Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai). As amostras foram cominuídas em moinho criogênico e diretamente analisadas para a obtenção dos espectros de reflexão no NIR. Para a determinação dos elementos Ca, K, Mg, Al, Fe, Mn, Ba, Cu, P, Sr e Zn por ICP OES e Li, Be, Ti, V, Cr, Ni, Co, As, Se, Rb, Mo, Ag, Cd, Sb, La, Ce, Pb, Bi e U por ICP-MS, foi realizada a decomposição das amostras por via úmida em bloco digestor em sistema fechado. A classificação da erva mate por país de origem foi possível, sendo que a melhor classificação para todos os métodos de análise multivariada foi obtida por NIR e para as concentrações dos elementos avaliados, a SVM-DA foi o melhor. Conclui-se que a erva mate pode ser avaliada por país de origem mediante a técnicas de ICP OES, ICP-MS e NIR.

## ABSTRACT

A method of yerba mate analysis using near infrared spectroscopy (NIR), inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was developed in order to classify yerba mate by country of origin in South America. To this end, principal components analysis (PCA), k-nearest neighbor (KNN), soft independent modeling class analogy (SIMCA), partial least square discriminant analysis (PLSDA), discriminant analysis by vector machine (SVM-DA) were used for multivariate analysis of the NIR spectra and element concentrations found in 54 samples of yerba mate from South America (Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay). The samples were ground in cryogenic mill and directly analyzed in order to obtain the reflectance spectra in the NIR region. For elements determination (Ca, K, Mg, Al, Fe, Mn, Ba, Cu, P, Sr and Zn by ICP OES and Li, Be, Ti, V, Cr, Ni, Co, As, Se, Rb, Mo, Ag, Cd, Sb, La, Ce, Pb, Bi and U by ICP-MS), the samples were acid digested in closed vessel in digestion block. The classification of the yerba mate by country of origin was possible, whereas the best classification using all multivariate analysis methods was obtained for NIR. For the element concentrations, the best classification was obtained by SVM-DA. It was concluded that yerba mate classification by country of origin can be assessed through ICP OES, ICP-MS and NIR.

## 1. INTRODUÇÃO

A erva mate (*Ilex paraguariensis*) é de origem subtropical, nativa da América do Sul, encontrada na Argentina, no Brasil, Paraguai e Uruguai, como mostrado na Figura 1. Sua cultura tem grande valor comercial para os estados da Região Sul do Brasil, tendo em vista que é matéria-prima para bebidas tônicas e estimulantes, que são amplamente consumidos; é utilizada em infusões à quente ou à frio, as quais são popularmente conhecidas como chimarrão e tererê, respectivamente.<sup>1</sup> Além da produção tradicional da erva mate para essas bebidas, ela também tem sido cultivada para produção de cerveja, cremes hidratantes, doces e outras utilizações não tradicionais na última década.<sup>2</sup>



Figura 1. Mapa da América do Sul mostrando as regiões onde a erva mate (*Ilex paraguariensis*) é nativa. 1 - Argentina; 2 - Brasil; 3 - Paraguai; 4 - Uruguai.<sup>1</sup>

Por natureza, produtos alimentícios possuem características relacionadas ao seu local de origem e a identificação deste tem-se tornado cada vez mais importante, tendo-se em vista o aumento de interesse pelos consumidores de

alimentos de qualidade e de origem clara. As razões para esse interesse variam segunda à especificidade culinária, patriotismo, saúde, desconfiança da qualidade ou preocupação ambiental relacionada com a origem do produto.<sup>3</sup> Por outro lado, produtores associam sua marca diretamente com a região de origem do produto com o intuito de obter reconhecimento de mercado, preços melhores e outras vantagens comerciais e, portanto, juntamente com autoridades reguladoras têm interesse em garantir a rotulagem correta de seu produto e metodologias para autenticação deste.<sup>4</sup>

A espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) é muito utilizada para determinação do perfil de constituintes orgânicos em alimentos<sup>5</sup>, produtos farmacológicos<sup>6,7</sup>, entre outros<sup>8</sup>, fornecendo informações sobre a amostra de forma rápida e não destrutiva<sup>9</sup>. As técnicas de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), por outro lado, são capazes de determinar as concentrações de elementos químicos, de maneira rápida, devido às características das mesmas.<sup>3</sup>

Neste contexto, o objetivo desta dissertação de mestrado foi desenvolver e aplicar metodologias de análise para determinação da concentração de elementos traço, minoritários e majoritários em erva mate por ICP OES e ICP-MS, assim como a obtenção dos perfis de absorção na região do NIR, para, mediante análise multivariada, determinar o país de origem da erva mate processada e comercializada na América do Sul. Estes países são a Argentina, o Brasil, o Uruguai e o Paraguai.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ERVA MATE

Erva mate, *Ilex paraguariensis*, é uma planta conhecida há séculos por ser utilizada para preparação de bebidas estimulantes, devido a suas propriedades medicinais.<sup>10</sup> Os habitantes nativos, índios Guaranís, da região que hoje compreende o Paraguai, nordeste da Argentina, Uruguai e sul do Brasil já utilizavam as folhas secas da erva mate para preparação de infusões. Posteriormente, os jesuítas desenvolveram plantações extensas de espécies de plantas selvagens, inclusive a *Ilex paraguariensis*, como base econômica para os sistemas de missões e, desse modo, exportando para Europa o que ficou conhecido como chá dos jesuítas.<sup>11</sup>

A erva mate é uma árvore de clima subtropical, da família Aquifoliaceae, nativa da América do Sul. A Figura 2 apresenta uma fotografia da árvore da erva mate. Sua incidência natural se estende na região Sul do continente: no Brasil (estados do Mato Grosso do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul), na Argentina (nas províncias de Corrientes e Misiones), no Paraguai (nas províncias Alto Parana, Amambay, Caaguazu, Canendiyu, Central, Guaira, Itapua, Misiones e San Pedro) e Uruguai.



Figura 2. Fotografia de uma árvore nativa de erva mate.

A *Ilex paraguariensis* pode atingir até 18 m de altura, produz tanto flor, nos meses de outubro e novembro, quanto fruto, de março a junho. A planta de erva mate necessita de um regime elevado de chuvas, mas é pouco suscetível à temperatura e, desse modo, suportando frios intenso e temperaturas em torno de -5 °C.<sup>1</sup>

Atualmente, a erva mate é consumida nos países do sul da América do Sul e vem ganhando popularidade em outros países, como os Estados Unidos e a China. Dos países produtores de erva mate, a Argentina é o maior produtor, seguida do Brasil e Paraguai, respectivamente, segundo e terceiro maiores produtores. O Uruguai é o país com maior consumo *per capita* (6 a 8 kg pessoa ano<sup>-1</sup>) seguido da Argentina (5 kg pessoa ano<sup>-1</sup>).<sup>10</sup>

A erva mate é consumida na forma de infusão à quente, chamada de chimarrão, ou à frio, chamada de tererê. As folhas da erva mate não são comercializadas na forma bruta, precisando passar por diversas etapas antes de chegarem ao consumidor. As folhas frescas colhidas juntamente com o talo da erva mate colhidas passam por alguns processos antes do empacotamento. O primeiro deles é o branqueamento, onde as folhas são aquecidas a altas temperaturas (cerca de 500 °C) por poucos segundos através do contato destas com gases provenientes da queima de propano ou madeira. Este procedimento é utilizado para desativação de enzimas. A seguir, as folhas são submetidas à secagem parcial, onde são aquecidas a temperaturas em torno de 100 °C sobre vapor, por 8 a 24h, em duas etapas. Por fim, as folhas são envelhecidas por até 12 meses e depois submetidas à moagem e peneiramento.<sup>12</sup> A Figura 3 apresenta um fluxograma, de forma simplificada, dos processos de produção da erva mate.

A adulteração da erva mate comercial pode ocorrer devido à adição de folhas de uma grande diversidade de espécies de plantas da mesma família, como, por exemplo, *Ilex dumosa*, *Ilex theezans* e *Ilex brevicuspis*. As folhas de outras plantas da família *Ilex* adicionadas na erva mate comercial podem não alterar somente as propriedades organolépticas, mas também as atividades farmacológicas, pois algumas destas espécies não contêm cafeína em sua composição e possuem diferentes saponinas que levam a uma forte mudança no sabor da infusão.<sup>13</sup>

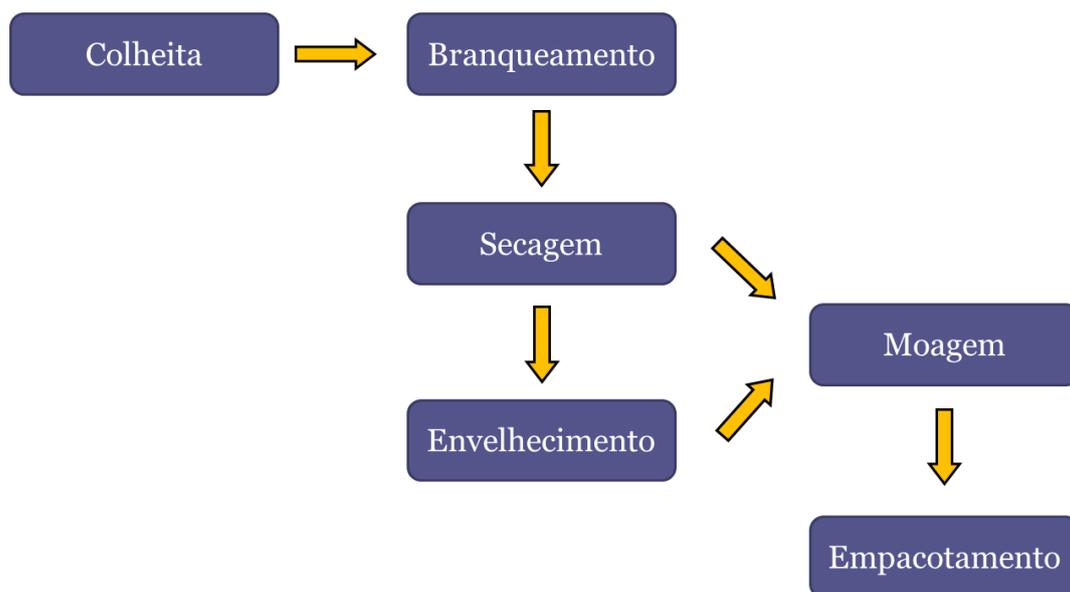


Figura 3. Fluxograma simplificado dos processos de produção da erva mate utilizada no preparo de infusões.

Atualmente, a erva mate comercial pode ser adicionada de açúcares e/ou outras plantas utilizadas para infusão, com o intuito de alterar o sabor e aroma, tais como menta e limão. Também é comercializada sem talos.

Andersen e Fogh<sup>14</sup> avaliaram uma mistura de três plantas da cultura ocidental, erva mate, guaraná e damiana, utilizada como emagrecedor. Eles observaram que o consumo desta mistura entre os pacientes estudados levou a um emagrecimento saudável nas primeiras semanas do tratamento. Eles relacionaram este fato com a regulação do sistema nervoso e a peptídeos gastrointestinais. Após um ano de estudo, os pacientes mantiveram seus pesos no mesmo patamar, ou seja, após o emagrecimento, sugerindo que o consumo da mistura auxilia a manutenção do peso corporal.

Schinella e colaboradores<sup>15</sup> avaliaram os efeitos da infusão de erva mate em coração de ratos, com o objetivo de estudar os efeitos cardioprotetores dos compostos presentes na erva mate. Eles observaram que o extrato causou uma significativa atenuação no atordoamento do endotélio, do miocárdio e na peroxidação lipídica, e que estes efeitos benéficos são mediados por NO, que é um mediador na cardioproteção.

Tendo em vista que o oxigênio radicalar está envolvido em diversos estados patológicos tais como câncer, desordens cardiovasculares, arritmias, entre outros, Filip e colaboradores<sup>16</sup> observaram a capacidade da infusão de erva mate em proteger da oxidação as membranas lipídicas. Os autores relacionaram este comportamento com a presença de derivados de cafeoil e concluíram que a erva mate é potencialmente uma fonte de antioxidantes.

Gorzalczany e colaboradores<sup>17</sup> avaliaram a influência da infusão de erva mate e outras espécies de planta da mesma família nas atividades intestinais de ratos. Eles observaram que duas espécies, *Ilex paraguariensis* e *Ilex brevicuspis*, levaram a um aumento do volume de bile secretado pelo fígado, porém com intensidades diferentes. Concluíram que a infusão de erva mate pode ser considerada como um medicamento popular, atuando no sistema digestivo e que a adulteração deste produto com a adição de outras espécies pode alterar as propriedades farmacológicas.

Por outro lado, Loria e colaboradores<sup>18</sup> avaliaram o consumo da infusão de erva mate como uma das causas de câncer de laringe, esôfago e boca. Para o esôfago, os autores observaram que o consumo da infusão à quente pode aumentar o risco de câncer, assim como a ingestão de bebidas quentes, pois temperaturas elevadas causam danos à mucosa do esôfago. Porém, também observaram que o dano causado por ingestão de bebidas quentes é de difícil estudo. Assim, concluíram que ainda não há dados suficientes para fundamentar essa associação.

## **2.2 COMPOSIÇÃO DA ERVA MATE**

A erva mate possui como bioativos principais os polifenóis (ácidos clorogênicos), xantinas (cafeína e teobromina), flavonoides (rutinas e luteolinas) e saponinas (metasaponinas), que são responsáveis por algumas propriedades da erva mate benéficas à saúde. A Figura 4 apresenta a estrutura molecular de alguns dos compostos bioativos presentes na erva mate.

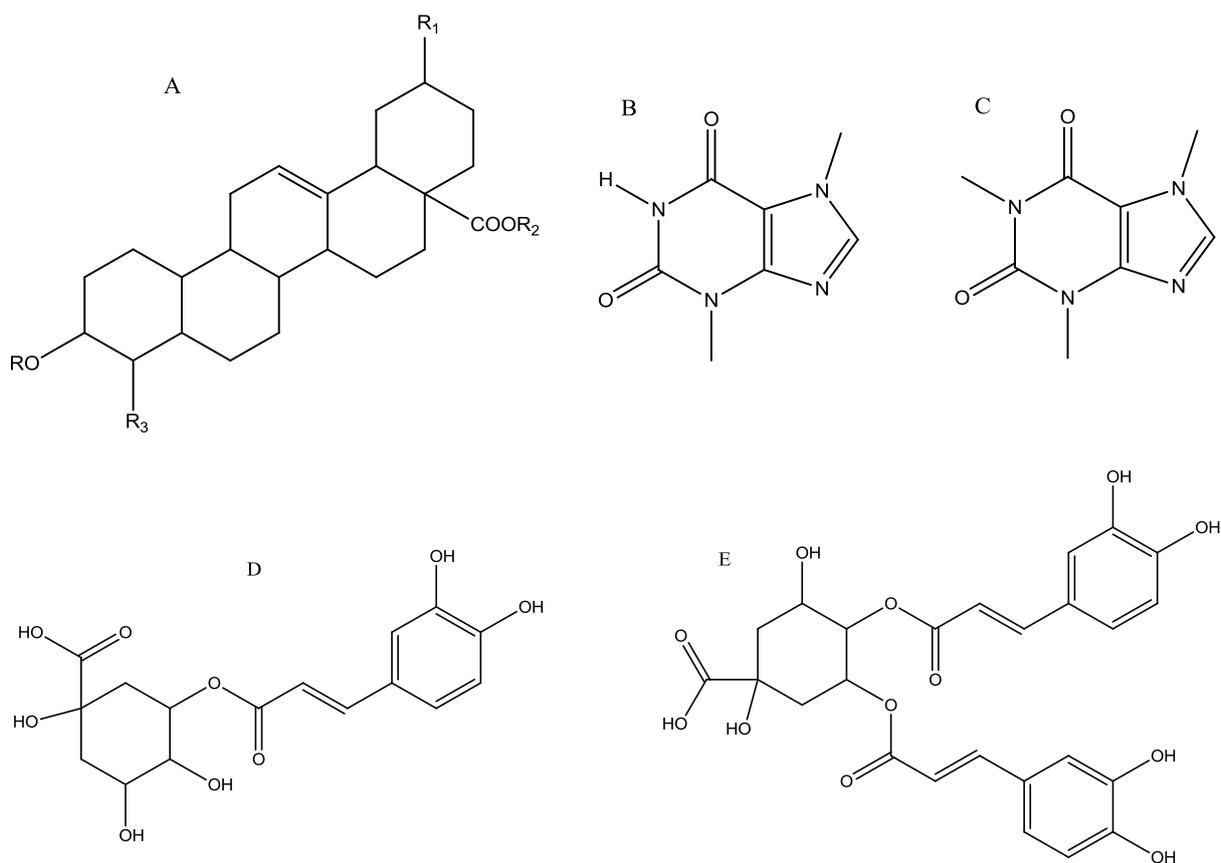


Figura 4. Compostos bioativos na erva mate: A - saponina, B - teobromina, C - cafeína, D - ácido clorogênico, E - 4,5-dicafeoilquinico.

As xantinas são alcalóides presentes em chás, incluindo a erva mate, café e chocolate. O consumo de xantinas é contraindicado devido à provocação de úlcera e tensão no sistema nervoso, muito embora as xantinas possuam grande aplicabilidade na indústria farmacêutica devido à capacidade estimulante das mesmas. Saponinas são glicosídeos derivados dos ácidos ursólico e oleanólico, as quais são responsáveis pelo sabor característico da infusão de erva mate. Além disso, possuem propriedades anti-inflamatórias e hipocolesterolêmicas.<sup>1</sup>

Com o intuito de avaliar diferentes etapas do crescimento da planta, influência da intensidade da luz e do processo de produção, Dartora e colaboradores<sup>19</sup> analisaram amostras de erva mate por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) com o objetivo de determinar os diferentes teores de carboidratos, xantinas e polifenóis. Eles observaram maior concentração de antioxidantes na erva mate que crescera sob maior incidência de luz. Também observaram maior concentração

de polifenóis e maior atividade antioxidante nas folhas submetidas ao branqueamento e a secagem, porém menor concentração de frutose e glicose.

Comparando extratos obtidos das espécies de planta da família *Ilex*, Reginatto e colaboradores<sup>20</sup> determinaram a concentração de cafeína, teobromina e teofilina por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e observaram que os diferentes teores destes compostos podem ser utilizados como indicadores de adulteração do produto comercial, tendo em vista que em amostras das espécies *breviscuspis*, *dumosa* e *microdonta* não foram detectadas teobromina e cafeína.

Em relação às saponinas, Schenkel e colaboradores<sup>21</sup> elucidaram as formas estruturais dos compostos desta família, presentes na erva mate e suas frutas, através de ressonância magnética nuclear (NMR) de hidrogênio e carbono. Eles também observaram que o sabor amargo característico da erva mate é conferido pela presença de saponinas e que se a coleta for realizada nos períodos em que a planta possui fruto e este for processado juntamente com as folhas e talos, o produto final pode ter propriedades farmacológicas diferentes devido à composição da fruta, pois esta possui alto teor de saponinas.

Bastos e colaboradores<sup>22</sup> determinaram o teor de sólidos solúveis e a eficiência de extração dos mesmos na erva mate. Eles observaram que o teor de sólidos solúveis é proporcional à umidade presente na erva mate e que estes variam de acordo com os processos de produção. Também perceberam uma correlação linear positiva entre a concentração de compostos bioativos na infusão com o teor de sólidos.

Filip e colaboradores<sup>23</sup> determinaram as concentrações de compostos fenólicos em sete espécies de plantas da família *Ilex* por HPLC. Em comparação com as outras espécies, a *Ilex paraguariensis* contém concentrações elevadas de derivados de cafeoil (como o ácido clorogênico) e flavonóides (como o queracatina, rutina e o kaempferol) e que estes são responsáveis pelas propriedades antioxidante, hipocolesterolêmica e diurética.

Devido as suas propriedades surfactantes e farmacológicas, Gnoatto e colaboradores<sup>24</sup> desenvolveram uma metodologia para determinar as concentrações de saponinas derivadas de ácido ursólico e ácido oleanólico em erva mate mediante

HPLC com detector UV, tendo em vista que estes compostos são cromóforos fracos. Os autores obtiveram resultados satisfatórios tanto para exatidão quanto precisão.

Em relação à composição mineral da erva mate, Sanz e Isasa<sup>25</sup> determinaram as concentrações de Na, Ca, K, Mg, Mn, Fe, Zn e Cu em erva mate e suas infusões para duas marcas comerciais encontradas na Espanha, por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Como método de preparo da amostra, os autores primeiramente calcinaram a 450°C tanto a infusão quanto a erva mate e posteriormente extraíram os elementos de interesse das cinzas, utilizando uma mistura de HNO<sub>3</sub> e HCl.

Garcia e colaboradores<sup>26</sup> determinaram as concentrações de Na, Ca, K, Mg, Mn, Fe, Zn e Cu em erva mate por FAAS. Os autores avaliaram os teores encontrados nas folhas brutas e em amostras comerciais de erva mate da região sul do Paraguai, produzida em dois anos diferentes. Eles observaram que a concentração de Fe nas amostras comerciais era muito superiores que as encontradas na erva mate bruta e relacionaram essa diferença com a contaminação que ocorria nos processos de produção. Os autores também observaram diferenças nas concentrações de Ca e Fe entre as amostras coletadas na mesma região em anos diferentes.

Carducci e colaboradores<sup>27</sup> desenvolveram uma metodologia para determinação de Ca, K, Na, Mg e Mn em amostras de erva mate comercial e suas infusões por eletroforese capilar. Os autores utilizaram um procedimento de decomposição com HNO<sub>3</sub> e radiação micro-ondas em sistema fechado. Eles concluíram que o método por eletroforese capilar desenvolvido foi apropriado para este fim. Eles compararam os resultados obtidos por espectrometria de emissão atômica com chama (FEAS) e FAAS.

Costa e colaboradores<sup>28</sup> avaliaram o teor de Al solúvel e inerte presente na erva mate e suas infusões. Para isto, a amostra foi decomposta com uma mistura de HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em sistema aberto para determinação do Al total. A infusão foi preparada pela adição de água à temperatura próxima a ebulição à erva mate, a mistura foi mantida em repouso e depois filtrada. Posteriormente, os autores mantiveram a infusão em contato com uma resina quelante para extração do Al solúvel. Tendo em vista que os polifenóis presentes na erva mate podem agir como complexantes, eles também determinaram a concentração destes compostos.

Observaram um aumento da quantidade de Al lixiviado na presença de menores concentrações de polifenóis. Concluíram que a maior parte do Al extraído para a infusão corresponde a uma espécie inerte do elemento e, portanto, menos tóxica.

Bragança e colaboradores<sup>29</sup> determinaram as concentrações de Cd, Cu, Zn, Al, Fe, Cr, Mn e Mo em três amostras de erva mate comercial e suas infusões, livres de conservantes e açúcares, uma à frio e duas à quente, por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. As amostras comerciais foram decompostas com HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em sistema aberto. Os autores observaram que a extração de elementos traço na infusão não é influenciada pela temperatura da água e que as concentrações destes elementos estavam de acordo com os limites máximos estabelecidos para chás pela legislação brasileira..

Giulian e colaboradores<sup>30</sup> determinaram as concentrações de Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn e Rb em erva mate, em diferentes etapas do beneficiamento da mesma. Para isto, eles utilizaram a técnica de emissão de partículas induzida por raios X (PIXE). Os autores observaram uma mudança nas concentrações de diversos elementos na erva mate, nas diferentes etapas do processo de produção; observaram um aumento significativo nas concentrações da maioria dos elementos investigados, exceto Mg Al, Cu e Zn que se mantiveram constantes e Cl, cuja concentração deste diminuiu. Eles relacionaram a alteração com dois fatores: a perda de massa devido à exposição à temperaturas elevadas no processo de branqueamento e à contaminação devido à queima de biomassa.

Em outro estudo, Giulian e colaboradores<sup>31</sup> determinaram as concentrações de Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn e Rb presentes erva mate que extraídos com água em diferentes temperaturas. Eles compararam a quantidade extraída com o teor total determinado na erva mate por PIXE. Concluíram que a quantidade extraída varia de acordo com o elemento e que a temperatura da água influencia apenas na extração do K e do Cl e que o volume de água utilizada influencia na extração de Cl, P, K e Mg.

Marchisio e colaboradores<sup>32</sup> desenvolveram um método para determinação da concentração de Pb em infusões de erva mate através da técnica de ICP OES, fazendo a pré-concentração do Pb em uma micro coluna preenchida com poliuretana, utilizando um nebulizador ultrassônico e sistema com injeção em fluxo para introduzir o eluato no ICP. Segundo os autores, o método desenvolvido foi

eficiente, visto que a recuperação do Pb adicionado foi cerca de 100% e o coeficiente de variação foi 3%. A concentração de Pb encontrada nas infusões de erva mate foi de  $7,6 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Wrobel e colaboradores<sup>33</sup> avaliaram os teores de Al, Cr, Cu, Fe, Mn e Ni em amostras erva mate, chá preto, chá verde e hibiscus e suas respectivas infusões, mediante GF AAS. Eles observaram que a erva mate pode ser considerada fonte de Mn, facilmente extraído pela água, e que a quantidade de tanino presente nas folhas de erva mate é inversamente proporcional à eficiência de extração dos elementos investigados.

Malik e colaboradores<sup>34</sup> determinaram as concentrações de Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P e Zn em erva mate e outras plantas utilizadas para infusão e suas respectivas infusões pela técnica de ICP OES. As amostras foram calcinadas em forno mufla a  $500^{\circ}\text{C}$  e as cinzas tratadas com água régia sob aquecimento. Eles observaram que na erva mate comercial há menos B, Ca, Cu, Mg, Mn e Zn em relação ao mate verde. Observaram também que a infusão de erva mate pode ser considerada uma fonte diária de B, devido à alta concentração do elemento. Em comparação à infusão dos chás, a infusão de erva mate continha, em média, teores de Mn até três vezes maiores, sugerindo que a ingestão de 1 L da infusão corresponderia ao total indicado na dieta diária para este elemento.

### **2.3 ANÁLISE DE PROCEDÊNCIA**

Historicamente, produtos alimentícios têm sido sempre relacionados com um lugar específico de origem, tendo em vista que hábitos alimentícios surgiram devido aos recursos naturais presentes e influências sociais ou culturais na comunidade. A determinação da autenticidade do alimento é uma questão importante do ponto de vista da segurança e qualidade do produto.<sup>35</sup>

A autenticidade de produtos alimentícios tem importância para consumidores e produtores. Oficialmente, padrões de qualidade têm sido estabelecidos para a rotulagem de produtos, contendo informações específicas. Do ponto de vista econômico, a autenticidade é essencial para evitar a competição injusta. Todos os

produtos que são alvos de adulterações, geralmente, possuem alto valor comercial agregado.<sup>36</sup>

Nos últimos anos, tem-se visto que o interesse dos consumidores por produtos de origens específicas tem aumentado e as maiores razões para tal interesse têm sido especificidade culinária, patriotismo, saúde, desconfiança da qualidade ou preocupação ambiental, esta relacionada com a origem do produto.<sup>3</sup> Os produtores associam sua marca diretamente com a região de origem do produto, com o intuito de obter reconhecimento de mercado, preços melhores e outras vantagens comerciais.<sup>4</sup>

O regulamento da União Européia permite a rotulagem de produtos alimentícios com indicação geográfica: designação de origem protegida (PDO), indicação de origem protegida (PGI) e garantias de especialidade tradicional (TSG).<sup>3</sup> O PDO é um termo utilizado para descrever uma forte relação entre a identidade do alimento e sua origem, ou seja, este produto é produzido, processado e preparado em sua região de origem. Para o PGI, a relação com seu local de origem precisa existir apenas em um dos processos de produção, processamento ou preparação do produto alimentício.<sup>37</sup>

Profeta e colaboradores<sup>38</sup> avaliaram a relevância da informação do local de origem do alimento no ponto de venda do mesmo. Utilizando duas metodologias de entrevista, eles estudaram as reações de consumidores alemães em relação à origem de três tipos de produtos: carne, laticínios e cerveja. Na primeira entrevista, onde os consumidores eram abordados na saída dos pontos de venda, a origem do alimento era relevante para um quinto dos entrevistados. Na outra entrevista, onde era pressuposto que a denominação PDO tinha relevância, eles observaram que para cervejas desconhecidas, a origem delas era relevante. Além disto, os consumidores estavam dispostos a pagar preços mais altos pela designação PDO Bavária (Alemanha).

Para avaliar um produto, consumidores fazem inferências sobre as informações fornecidas no rótulo do produto e, como um indicador de qualidade, julgam-no devido as características intrínsecas (forma e tamanho) e externas (preço, marca, propagandas e local de origem). A imagem do país de origem do produto pode afetar a percepção dos consumidores sobre o produto daquele país, mas o conhecimento da origem tem apenas uma influência moderada na decisão final do

consumidor. Em produtos de custos mais elevados, a origem pode ter uma relevância maior.<sup>39</sup>

Bonnet e colaboradores<sup>40</sup> avaliaram a relevância da presença do selo PDO, investigando o comportamento de consumidores de diferentes idades e níveis financeiros. Eles observaram que a marca do produto é a informação mais relevante no momento de escolha e que o selo PDO não atingia todos os consumidores, sendo a idade e o nível financeiro relevantes neste ponto.

Liefeld<sup>41</sup> entrevistou 1248 consumidores dos Estados Unidos, nos pontos de saída de caixas de supermercados, com o intuito de identificar o conhecimento destes sobre as origens dos produtos recém adquiridos. O autor observou que apenas 6,5 % dos consumidores tinham o conhecimento da origem dos produtos que compraram e apenas 2,2 % do total de entrevistados revelaram que este conhecimento foi responsável pela escolha. O autor concluiu que o país de origem não é um fator relevante para os consumidores americanos.

Para a identificação de um produto segundo seu local de origem, tanto sua a composição orgânica<sup>42</sup> quanto a sua composição mineral<sup>43</sup>, juntamente com a análise multivariada, podem ser utilizados.

Técnicas espectrométricas como a AAS, ICP OES e ICP-MS tem sido amplamente utilizadas para a determinação da concentração de elementos na identificação da procedência de diversos alimentos, incluindo vinhos<sup>44,45,46</sup>, laticínios<sup>47,48</sup>, bebidas alcólicas diversas<sup>49,50,51</sup>, verduras<sup>52</sup>, frutas<sup>53</sup>, entre outros<sup>54,55</sup>.

Moreda-Piñero e colaboradores<sup>56</sup> determinaram as concentrações de Al, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Cs, Mg, Mn, Ni, Pb, Rb, Sr, Ti, V, Zn em amostras de chás para infusão, provenientes da China, Sri Lanka e de outros países asiáticos e africanos, mediante ICP OES e ICP-MS. Através das concentrações desses elementos, classificaram os chás por local de origem. Os autores utilizaram como métodos de análise multivariada: a análise hierárquica por agrupamentos (HCA), a análise por componentes principais (PCA), a análise discriminante linear (LDA) e o *soft independent modeling class analogy* (SIMCA). A LDA e o SIMCA classificaram corretamente as amostras de chás por continente, porém a separação por país foi adequada apenas pela LDA.

Bentlin e colaboradores determinaram as concentrações de 45 elementos químicos em amostras de vinhos de quatro países da região Sul da América do Sul mediante ICP OES e ICP-MS. Os autores aplicaram o teste F, para 99,9% de significância, para evidenciar os elementos que eram capazes de distinguir os diferentes grupos de amostra e assim reduzir o número de variáveis. Eles observaram que apenas o Mg, Li, U, Rb, e Tl classificaram os vinhos por país de origem com eficácia, mediante a HCA e a PCA.

Alda-Gracilope e colaboradores<sup>57</sup> determinaram as concentrações de K, Na, Ca, Mg e Zn em amostra de mel de Granada, Espanha, uma região com PDO, mediante FAAS. Utilizando técnicas de análise multivariada (HCA e PCA) e análise estatística univariada (análise de variância, ANOVA), os autores observaram que a identificação do mel mediante as concentrações dos elementos foi possível tanto para origem geográfica quanto botânica.

Bevilacqua e colaboradores<sup>58</sup> estudaram a rastreabilidade de óleos de oliva produzidos na região da Sabina, Itália, contendo o selo PDO. Para isto, utilizaram espectros de absorção no NIR e infravermelho médio (MIR) e análise multivariada; a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e o SIMCA. Para o estudo, foram coletadas amostras de óleo de oliva da região de Sabina e de outras regiões da Europa. Neste estudo, os autores observaram que a escolha do pré-tratamento dos espectros influencia significativamente na precisão do modelo. Eles também observaram que os resultados obtidos mediante MIR foram piores aos obtidos por NIR e que a PLS-DA classificou corretamente 100% das amostras.

Vitale e colaboradores<sup>59</sup> avaliaram a autenticidade de amostras de pistache em relação a seu país de origem. Para isto, os autores analisaram amostras de seis países diferentes, entre eles um país da Europa onde o produto possui o selo PDO. Eles observaram que através dos espectros obtidos no NIR, a classificação das amostras de acordo com a origem era adequada através da PLS-DA e do SIMCA, de forma rápida e não destrutiva.

Gori e colaboradores<sup>60</sup>, mediante dois métodos de análise multivariada, LDA e PCA, classificaram por local de origem amostras de queijo com selo PDO, de uma região da Itália, comparando com outros produzidos em outras regiões da Europa. Os autores utilizaram a espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Eles observaram que era necessário a utilização de um algoritmo para

seleção do comprimento de onda onde ocorria a melhor separação das amostras de queijo e que pela LDA todos os queijos foram classificados corretamente.

A espectroscopia no infravermelho também é uma técnica amplamente utilizada para análise de procedência de produtos alimentícios tais como óleos vegetais<sup>61,62</sup>, vinhos<sup>63</sup> e mel de abelha<sup>64</sup> pois é capaz de fornecer informações sobre a amostra de forma rápida e não destrutiva.

Diversas outras metodologias e técnicas analíticas associadas com a análise multivariada são utilizadas para a identificação do lugar de origem de bebidas e alimentos como, por exemplo, RMN<sup>65</sup>, cromatografia<sup>66</sup>, análise isotópica<sup>52,67</sup>, conforme revisões encontradas na literatura relacionadas com a análise de procedência de alimentos.<sup>3, 4, 37</sup>

## **2.4 ANÁLISE ELEMENTAR**

### **2.4.1 Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES)**

A técnica de ICP OES é amplamente utilizada para análise elementar e é reconhecida como uma das mais eficientes para determinação de elementos majoritários, minoritários e traço - incluindo os elementos terras raras - nas mais diversas e complexas matrizes. Isto se deve as suas características, como boa precisão e exatidão, limites de detecção relativamente baixos, determinação simultânea de elementos e ampla faixa linear dinâmica da curva de calibração.<sup>68</sup>

A técnica de ICP OES fundamenta-se na emissão da radiação eletromagnética. O elétron, ao receber uma determinada energia, pode passar de um nível inicial de menor energia para outro de maior energia, sendo este segundo instável (átomo no estado excitado). Ao retornar ao seu nível inicial, a energia recebida é emitida na forma de fótons, com comprimento de onda e frequência específicos para cada transição, nas regiões do UV e visível do espectro eletromagnético..<sup>68</sup>

A fonte de energia é o plasma, usualmente de argônio, produzido numa tocha de quartzo. O plasma de argônio é composto por íons, elétrons e partículas neutras,

livres para movimentarem-se em qualquer direção espacial, diferenciando-se de um gás devido, principalmente, às diferentes interações entre partículas (forças Coulombianas).<sup>69</sup> Este plasma é mantido pela interação entre o argônio ionizado e uma bobina de radiofrequência, que opera a uma potência constante. O ICP de argônio atinge temperaturas na ordem de 6000 a 8000 K, que permite a atomização e excitação da maioria dos elementos.<sup>70</sup>

A amostra é carregada e introduzida no canal central do plasma. Ao atingi-lo, o primeiro fenômeno que ocorre é a dessolvatação do aerossol, formando partículas secas. Posteriormente, ocorre a decomposição destas partículas em moléculas individuais (vaporização), seguida da dissociação destas em átomos (atomização). Por fim, ocorre a excitação destes átomos ou a ionização dos mesmos com posterior excitação. A radiação emitida pode ser focalizada radialmente ou axialmente. No último caso, a sensibilidade é maior, bem como os efeitos de matriz. Isto porque a radiação de moléculas que emitem em regiões mais frias do ICP são também detectadas.<sup>70</sup>

O sistema mais comum de introdução da amostra no ICP é o nebulizador pneumático associado a uma câmara de nebulização, convertendo a amostra líquida em um fino aerossol. Nebulizadores ultrassônicos também têm sido utilizados para melhorar a sensibilidade, devido a maior eficiência de transporte da amostra para o ICP. Isto, no entanto, também aumenta os efeitos de matriz.<sup>68</sup>

#### **2.4.2 Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)**

A técnica de ICP-MS utiliza-se da capacidade do ICP em gerar com eficiência íons de carga unitária de espécies elementares. Estas espécies são introduzidas num espectrômetro de massa, onde são separadas em função da sua razão massa-carga. Similarmente ao ICP OES, a técnica de ICP-MS é multielementar e apresenta boa precisão e exatidão, porém é bastante suscetível a efeitos de matriz. Frente a outras técnicas espectrométricas, possui sensibilidade superior e capacidade de medir isótopos. Sendo assim, é uma das principais técnicas analíticas para análise elementar.<sup>71</sup>

A tocha usada para o ICP-MS possui similaridades com aquela utilizada para ICP OES. O ICP é posicionado horizontalmente, de modo que os íons formados possam ser extraídos e acelerados através da interface para o espectrômetro de massa. O plasma é amostrado através de cones (usualmente dois) com orifícios em suas extremidades. Além disso, os cones são constantemente refrigerado, uma vez que ficam em contato com o plasma à altas temperaturas.<sup>70-71</sup>

Depois de extraídos, os íons são direcionados ao filtro de massa por uma lente(s) submetida(s) a diferentes potenciais. O analisador de massa, tipicamente um quadrupolo, funciona como um filtro, separando os íons pela suas razões massa-carga, através de um campo elétrico aplicado, que são direcionados ao detector.<sup>71</sup>

## 2.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A radiação eletromagnética no infravermelho compreende a faixa entre 780 a 1.000.000 nm e está dividida em três regiões: o NIR, 780 a 2500 nm (14290 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ), o MIR, 2500 a 50000 nm (4000 a 200  $\text{cm}^{-1}$ ) e o infravermelho distante (FIR), 50 a 1000  $\mu\text{m}$ .

A espectroscopia na região do infravermelho (IR) envolve a transferência de energia entre a radiação eletromagnética e as moléculas, sendo esta energia associada aos modos vibracionais e rotacionais de grupos funcionais. As frequências e intensidades das bandas exibidas no espectro de um composto que absorve no infravermelho são distintas e, tendo-se em vista que moléculas com grupos funcionais distintos apresentam diferentes modos vibracionais, pode-se utilizar este fenômeno tanto para caracterização quanto para quantificação de componentes<sup>72</sup>, até mesmo em baixas concentrações.<sup>73</sup>

Para o NIR, estas distinções são devidas às interações de sobretons e combinações modais relativas a diversos grupos funcionais como, por exemplo, alifáticos (CH), aromático (CH), carboxil (CO), hidroxil (OH), aminas (NH) e amidas (NO). No entanto, o espectro é complexo porque muitas transições podem ocorrer levando a uma grande sobreposição de bandas de absorção.<sup>6</sup>

A espectroscopia no IR possui algumas vantagens em relação a outras técnicas espectroscópicas e eletroquímicas, devido à ampla faixa de comprimento

de onda envolvida e alta frequência analítica. Pode-se analisar amostras em qualquer estado físico e, muitas vezes, sem requerer preparo. Como a análise também pode dispensar a utilização de reagentes, a IR pode ser considerada como uma técnica analítica “verde”.<sup>74</sup>

Os métodos mais utilizados para obtenção dos espectros no infravermelho envolvem a transmissão ou a reflexão. No primeiro caso e, mais antigo, utilizado para fins analíticos, a radiação passa através da amostra, onde parte da radiação é absorvida e outra transmitida. Para isto, a amostra deve ser colocada em uma janela cujo material seja transparente na região utilizada do IR e compatível com a amostra. Já para o segundo caso, as informações são obtidas através da reflexão da radiação incidente, por três diferentes modos: reflexão total atenuada (ATR), reflexão especular (RE) e reflexão difusa (DR).<sup>75,76</sup>

A ATR baseia-se em um fenômeno chamado de reflexão total interna. Embora ocorra a reflexão, parte da radiação penetra além da superfície do meio, e quando o material absorvente está próximo da superfície a radiação perde energia. A radiação atenuada resultante é mensurada e plotada em função do comprimento de onda.

A RE e a DR baseiam-se na reflexão total externa, ou seja, a amostra precisa ser reflexiva ou ser misturada com um material reflexivo. A reflexão especular ocorre quando o ângulo de reflexão é igual ao ângulo de incidência, enquanto que a reflexão difusa ocorre quando estes ângulos não são iguais. A Figura 5 mostra uma representação da reflexão especular e difusa. A intensidade da radiação refletida depende do índice de refração do material, do ângulo de reflexão, da absorvidade da amostra, da superfície e do tamanho das partículas da amostra.

Um espectrômetro NIR equipado com esfera de integração possui a capacidade de detecção uniforme mesmo para amostras heterogêneas, pois apresenta o efeito combinado da reflexão difusa e especular. Além disto, a esfera de integração proporciona uma melhor relação sinal/ruído.

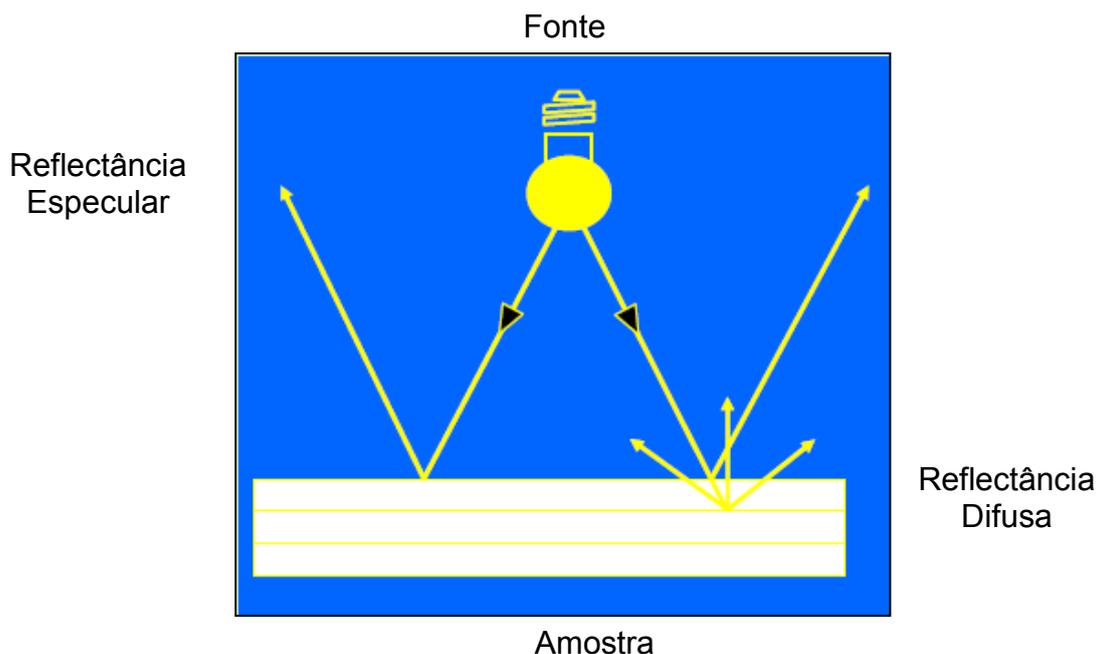


Figura 5. Representação da reflexão especular e difusa.

## 2.6 ANÁLISE MULTIVARIADA

### 2.6.1 Métodos de Reconhecimento de Padrões Não Supervisionados

#### 2.6.1.1 Análise Hierárquica por Agrupamentos (HCA)

A análise hierárquica por agrupamentos é utilizada para dividir um grupo maior de observações em pequenos grupos, cujas características de seus membros sejam similares e que diferentes grupos possuam dissimilaridade, com o intuito de identificar estes grupos. De uma maneira geral, a HCA procura tratar a heterogeneidade dos dados.<sup>77</sup>

O método mais comum de agrupamentos é o aglomerativo, em que cada objeto é inicialmente considerado um agrupamento. Para a formação dos grupos, cada amostra da matriz de dados  $m \times n$  é tratada como um ponto no espaço de  $n$  dimensões. O parâmetro de agrupamento é calculado para cada grupo e, de acordo com o valor encontrado, dois grupos são agrupados formando um novo grupo, e o parâmetro é recalculado para todo o conjunto. Para este novo agrupamento gerado, o parâmetro precisa ser calculado em relação ao grupo.<sup>78</sup>

Um dos parâmetros de agrupamento mais utilizados para a HCA é a distância Euclidiana, em que a distância entre amostras  $k$  e  $l$  é definida como:

$$D_{kj} = \sqrt{\sum_{j=1}^J (x_{kj} - x_{lj})^2}$$

Onde há  $j$  medidas, sendo  $x_{ij}$  a  $j$ -ésima medida da amostra  $i$ .

Outro parâmetro bastante utilizado é a distância de Mahalanobis, que apresenta similaridade com a Euclidiana e é definida como:

$$D_{kl} = \sqrt{(x_k - x_l)C^{-1}(x_k - x_l)'}$$

Onde  $C$  é a matriz de variância-covariância das variáveis, simétrica em relação à diagonal, cujos elementos representam a covariância entre quaisquer duas variáveis de dimensões  $J \times J$ . Logo, esta medida de distância é similar à Euclidiana, porém há adição do termo do inverso da matriz de covariância como fator escalonante.<sup>79</sup>

Os métodos de ligação entre dois grupos podem ser: a média, onde é utilizada a distância dos pontos médios de cada grupo para a ligação, o centróide, onde é calculado o ponto central e a partir deste é calculada a distância e o método de Ward, que ao invés de juntar dois agrupamentos mais próximos, busca juntar dois agrupamentos cuja junção dá origem a menor soma de quadrados dentro do agrupamento.<sup>80</sup>

Quando não restar nenhum agrupamento para realizar ligação, as distâncias são padronizadas e o resultado é apresentado na forma de um dendrograma. A análise hierárquica por agrupamentos é bastante utilizada para identificação de procedência e autenticação de alimentos.<sup>81,82</sup>

### 2.6.1.2 Análise por Componentes Principais (PCA)

A base fundamental da maioria dos métodos para tratamento de dados multivariados é a análise por componentes principais, que consiste numa transformação da matriz de dados, com o objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de fatores.<sup>78</sup>

A PCA é um método para re-expressar dados multivariados. Ela permite a reorientação dos dados de modo que as primeiras poucas dimensões expliquem o maior número possível de informações disponíveis. Esta redução de dimensões torna a visualização mais direta e a sua análise subsequente mais administrável.<sup>80</sup>

A primeira formulação da PCA foi realizada por Pearson<sup>83</sup>, a projeção de que relacionou pontos não coplanares de uma dimensão maior ( $n = 3, 4, 5...$ ) em um plano, utilizando-se das médias, dos desvios padrão e das correlações entre as variáveis do problema. O autor também representou geometricamente para a regressão planar e observou que a reta que mais se adequa ao conjunto de variáveis em questão está inserida no plano de regressão. A partir de sua primeira formulação, o algoritmo da PCA foi sendo aprimorado até os dias atuais.<sup>84,85</sup>

Matematicamente, a PCA fornece a aproximação da matriz de dados originais,  $X$ , em termos do produto de duas pequenas matrizes  $T$  e  $P'$ , de modo a manter o máximo de informação de  $X$  e, desta forma:

$$X = TP' + E$$

Onde,  $T$  é a matriz dos escores e contém as novas coordenadas do sistema de eixos;  $P$  é a matriz dos pesos, onde os elementos de cada coluna correspondem aos coeficientes das combinações das variáveis originais e  $E$  é a matriz dos desvios entre as projeções e as coordenadas originais, denominados de resíduo. As colunas de  $T$ ,  $t_a$  e as linhas de  $P$ ,  $p_a$  são ortogonais entre si, ou seja:

$$p_i'p_j = 0 \text{ e } t_i't_j = 0 \text{ para } i \neq j$$

Um pressuposto básico para a PCA é que a escolha das matrizes  $T$  e  $P'$  seja feita de tal forma a maximizar a variância de  $X$  nas primeiras componentes, ou seja, que as componentes principais de maiores autovalores contenham a maior parte da informação relevante e que as restantes sejam apenas ruído.

As aplicações da PCA envolvem simplificação da matriz de dados, redução do número de variáveis, modelagem, detecção de *outliers*, seleção de variáveis, classificação, entre outras.<sup>86,87,88</sup>

## **2.6.2 Métodos de Reconhecimento de Padrões Supervisionados**

### **2.6.2.1 Método do k-ésimo vizinho mais próximo (kNN)**

O método do kNN é conceitualmente muito mais simples que os outros métodos supervisionados. O algoritmo do kNN é muito similar ao da HCA. As distâncias de todos os objetos do grupo de teste são calculadas em relação a todos os membros do grupo de treinamento. Comumente, é utilizada a distância Euclidiana. A amostra do grupo de teste pertence à classe que possui  $k$  vizinhos mais próximos.<sup>79</sup>

Ni e colaboradores<sup>89</sup> aprimoraram e utilizaram o algoritmo kNN, com o intuito de classificar amostras de folhas de tabaco. Os autores modificaram o algoritmo, de modo que, primeiramente, fosse realizada a PCA do conjunto de dados e após escolhido o número de componentes, o kNN fosse realizado mediante a distância de Mahalanobis. Eles observaram que o tempo de cálculo computacional diminuiu devido à redução no número de variáveis por causa da modificação do algoritmo. Eles obtiveram uma classificação no mínimo 95% correta mediante o algoritmo modificado, enquanto que utilizando apenas o kNN sem modificação, obtiveram classificações com correção entre 66 a 85 %.

### **2.6.2.2 *Soft Independent Modeling Class Analogy (SIMCA)***

O SIMCA cria um modelo matemático para cada classe através da PCA e a amostra do grupo de teste é classificada se a distância do modelo não é

significativamente diferente do desvio padrão residual daquela classe. Entre os métodos supervisionados, o SIMCA tem vantagens, pois ao invés de apenas criar limites entre as classes do grupo de treinamento, ele constrói um modelo para cada classe.<sup>90</sup>

Portanto, o SIMCA cria um espaço  $n$  dimensional para cada classe do grupo de treinamento, onde  $n$  é o número de componentes utilizados na modelagem daquela classe. Para definir a amostra do grupo teste, são calculados as distâncias do espaço do modelo, de modo que:

$$D_j = \sqrt{\left(\frac{T_j^2}{T_{lim}^2}\right)^2 + \left(\frac{Q_j^2}{Q_{lim}^2}\right)^2}$$

Onde,  $T^2$  considera a distância da amostra dentro do espaço do modelo e  $Q$  a distância da amostra fora deste espaço. Esta equação é válida para 95% de significância. Comumente, se  $D_j$  for menor que  $\sqrt{2}$  a amostra é considerada um *outlier* e rejeitada para aquela classe.<sup>59</sup>

### 2.6.2.3 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais é outra abordagem da regressão multivariada, ou seja, uma variante do método de regressão por mínimo quadrados parciais (PLS).<sup>91</sup> Diferentemente da PCA, a PLS-DA não modela exclusivamente as variáveis  $e$ , sendo assim, o método assume uma distribuição dos erros entre os valores de referencia e as variáveis  $e$ , desta forma, modela dois conjuntos:<sup>79</sup>

$$X = T \cdot P + E$$

$$c = T \cdot q + f$$

Onde,  $q$  pode ser considerado análogo aos pesos da PCA e de extensão equivalente ao número de variáveis latentes. O produto de  $T_{ia}$ , denominado de escores e  $P_{aj}$ , denominado de pesos, aproxima-se dos valores das variáveis e o produto de  $T$  e  $q$  aproxima-se dos valores representados em  $c$ . A matriz  $c$  é uma função das classes presentes a serem discriminadas, de modo que para valores próximos de 1 a amostra pertence àquela classe e para valores de próximos de 0 ela não pertence.<sup>92</sup> Se em um dado sistema há cinco classes distintas, a dimensão da matriz  $c$  será representada como:

$$c = 5 \times I$$

Sendo  $I$  a matriz identidade. Desse modo, a matriz  $T$  é a conexão entre os dados experimentais e a distinção de classes. Outra dissimilaridade entre a PCA e a PLS-DA é que nesta não há ortogonalidade entre os vetores de  $P$  e estes não são normalizados, de modo que o somatório dos quadrados não é igual a um. Por outro lado, existe um valor  $g_0$  análogo ao autovalor calculado para a PCA, de modo a explicitar a informação explicada pelo modelo.<sup>79,59</sup>

$$g_0 = \left( \sum_{i=1}^I t_{ia}^2 \right) \left( \sum_{j=1}^J p_{aj}^2 \right)$$

Para cada adição de uma variável latente, o modelo aproxima melhor a relação entre as variáveis e os valores de referência ( $c$ ).

#### **2.6.2.4 Análise Discriminante por Máquinas de Vetor de Suporte (SVM-DA)**

A análise discriminante por máquinas de vetor de suporte é usualmente utilizada para classificação binária, porém pode ser utilizada para classificação de múltiplas classes. Similarmente à PLS-DA, a SVM-DA é uma outra abordagem do algoritmo de regressão, por máquinas de vetor de suporte (SVM). O objetivo do

algoritmo é separar as duas classes através de uma função que será obtida a partir do grupo de treinamento.<sup>93,94</sup>

Existe um conjunto de classificadores que separam as classes, mas apenas um que maximiza esta separação. O SVM-DA busca o hiperplano com a margem máxima de separação, utilizando-se da distância da amostra da classe mais próxima ao hiperplano, como mostrado nas Figura 6 e 7. A teoria deste algoritmo é um pouco mais complexa e está baseada na teoria de aprendizado estatístico, mais especificamente, utiliza-se de algoritmos de aprendizagem para a classificação de padrões, ou seja, o algoritmo busca pela melhor solução possível entre os parâmetros informados, similarmente a algoritmos de redes neurais.<sup>95</sup>

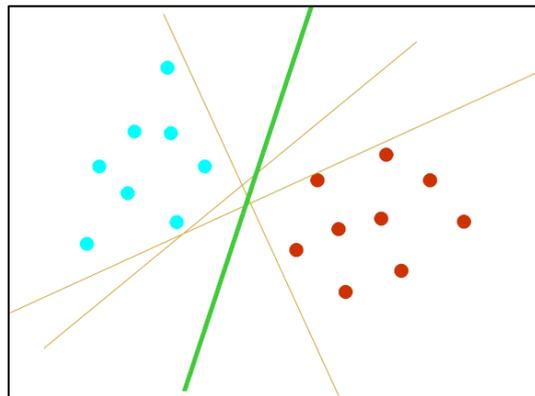


Figura 6. Exemplo de separação segundo o SVM-DA, no qual hiperplano ótimo é indicado pela cor verde.<sup>96</sup>

A teoria de aprendizado estatístico (TAE) estabelece condições matemáticas que auxiliam na escolha de um classificador particular a partir de um conjunto de dados de treinamento. O erro de aproximação ocorre porque o espaço hipótese é menor do que o espaço escolhido enquanto que o erro de estimação é consequência do erro de aprendizado da máquina. O risco de generalização é proveniente da junção destes dois erros, de modo que  $f_u$  seja a função que minimiza este risco, dado por:

$$R[f] = \int_{X \times Y} L(y, f(x)) P(x, y) dx dy$$

$$R[f] \leq R_{emp}[f] + \sqrt{\frac{h \times \ln\left(\frac{2l}{h} + 1\right) - \ln\left(\frac{\delta}{4}\right)}{l}}$$

Onde,  $f$  um classificador e  $F$  o conjunto de todos os classificadores que o algoritmo pode gerar,  $h$  denota a dimensão de Vapnik-Chervoknenkis (VC) da classe de funções  $F$  a qual  $f$  pertence,  $l$  representa a quantidade de exemplos no conjunto de treinamento  $T$  e a parcela da raiz na soma é referenciada como termo de capacidade.<sup>95</sup>

Durante o processo de aprendizagem, o conjunto de treinamento  $T$  composto de  $n$  pares é utilizado para gerar um classificador particular  $f_u \in F$ , de modo que o modelo escolhido seja o espaço hipótese mais próximo ao espaço desejado, onde  $P(x,y)$  é uma distribuição de probabilidade que descreve a relação entre os dados e seus rótulos e é geralmente desconhecido.

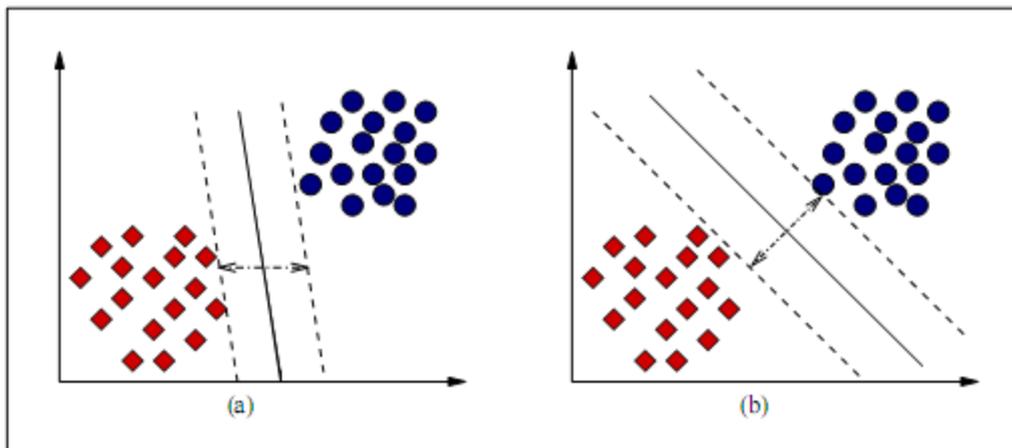


Figura 7. (a) Hiperplano com margem pequena e (b) hiperplano com margem máxima.<sup>96</sup>

A dimensão VC mede a capacidade do conjunto de funções  $F$ . Quanto maior o seu valor, mais complexas são as funções que podem ser induzidas a partir de  $F$ .

Tendo-se em vista a inequação, tem-se que o risco esperado pode ser minimizado pela escolha adequada do algoritmo de aprendizado.<sup>97,96</sup>

Os algoritmos também utilizam funções *kernel*, que possuem a finalidade de projetar os vetores de características de entrada em um espaço de características de alta dimensão, para classificação de problemas que se encontram em espaços não linearmente separáveis, como mostrado na Figura 8. Isto é feito porque o aumento do número de dimensões aumenta a probabilidade desse problema se tornar linearmente separável em relação um espaço de baixa dimensão.<sup>95</sup>

Os algoritmos SVM surgiram do emprego direto dos resultados fornecidos pela TAE, podendo esta ser aplicada à obtenção de fronteiras entre classes de forma linear e não linear.<sup>95</sup>

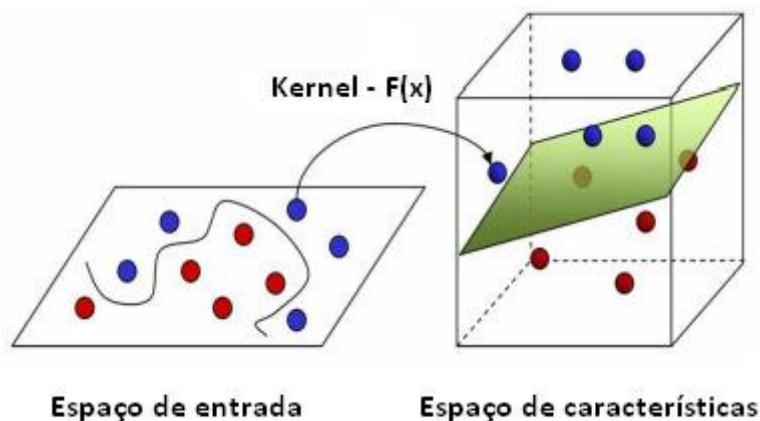


Figura 8 Transformação de um problema não linearmente separável em um problema linearmente separável.<sup>96</sup>

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

A determinação dos elementos majoritários (K, Ca, Mg, Mn, P) e minoritários (Ba, Sr, Cu, Zn, Al, Fe) foi realizada mediante um espectrômetro ICP OES Varian, modelo Vista MPX CCD Simultaneous (Agilent) disponibilizado pelo Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro, em Porto Alegre/RS). Argônio comercial, com pureza de 99,998% da White Martins/Praxair foi utilizado para a geração do gás do plasma, como gás de nebulização, auxiliar e de purga. Os elementos traço (Li, Be, Ti, V, Cr, Ni, Co, As, Se, Rb, Mo, Ag, Sn, Cd, Sb, La, Ce, Tl, Pb, Bi e U) foram determinados mediante um espectrômetro de ICP-MS, modelo ELAN DRC II (da Perkin Elmer/SCIEX), que foi disponibilizado pelo laboratório de Espectrometria Atômica do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os ajustes das principais condições de operação do equipamento de ICP-MS foram feitos monitorando-se a intensidade do sinal obtido para  $^{115}\text{In}^+$  (superior a 30.000 contagens  $\text{s}^{-1}$ , cps), formação de óxidos, monitorada pela intensidade da espécie  $^{155}\text{LaO}^+$  (inferior a 3% da intensidade obtida para o íon  $^{139}\text{La}^+$ ) e intensidade do íon  $^{138}\text{Ba}^{++}$  (menor do que 3% em relação ao  $^{138}\text{Ba}^+$ ), segundo recomendação do fabricante.

Os principais parâmetros instrumentais utilizados, sistemas de introdução da amostra no plasma, os respectivos elementos determinados, os comprimentos de onda e isótopos monitorados estão listados nas Tabelas 1 e 2. Para a moagem das amostras de erva mate foi utilizado moinho criogênico da Spex Certiprep (model 6750 Freezer Mill). O moinho foi disponibilizado pelo laboratório de Espectrometria Atômica do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A moagem criogênica foi realizada em atmosfera de argônio, devido à disponibilidade desse gás.. Foram utilizados também para a moagem das amostras um moinho de facas da Büchi (modelo Mixer B400) e um gral de ágata (com pistilo também de ágata). Para a decomposição das amostras foi utilizado um bloco metálico da TECNAL, modelo TE-007D, com controlador eletrônico de temperatura.

O bloco metálico é acompanhado de frascos de PTFE (politetrafluoroetileno), com capacidade máxima para 50 mL e com tampa rosca.

Tabela 1. Parâmetros instrumentais e condições utilizados nas determinações por ICP OES e ICP-MS.

Parâmetros	ICP OES	ICP-MS
Potência	1300 W	1300 W
Vazão do gás principal	15 L min <sup>-1</sup>	15 L min <sup>-1</sup>
Vazão do gás auxiliar	2,25 L min <sup>-1</sup>	1,2 L min <sup>-1</sup>
Vazão do gás de nebulização	230 kPa	1,0 L min <sup>-1</sup>
Vazão da amostra	1,5 a 2,5 mL min <sup>-1</sup>	1,2 mL min <sup>-1</sup>
Comprimentos de onda, nm	Al (396,153), Ba (233,527), Ca (422,673), Cu (324,754), Fe (238,204), K (769,897), Mg (279,553), Mn (257,610), P (213,617), Sr (407,771), Zn (213,857)	-
Isótopos	-	<sup>7</sup> Li, <sup>9</sup> Be, <sup>47</sup> Ti, <sup>51</sup> V, <sup>53</sup> Cr, <sup>58</sup> Ni, <sup>59</sup> Co, <sup>75</sup> As, <sup>82</sup> Se, <sup>85</sup> Rb, <sup>98</sup> Mo, <sup>107</sup> Ag, <sup>112</sup> Cd, <sup>121</sup> Sb, <sup>139</sup> La, <sup>140</sup> Ce, <sup>208</sup> Pb, <sup>209</sup> Bi, <sup>238</sup> U

Tabela 2. Nebulizador, técnica de medição e diluição da solução da amostra utilizado para cada elemento determinado.

Analito	Nebulizador	Técnica	Fator de Diluição
Ca, K, Mg	Concêntrico	ICP OES	25
Al, Fe, Mn	Concêntrico	ICP OES	10
Ba, Cu, P, Sr, Zn	Ultrassônico	ICP OES	10
Li, Be, Ti, V, Cr, Ni, Co, As, Se, Rb, Mo, Ag, Cd, Sb, La, Ce, Pb, Bi, U	Concêntrico	ICP-MS	10

Os nebulizadores ultrassônico (US-5000 AT+, CETAC), com temperatura de aquecimento de 140 °C e resfriamento de 4 °C, e um nebulizador pneumático (Gemcone, da PerkinElmer) foram utilizados para a introdução da amostra no plasma. O nebulizador pneumático foi adaptado a uma câmara de nebulização do tipo ciclônica.

Os espectros no NIR foram obtidos mediante espectrofotômetro (PerkinElmer modelo Spectrum 400) com esfera de integração, com detector Índio-Galio-Arsênio (InGaAs), na faixa de 10.000 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$ , resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Foram realizadas 32 varreduras e para obtenção do *background* foi utilizado um disco de Spectralon. Todas as amostras foram medidas em triplicata e em ordem aleatória. As amostras de erva mate moída foram analisadas diretamente. A disposição da amostra de erva mate no equipamento, para a obtenção dos espectros das amostras é mostrada na Figura 9.

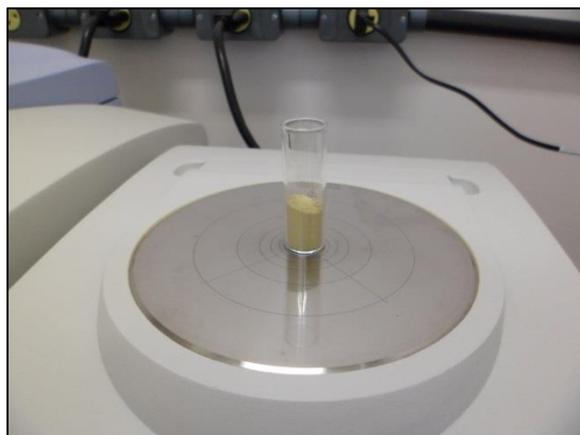


Figura 9. Amostra de erva mate moída sobre o espectrômetro de infravermelho para obtenção do espectro de reflexão.

### 3.2 MATERIAIS E REAGENTES

Foram utilizados ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) 65% (m/m) p.a e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30% (m/m) p.a., ambos procedentes da Merck. As soluções foram preparadas com água ultrapura (com resistividade de 18  $\text{m}\Omega \text{ cm}$ ) purificada em sistema Milli-Q<sup>®</sup> da Millipore. As soluções de calibração foram preparadas em  $\text{HNO}_3$  5% (v/v), a partir de diluições adequadas de soluções estoque da Specsol (para Al,

Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Sr, Zn), SCP33 MS (para Li, Be, Ti, V, Cr, Ni, Co, As, Se, Rb, Mo, Ag, Cd, Sb, La, Ce, Pb, Bi, U) e Titrisol (Merck, para P). A faixa de concentração das soluções de calibração variou de 0,01 a 10 mg L<sup>-1</sup> para ICP OES e 0,01-10,0 µg L<sup>-1</sup> para as determinações feitas por ICP-MS. Em todas as determinações foi utilizada a calibração externa. A avaliação das condições operacionais do equipamento de ICP-MS foi feita com uma solução contendo 1,0 µg L<sup>-1</sup> de In e La e 10 µg L<sup>-1</sup> de Ba.

Todos os frascos e vidraria utilizados, seja para o armazenamento das amostras e soluções das mesmas, ou preparo das soluções de calibração, foram previamente descontaminados com soluções HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) ou 50% (v/v) por 48 horas. Os frascos de PTFE utilizados para a decomposição das amostras foram descontaminados pela adição de 6 mL de HNO<sub>3</sub> e aquecimento a 160°C durante 6 horas, seguido de enxague com água ultrapura.

### **3.3 AMOSTRAS**

Foram analisadas 54 amostras de erva mate comercial provenientes de diferentes regiões da Argentina (14), do Brasil (19), Paraguai(14) e Uruguai (7), as quais foram adquiridas em mercados locais destes respectivos países. A origem geográfica e de cultivo foi obtida através das informações contidas no rótulo das embalagens da erva mate. As características específicas de cada amostra são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Identificação das amostras de erva mate analisadas, país de origem e informações retiradas do rótulo.

Nome	País	Observação	Nome	País	Observação
A01	Argentina		B14	Brasil	Nativa
A02	Argentina		B15	Brasil	Adição de açúcar
A03	Argentina		B16	Brasil	
A04	Argentina		B17	Brasil	
A05	Argentina		B18	Brasil	Para tererê
A06	Argentina		B19	Brasil	
A07	Argentina		P01	Paraguai	
A08	Argentina		P02	Paraguai	Adição de hortelã e boldo
A09	Argentina		P03	Paraguai	
A10	Argentina		P04	Paraguai	Adição de menta, peperina e poleo
A11	Argentina		P05	Paraguai	Adição de boldo e limão
A12	Argentina	Adição de tilo	P06	Paraguai	
A13	Argentina		P07	Paraguai	
A14	Argentina		P08	Paraguai	
B01	Brasil		P09	Paraguai	
B02	Brasil		P10	Paraguai	
B03	Brasil		P11	Paraguai	
B04	Brasil		P12	Paraguai	
B05	Brasil		P13	Paraguai	
B06	Brasil		P14	Paraguai	
B07	Brasil		U01	Uruguai	Adição de fucus e cavalinha
B08	Brasil	Sem agrotóxico	U02	Uruguai	
B09	Brasil	Nativa	U03	Uruguai	
B10	Brasil	Nativa	U04	Uruguai	Adição de tilo e mbucuruya
B11	Brasil	Adição de açúcar	U05	Uruguai	
B12	Brasil		U06	Uruguai	
B13	Brasil	Nativa	U07	Uruguai	

### 3.4 PREPARO DE AMOSTRAS

Para a análise de reflexão no NIR, as amostras foram moídas em moinho criogênico e depois diretamente analisadas. Para a moagem no moinho criogênico foi utilizado um ciclo, com congelamento por dois minutos e moagem por dois

minutos, com 20 batidas por segundo. Para as determinações por ICP OES e ICP-MS as amostras de erva mate foram decompostas segundo o procedimento a seguir: foram pesados 200 mg da amostra e transferidos para frasco de PTFE, ao qual foram adicionados 3 mL de HNO<sub>3</sub> e a mistura deixada em repouso à temperatura ambiente por 14 h. Subsequentemente, o frasco foi levado a aquecimento em bloco digestor metálico por 4 h a 90 °C. Após este período, o frasco foi deixado esfriar à temperatura ambiente e em seguida foram acrescentados 1,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a mistura novamente aquecida por 4 h a 160 °C. Por fim, a solução obtida foi deixada esfriar até à temperatura ambiente e depois transferida quantitativamente para um frasco de polipropileno graduado e o volume da solução foi completado com água até a 20 mL. Todas as amostras foram decompostas em triplicata e em paralelo com prova em branco, também em triplicata. Para a determinação de todos os elementos de interesse, as soluções das amostras foram diluídas conforme informado na Tabela 2. Para as adições de padrão, foram adicionadas alíquotas das solução estoque nas amostras de erva mate antes de serem decompostas no frasco de PTFE.

Para o preparo das infusões, foram pesados 500 mg da amostra bruta (sem moer) em frasco graduado de polipropileno. Foram acrescentados 20 mL de água ultra pura a 100 °C e a mistura mantida por cinco minutos em repouso. Posteriormente, a infusão foi filtrada com papel filtro, e depois o filtrado foi diluído dez vezes com HNO<sub>3</sub> 3% v/v.

### **3.5 ANÁLISE MULTIVARIADA**

O Matlab 7.11 (MathWorks Inc., Natick MA), rotinas do PLS\_TOOLBOX 6.2.1 (Eigenvector Research Inc.) e o pacote iToolbox (<http://www.models.kvl.dk>, Copenhagen, Dinamarca) foram utilizados.

As concentrações dos elementos determinados mediante ICP OES e ICP-MS foram autoescaladas. Para analisar os espectros obtidos no NIR, os dados foram previamente normalizados, derivados em primeira ordem e centrados na média antes da análise multivariada. A derivada primeira tem o objetivo de remover os efeitos aditivos e multiplicativos no espectro, ou seja, corrigir a linha base.<sup>98</sup> A derivada foi realizada com quinze pontos e o polinômio foi de segunda ordem. Para

a HCA, foi utilizada a distância de Mahalanobis e a aglomeração dos grupos foi realizado segundo o método de Ward.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 REFLEXÃO NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Investigações iniciais foram feitas em relação à influência do tamanho de partícula devido à grande heterogeneidade das amostras. A granulometria da erva mate paraguaia era maior, seguida das amostras de erva mate da Argentina. Para esta investigação, foram analisadas as amostras cominuídas em moinho criogênico, em moinho de facas e manualmente em gral de ágata.

Visivelmente, as moagens por moinho de facas e em gral de ágata eram piores, pois era difícil reduzir o tamanho dos talos presentes na erva mate. O moinho de facas, por sua vez, levava a um aquecimento elevado que não era desejado, pois poderia levar à decomposição de compostos orgânicos, essenciais para classificação das amostras e por este motivo não foi mais utilizado. As amostras moídas obtidas através do moinho criogênico eram homogêneas, sem qualquer presença visível dos talos.

Para a identificação dos efeitos do tamanho de partícula foi realizada a PCA, cujos resultados são mostrados na Figura 4. Para os espectros das amostras submetidas à moagem criogênica ou em gral de ágata foram utilizadas doze alíquotas independentes da mesma amostra, três para gral de ágata (F4), em verde, e nove para o moinho criogênico (F1, F2 e F3) em vermelho. A primeira componente, com 99,43 % da variância, representa o espectro médio, não influenciado pelo tamanho de partícula. Porém, a segunda componente, com 0,40 % da variância, distingue as amostras moídas mediante as diferentes técnicas.

Desde modo, evidenciou-se que para a análise no NIR, o tamanho de partícula é um fator crítico para obtenção dos espectros de forma representativa e reprodutiva. Isto porque a erva mate tem uma heterogeneidade intrínseca e que essa condição induz a imprecisões na obtenção dos espectros por reflectância difusa.<sup>72</sup> Desse modo, conclui-se que era necessário submeter as amostras de erva mate à moagem criogênica.

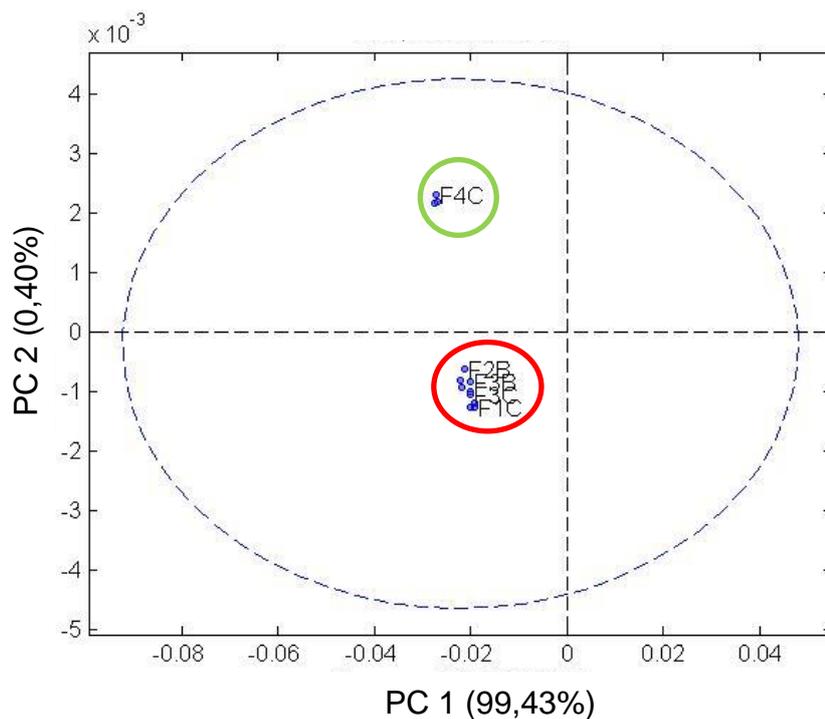


Figura 10. Influência do tamanho das partículas da erva mate na obtenção dos espectros por NIR, segundo os escores da PCA.

Para verificar a influência de outros vegetais (tilo, hortelã, boldo, entre outros) ou ingredientes (açúcar) adicionados à erva mate comercial, foi realizado o i-PCA com o intuito de verificar se estes levavam a uma classificação diferenciada. As classes foram construídas segundo as suas características.

A i-PCA é similar à PCA, porém antes de realizar as operações matriciais, o algoritmo divide as variáveis em  $i$  grupos. Ou seja, para  $i = 2$ , o espectro é dividido em dois intervalos, cada um com o mesmo número de variáveis. A PCA é, então, realizada para cada conjunto, separadamente. Para todas as amostras, o  $i$  foi 1 (PCA global), 2, 4, 8, 12, 16, 24, 32.

Não foi possível concluir que a adição de outros vegetais à erva mate altera a mesma de modo significativo, segundo os espectro de reflexão no NIR nos respectivos intervalos.

Para identificar a erva mate por país de origem, foi escolhido o intervalo de 4200 a 8000  $\text{cm}^{-1}$  da região no NIR, devido à presença de ruído nas demais faixas excluídas. Na Figura 11 são apresentados os espectros normalizados obtidos para

todo o conjunto de amostras. A Figura 12 apresenta os respectivos espectros normalizados e posteriormente derivados em primeira ordem, antes de serem centrados na média, para utilização para análise multivariada.

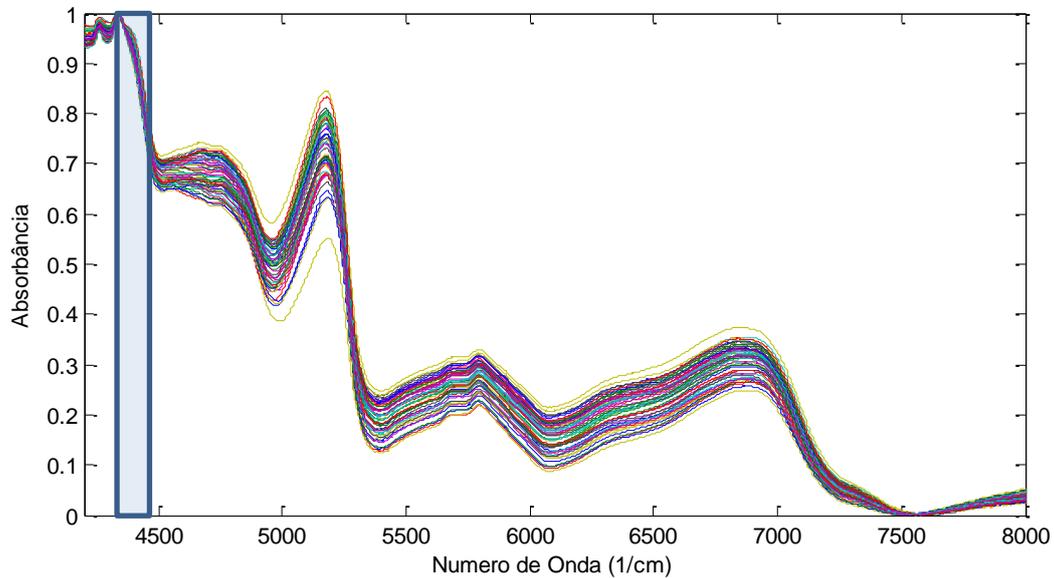


Figura 11. Espectros normalizados das 54 amostras de erva mate obtidos no NIR, em destaque a faixa utilizada para a análise multivariada.

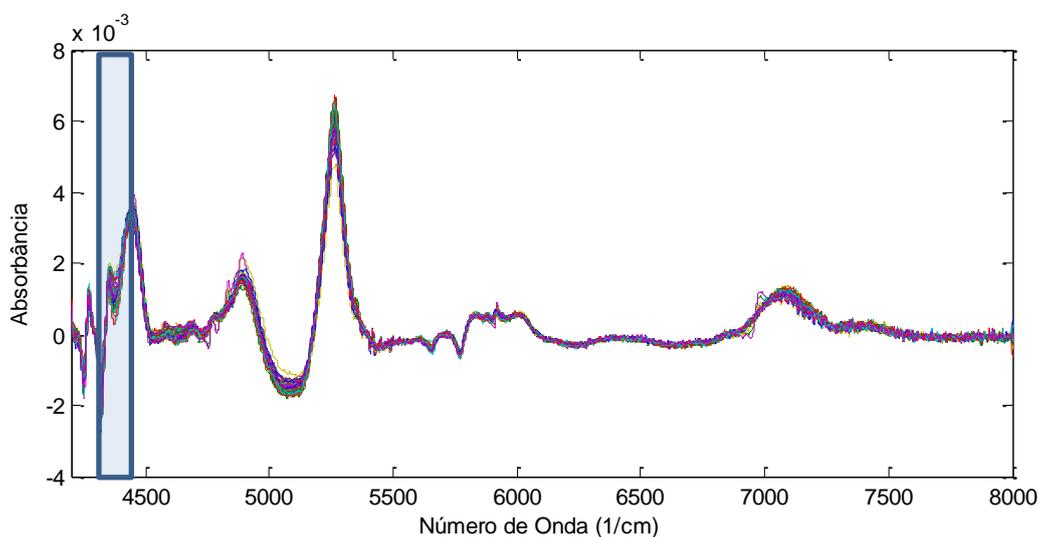


Figura 12. Espectros normalizados e derivados (primeira ordem) para as 54 amostras de erva mate, em destaque a faixa utilizada para a análise multivariada.

Novamente, foi utilizado o i-PCA para escolher a faixa do espectro que poderia melhor classificar as amostras de erva mate e eliminar informações irrelevantes e ruídos.

Os espectros obtidos na região NIR estão associados a modos e combinações vibracionais de grupos funcionais presentes em moléculas e diversos fatores alteram a composição orgânica da erva mate. Coelho e colaboradores avaliaram a influência da intensidade de luz nos teores de teobromina, cafeína e metilxantina e observaram que, com baixa intensidade de luz, o teor de cafeína era aumentado em até 2,5 vezes em relação à planta que ficou exposta à luz solar (100% de intensidade de luz).<sup>99</sup> Esmelindro e colaboradores avaliaram os teores de teobromina, vitamina E e stigmaterol em relação à intensidade da luz e à idade da planta da erva mate. Eles observaram que as variáveis externas ao processo de produção influenciam significativamente na composição do produto e respectiva infusão.<sup>100</sup> Estes estudos indicam que pode haver variação significativa da composição da erva mate comercial por forma de cultivo, e, portanto, por país de origem.

A melhor separação das amostras segundo o país de origem ocorreu na faixa de 4435 a 4318  $\text{cm}^{-1}$ . Os sinais nesta região são devidos às combinações dos grupos funcionais CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> dos diversos compostos presentes na erva mate, tais como xantinas, teobrominas e saponinas. Na Figura 13 é apresentado o dendrograma do espectro no intervalo considerado do NIR, para todas as amostras de erva mate.

Foram utilizadas as distâncias de Mahalanobis e para agrupamento foi utilizado o método de Ward. Os espectros foram normalizados, derivados em primeira ordem, e posteriormente centrados na média. Conforme a Figura 12, as amostras dividem-se em dois grupos maiores e, dessa forma, as amostra brasileiras apresentam maior similaridade com as amostras uruguaias, enquanto que as amostras argentinas maior semelhança com as paraguaias.

Quatro grandes grupos são separados pela HCA, correspondentes a cada um dos países, com agrupamento correto para todas as amostras segundo seus países de origem. As amostras brasileiras e argentinas dividem-se em dois grandes grupos, enquanto que as amostras paraguaias e uruguaias possuem maior similaridade

entre si. As amostras A04 e A10 apresentam maior dissimilaridade entre as argentinas.

Nas Figuras 14 e 15 são apresentados os escores e os pesos da PCA no intervalo de 4435 a 4318  $\text{cm}^{-1}$  do espectro de NIR, pelas três primeiras componentes. Os espectros foram normalizados, derivados em primeira ordem e posteriormente centrados na média.

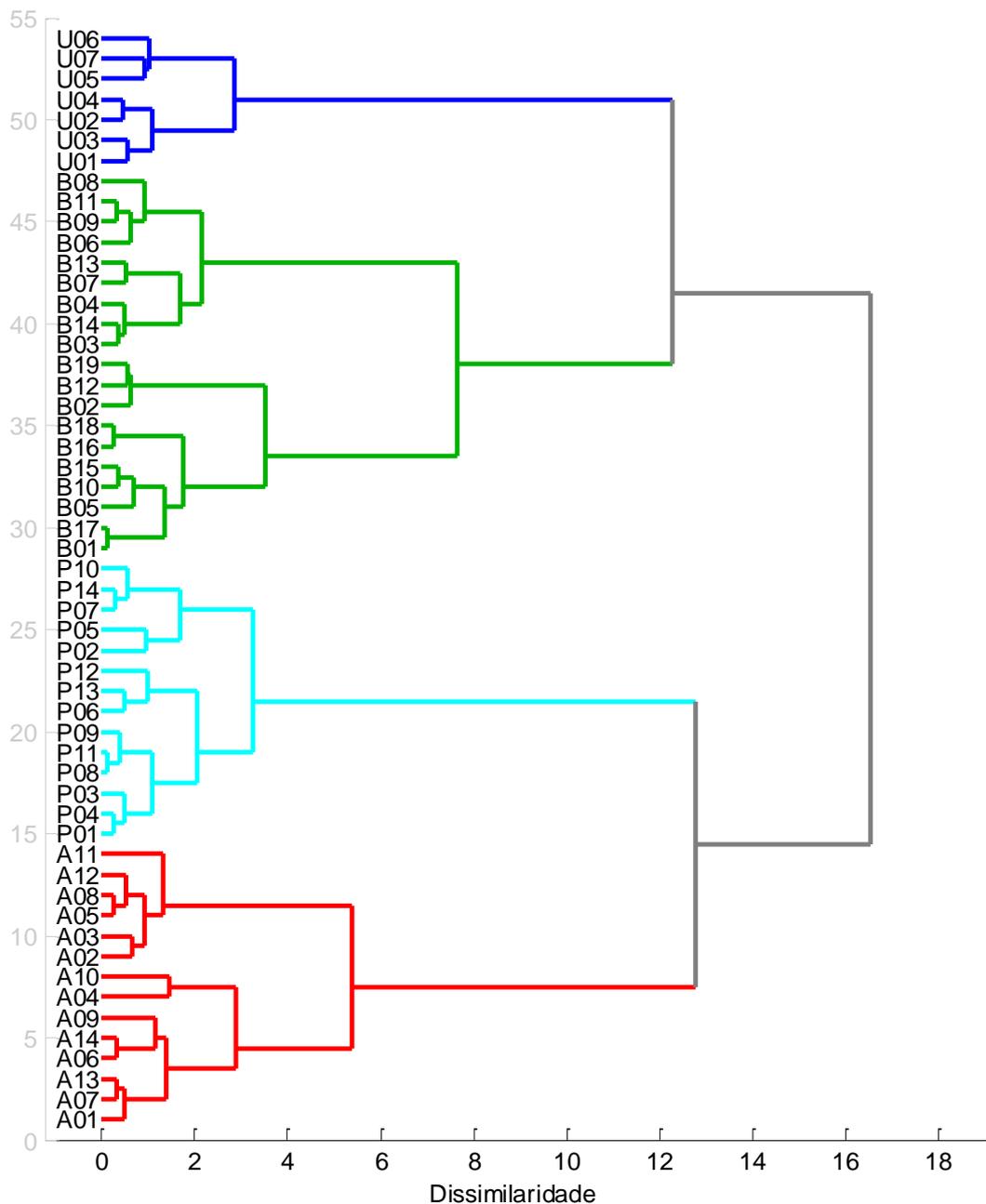


Figura 13. Dendrograma das amostras de erva mate segundo a reflexão no intervalo de 4435 a 4318  $\text{cm}^{-1}$ , no NIR. O conjunto de dados foi normalizado, derivados em primeira ordem, e posteriormente centrados na média. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

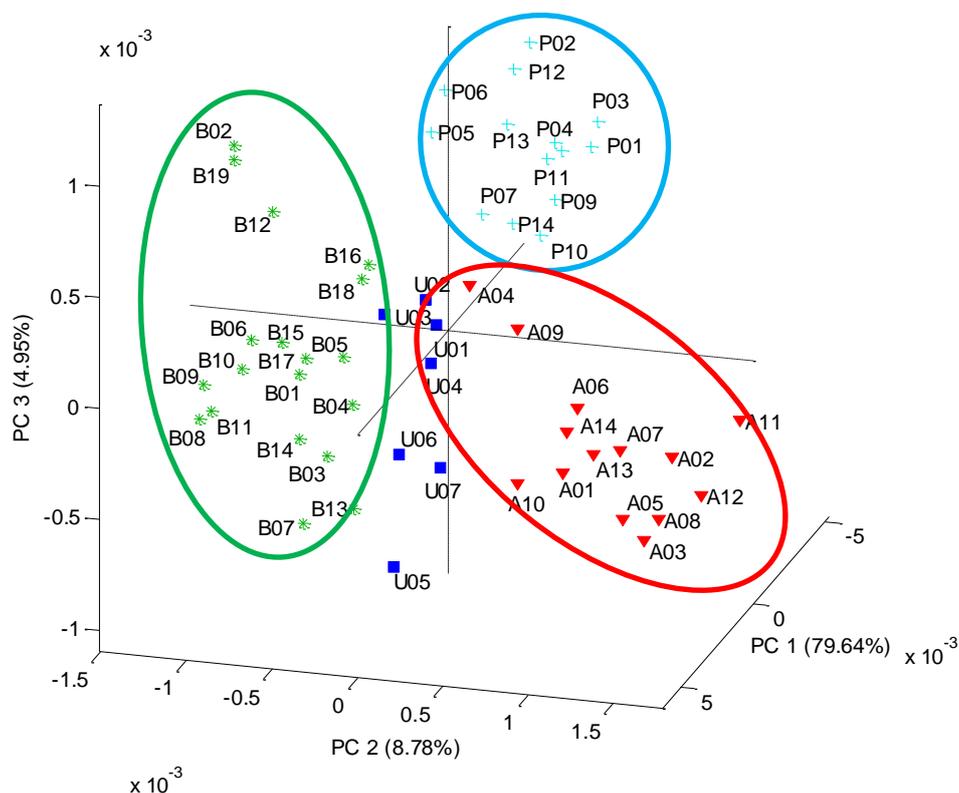


Figura 14. Escores no espaço da três primeiras componentes principais para o intervalo de 4435 a 4318  $\text{cm}^{-1}$ . O conjunto de dados foi normalizado, derivados em primeira ordem, e posteriormente centrados na média. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

Na Figura 14 evidencia-se a separação de três grupos, marcados pelas elipses. A PC2, responsável por 8,78% da variância, distingue as amostras em três grupos: Brasil, Argentina e um terceiro grupo composto pelo Paraguai e Uruguai. A PC3, com 4,95% da variância total, aprimora esta distinção. Porém, apenas com estas duas PCs não é possível distinguir com nitidez a erva mate por país de origem. Sendo assim foi necessária uma terceira componente para aprimorar a distinção. A PC1, responsável por 79,64% da variância, separa as amostras uruguaias das paraguaias e complementa ainda mais a distinção dos países. Somente a PC1 e PC2 juntas não tornam evidente a formação dos grupos distintos por país de origem, e, sendo assim, fez-se necessário a visualização da PC3.

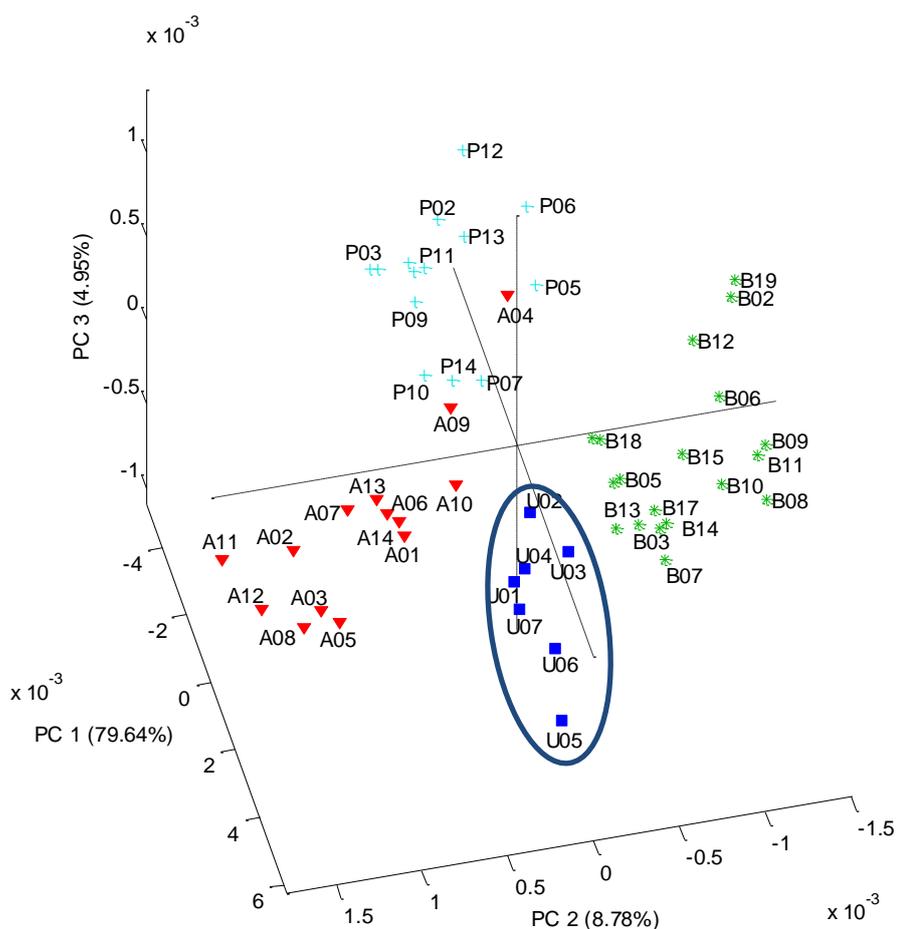


Figura 15. Escores no espaço das três primeiras componentes principais para o intervalo de 4435 a 4318  $\text{cm}^{-1}$ . O conjunto de dados foi normalizado, derivados em primeira ordem e posteriormente centrados na média. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

A Figura 15 apresenta os mesmos escores, porém uma rotação dos eixos foi realizada de modo a evidenciar a separação das amostras uruguaias daquelas dos demais países. As mesmas amostras (A04 e A10, e a A09) que apresentaram maior dissimilaridade pela HCA, aparecem em região limítrofe segundo a PCA.

Todas as amostras foram identificadas corretamente pela PCA. Os resultados obtidos na análise multivariada não supervisionada evidenciaram que é possível identificar a erva mate comercial por país de origem, tendo em vista que na HCA as distâncias relativas entre os agrupamentos são grandes e que é possível separá-los pela PCA, com apenas 3 componentes principais (PCs).

A etapa seguinte foi a criação de um modelo de classificação a partir de um grupo denominado de treinamento. A partir deste modelo procurou-se prever a origem das amostras incluídas no grupo denominado teste. Para isto, todas as 54 amostras foram agrupadas de acordo com o algoritmo de Kennard-Stone<sup>101</sup>, o qual separa as amostras em dois grupos por similaridade.

O grupo de treinamento era composto por 37 amostras, enquanto que o grupo teste era composto pelas 17 amostras restantes. Estes dois grupos foram mantidos para a análise multivariada supervisionada, sendo que foram utilizados os mesmos espectros e pré-tratamentos para HCA, PCA, kNN, SIMCA, PLS-DA e SVM-DA. Os parâmetros de mérito para estas comparações são apresentados nas Tabelas 12 e 13, que serão mostradas mais adiante (vide página 91). Os parâmetros para avaliação do método de classificação são a sensibilidade, que é o percentual de amostras pertencentes à classe e que foram classificadas corretamente, e especificidade, que é o percentual de amostras de outras classes que foram classificadas como estrangeiras (não pertencentes à classe). Em todos os casos a classificação foi 100% correta.

O método kNN geralmente conduz a bons resultados quando existem pequenas diferenças entre as amostras do mesmo grupo, porém, como desvantagem, fornece pouca informação sobre a estrutura das classes e variáveis responsáveis pela classificação.<sup>102</sup> Para a análise segundo o kNN, foi escolhido  $k = 3$ , pois o número de amostras uruguayas era menor em relação os demais países. Porém, mesmo com um  $k$  pequeno, a classificação do grupo teste foi correta para todas as amostras e países.

Para o SIMCA, foi utilizado também o método de validação cruzada *leave one out*. A escolha do número de componentes por classe foi realizada visando-se a melhor classificação das amostras do grupo teste, com o menor número possível de componentes principais (PCs). Desse modo, o conjunto das amostras brasileiras foram modeladas com 3 PCs, o das argentinas e uruguayas com 2 PCs e o das paraguayas com 3 PCs. Para a PLS-DA, similarmente ao SIMCA, foi utilizado o *leave one out* para validação cruzada. Os resultados da classificação pela PLS-DA são apresentados nas Figuras 16, 17, 18, 19 para 5 variáveis latentes (LV). Nessas figuras, a linha horizontal vermelha marca o limite no qual uma amostra é considerada daquela classe, a linha vertical preta separa as amostras do grupo de

treinamento do grupo de teste. Com 5 LV, a classificação foi 100% correta para todas as amostras do grupo de treinamento e teste para os quatro países.

A classificação mediante o SVM-DA também foi 100% correta para todas as amostras de treinamento e teste. A SVM-DA possui a capacidade do próprio algoritmo buscar uma otimização do processo de classificação e, através disto, um melhor ajuste aos dados, fornecendo assim o melhor modelo.

A classificação da erva mate comercial por país de origem pode ser decorrente dos processos de beneficiamento da erva mate que são diferentes entre os países, influenciando nas concentrações de certos compostos.<sup>103</sup> Schmalko e colaboradores<sup>12</sup> avaliaram os teores de cafeína, clorofila e água em diferentes partes do processo e diferentes condições de branqueamento das folhas da erva mate. Os autores observaram mudança das concentrações dos compostos avaliados devido a mudanças no processo de produção.

Condições ambientais tais como a disponibilidade de nutrientes no solo para o crescimento da planta, frequência e quantidade de chuvas, temperatura nas diferentes estações, intensidade de luminosidade, a utilização de fertilizantes e de agrotóxicos, também influenciam na composição da erva mate. Rakocevic e Martim<sup>104</sup> estudaram fatores ambientais e antropogênicos (utilização de fertilizantes e agrotóxicos) que influenciam no crescimento da erva mate e, por consequência, na síntese de diversos compostos nas folhas. Eles observaram que o crescimento da erva mate não é influenciado significativamente em solos com pH ácido e que a planta não responde positivamente à calagem do solo. As plantas de erva mate do gênero masculino possuem folhas de sabor mais amargo e são mais sensíveis a mudanças ambientais do que as plantas do gênero feminino, as quais tem o crescimento mais evidenciado frente à alta intensidade de luz e altos níveis de nitrogênio no solo. Também observaram, como já citado, que a intensidade da luz tem um papel crítico no crescimento das folhas e, por consequência, na composição das mesmas.

Portanto, pode-se afirmar que a classificação da erva mate de acordo com o país de origem mediante o espectro de reflexão no NIR tem relação com as condições de cultivo e processamento da erva mate. Embora não se possa saber a contribuição de cada fator na classificação, com as informações obtidas mediante o

espectro de reflexão no NIR, pode-se afirmar que a distinção observada é de origem natural e consequência dos processos de produção.

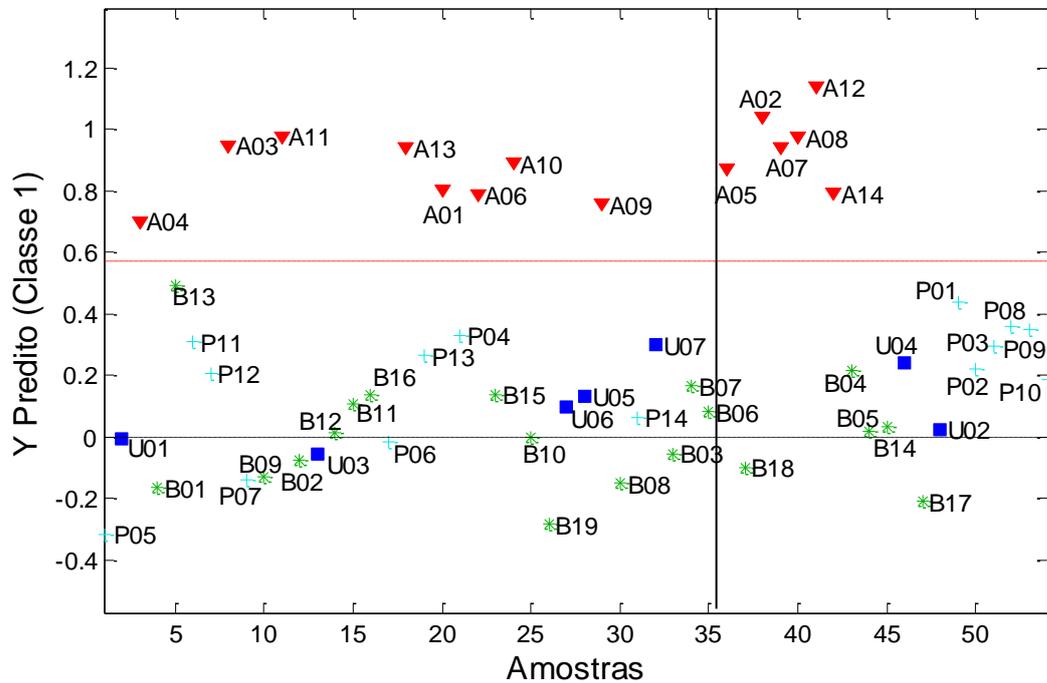


Figura 16. Classificação das amostras de erva mate por PLS-DA de acordo com o grupo de treinamento para a Argentina, mediante o espectro de reflexão no NIR no intervalo de 4435 a 4318  $\text{cm}^{-1}$ . Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. O conjunto de dados foi normalizado, derivados em primeira ordem e posteriormente centrado na média. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

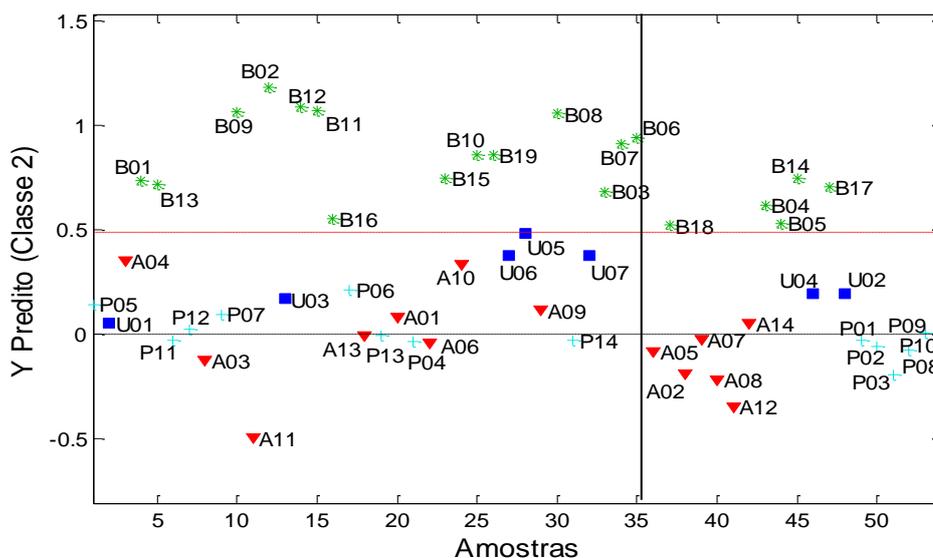


Figura 17. Classificação das amostras de erva mate por PLS-DA de acordo com o grupo de treinamento para o Brasil, mediante o espectro de reflexão no NIR no intervalo de 4435 a 4318  $\text{cm}^{-1}$ . Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. O conjunto de dados foi normalizado, derivados em primeira ordem e posteriormente centrado na média. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

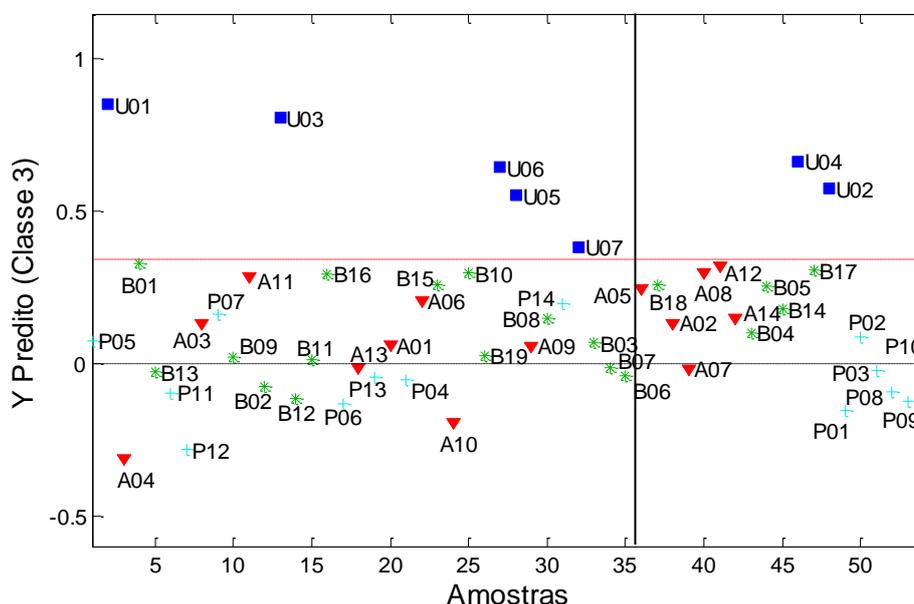


Figura 18. Classificação das amostras de erva mate por PLS-DA de acordo com o grupo de treinamento para o Uruguai, mediante o espectro de reflexão no NIR no intervalo de 4435 a 4318  $\text{cm}^{-1}$ . Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. O conjunto de dados foi normalizado, derivados em primeira ordem e posteriormente centrado na média. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

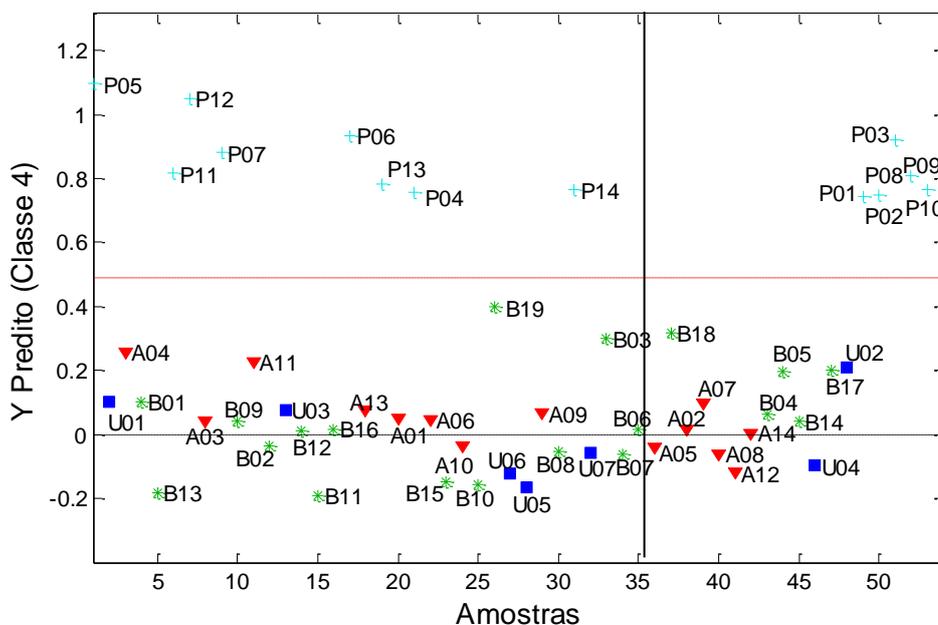


Figura 19. Classificação das amostras de erva mate por PLS-DA de acordo com o grupo de treinamento para o Paraguai, mediante o espectro de reflexão no NIR no intervalo de 4435 a 4318  $\text{cm}^{-1}$ . Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. O conjunto de dados foi normalizado, derivados em primeira ordem e posteriormente centrado na média. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

## 4.2 QUANTIFICAÇÃO DOS ELEMENTOS INVESTIGADOS

Inicialmente, foram investigados os parâmetros de mérito para as técnicas de ICP OES e ICP-MS, utilizadas para a análise elementar da erva mate. Os limites de detecção (LD) foram calculados através da seguinte fórmula:<sup>105</sup>

$$LD = c_{branco} + \frac{3 \times s}{a}$$

Onde  $s$  é o desvio padrão de dez medidas sequenciais do branco,  $a$  é o coeficiente angular da curva de calibração e  $c_{branco}$  é a concentração do analito no branco da amostra. Os valores dos limites de detecção para ICP-MS são apresentados na Tabela 4 e para ICP OES na Tabela 5, levando-se em

consideração a massa de amostra e a diluição envolvida para cada analito (frasco volumétrico de 25 mL e posterior diluição, conforme informado na Tabela 2)..

Tabela 4. Limite de detecção (LD) dos elementos determinados por ICP-MS.

Analito (isótopo)	LD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Analito (isótopo)	LD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Li (7)	0,030	Ag (107)	0,003
Be (9)	0,009	Cd (112)	0,005
Ti (47)	0,017	Mo (98)	0,006
V (51)	0,007	Sb (121)	0,189
Cr (53)	0,010	La (139)	0,026
Ni (58)	0,145	Ce (140)	0,001
Co (59)	0,002	Pb (208)	0,029
As (75)	0,021	Bi (209)	0,0013
Se (82)	0,398	U (238)	0,0006
Rb (85)	0,025		

Tabela 5. Limite de detecção (LD) dos elementos determinados por ICP OES.

Analito	LD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Analito	LD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
K	511	Ba	1,86
Ca	30,1	Cu	3,18
Mg	262	Sr	3,39
Al	46,1	Zn	2,32
Fe	30,9	P	166
Mn	1,64		

Os limites de detecção do K, Ca, Mg, Al, Fe são mais altos devido ao uso da configuração radial do plasma e contaminação do branco, uma vez que estes elementos são abundantes no ambiente em geral.

Para avaliar a precisão e exatidão do método desenvolvido para a determinação dos elementos em erva mate por ICP-MS, os analitos foram adicionado a uma amostra de erva mate antes dela ser decomposta, de forma a obter-se  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito na solução final diluída. Para ICP OES, o mesmo procedimento foi realizado e as concentrações finais variaram de acordo com a concentração de cada analito. Os resultados obtidos são mostrados nas Tabelas 6 e 7. Segundo as Tabelas 6 e 7, as recuperações para os elementos determinados por ICP-MS e por ICP OES foram satisfatórias. As recuperações foram mais altas para o As, 116 %, e para o Ca, 111 %, enquanto que as mais baixas foram para o Ba e P, ambas de 91%. Como as concentrações de Sb, Se, Ag e Bi foram abaixo do limite de detecção do método para todas as amostras, não foi realizado testes de recuperação para estes elementos.

Tabela 6. Concentrações dos elementos encontrados mediante ICP-MS em uma amostra de erva mate adicionada dos elementos antes de ser decomposta. Os desvios padrão são de três determinações em paralelo. A quantidade de analito foi adicionada de modo a obter-se  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  do mesmo na solução final diluída da amostra.

Analito	Encontrado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Desvio Padrão ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Presente na amostra ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação (%)
Li	10,1	0,01	0,11	100
Be	10,9	0,34	0,02	109
V	10,5	0,50	0,22	103
Cr	10,2	0,07	0,40	98,3
Co	10,1	0,49	0,16	99,4
Ni	11,9	0,62	1,95	100
As	11,8	0,79	0,16	116
Rb	25,7	2,34	15,2	105
Mo	9,95	0,57	0,11	98,3
Cd	11,0	0,52	0,46	106
La	10,4	0,58	0,26	101
Ce	10,4	0,46	0,22	102
Pb	10,5	0,61	0,76	97,3
U	9,67	0,25	0,01	96,6

Tabela 7. Concentrações dos elementos encontrados mediante ICP OES em uma amostra de erva mate adicionada dos elementos de interesse antes de ser decomposta. Os desvios padrão são de três determinações em paralelo.

Analito	Adicionado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Desvio Padrão ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Presente na amostra ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação (%)
K	2000	7870	53	5489	95
Ca	2000	4892	21	2662	111
Mg	2000	3969	11	1631	109
Al	500	589	4,5	115	95
Fe	500	551	2,3	89	92
Mn	500	731	2,1	272	92
Ba	75	131	3,1	63	91
Cu	75	83	0,8	12	95
Sr	75	123	2,0	54	92
Zn	75	191	4,6	113	104
P	2000	5897	25	4072	91

#### 4.2.1 Concentração dos Elementos e Análise Univariada

As concentrações médias dos elementos encontradas nas 54 amostras são apresentadas na Tabela 8. As concentrações de Sb, Se, Ag e Bi foram abaixo do limite de detecção do método para todas as amostras. O Li e o Be não foram detectados em algumas amostras. Entre os elementos considerados macronutrientes para plantas<sup>106</sup>, P, Ca, K e Mg encontram-se em concentrações mais altas. A concentração de K encontradas na erva mate é inferior daquela encontrada em outras plantas utilizadas para infusões, como chá preto e chá verde<sup>34</sup>, porém as concentrações de Mg e Ca são mais altas.<sup>88</sup>

Entre os elementos micronutrientes determinados, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn, as concentrações mais altas foram encontradas para Mn e Fe. As concentrações de Cu, Zn, Fe e Mn encontradas na erva mate são mais altas que as encontradas em outras plantas utilizadas para infusões.<sup>33,107</sup> Já em relação aos elementos considerados não essenciais, porém benéficos para o crescimento das plantas, o Al

encontra-se em concentração mais alta e, em comparação a outras plantas utilizadas para infusões, também encontra-se em concentração mais alta na erva mate.<sup>34</sup>

Tabela 8. Concentrações médias dos elementos encontradas na erva mate.

Elemento	Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Desvio Padrão ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Elemento	Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Desvio Padrão ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
K	12317	2094	Cr	0,528	0,240
Ca	6825	802	Ni	2,74	0,945
Mg	4591	842	Co	0,169	0,095
Al	361	108	As	0,052	0,025
Fe	205	89,1	Rb	24,3	9,24
Mn	1078	377	Mo	0,066	0,033
P	3409	548	Cd	0,410	0,180
Sr	34,5	5,51	La	0,286	0,218
Cu	11,9	2,06	Ce	0,283	0,124
Ba	61,5	20,8	Pb	0,314	0,181
Zn	63,6	25,0	U	0,004	0,002
Ti	9,87	5,25	Li	0,085	0,079
V	0,377	0,247	Be	0,023	0,009

Em relação aos elementos contaminantes como As, Pb e Cd, o regulamento para os limites máximos de contaminantes inorgânicos coloca como concentração limite  $0,60 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $0,60 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $0,40 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. As concentrações médias para As e Pb encontram-se abaixo do valor limite e a concentração de Cd no limite, porém em algumas amostras estes valores foram superiores.<sup>108</sup>

Nas Tabela 10 e 11 são apresentados os valores individuais das concentrações dos elementos encontrados mediante ICP OES e ICP-MS. Nas Figuras 20, 21, 22, 23 e 24 são apresentadas as dispersões de Whisker-Box, separando-se as amostras por país de origem. Nestas dispersões, as barras indicam

o valor mínimo e o valor máximo, enquanto que a caixa indica o desvio padrão e os pontos os valores individuais. O ponto central indica a média aritmética e a barra central indica o valor da mediana.

Os resultados mostrados na dispersão Whisker-Box evidenciam que há diferença entre as concentrações de alguns elementos determinados por ICP OES, como Mg, Al, Zn e Fe, por país, indicando que há possibilidade de classificar a origem da erva mate pela concentração destes elementos. Os resultados também mostram que a amplitude das concentrações é grande, indicando que há diferença entre as amostras.

Para alguns elementos traço, o perfil é semelhante quanto à amplitude e à dispersão das concentrações dos elementos nas amostras. A diferenciação destes elementos dentre os países é mais discreta, uma vez que muitos destes elementos não são nutrientes para a planta ou são contaminantes de origem antropogênica.

Com o intuito de identificar a presença de amostras consideradas *outliers*, o teste de Grubbs<sup>109</sup> foi aplicado para cada grupo amostral (país) e elemento, avaliando-se os valores extremos, dois menores e dois maiores, com 95 % de confiança. O teste de Grubbs foi utilizado devido ao considerado número de amostras e também pela sua capacidade de indicar de forma mais minuciosa a presença de pontos extremos da dispersão. Segundo este teste, em nenhum dos grupos de dados avaliados houve mais que 22,2 % de *outlier* e, assim sendo, as amostras consideradas *outliers* foram excluídas para a análise de variância.

Inicialmente, para saber se havia diferença significativa entre as amostras por país de origem, foi realizada a análise de variância (ANOVA) com o intuito de comparar as concentrações de cada analito. Observou-se diferença significativa entre as concentrações da maioria dos elementos, por país de origem, para  $\alpha = 0,05$ , com exceção do Ti, Ni, As, Mo, Cd, U, Li e Be, como mostrado na Tabela 9, indicando a possibilidade de classificação da erva mate através das concentrações de certos elementos.

Tabela 9. Valores encontrados de F para a ANOVA para cada elemento.

F <sub>crítico</sub> = 2,79 (para Li, F <sub>crítico</sub> = 2,82 e para Be, F <sub>crítico</sub> = 2,89)			
Elemento	Valor de F	Elemento	Valor de F
K	6,29	Cr	8,37
Ca	15,33	Ni	2,13
Mg	9,19	Co	7,13
Al	17,65	As	1,74
Fe	8,88	Rb	9,49
Mn	18,47	Mo	2,29
P	5,85	Cd	2,69
Sr	3,30	La	9,46
Cu	3,02	Ce	17,84
Ba	8,91	Pb	3,47
Zn	11,61	U	1,82
Ti	2,06	Li	1,77
V	5,80	Be	2,59

Tabela 10. Concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) dos elementos nas amostras de erva mate, obtidas mediante a técnica de ICP OES.

	K	Ca	Mg	Al	Fe	Mn	P	Sr	Cu	Ba	Zn
A01	11940	6761	4832	422	231	1502	3223	31,6	11,7	77,0	67,0
A02	11764	7663	5232	384	194	1728	3360	34,9	12,1	85,5	84,2
A03	11171	7390	3531	394	288	1121	3409	34,9	11,5	48,9	78,4
A04	12923	7346	4878	343	173	1380	3486	36,8	11,5	78,7	86,1
A05	12285	8020	5515	303	224	1147	3467	41,7	17,0	89,7	97,2
A06	7600	6956	6627	375	217	1182	2829	49,0	13,3	140	50,7
A07	11455	7738	5328	397	139	1824	3372	41,1	13,3	96,3	91,5
A08	12286	8403	4807	344	178	1265	3856	33,9	11,5	61,3	107
A09	7111	7357	6818	350	178	1501	3339	49,6	11,5	153	52,0
A10	12285	7134	4471	372	198	1334	3495	33,7	9,94	61,1	104
A11	11500	8218	5338	378	179	1671	3593	40,2	10,1	94,1	80,5
A12	10434	6094	3581	339	244	1412	3420	27,2	14,7	52,9	58,0
A13	10393	6513	3626	270	183	1153	3518	24,8	14,4	53,0	77,5
A14	9075	5532	3160	190	128	939	3542	25,9	14,5	53,3	78,0
B01	13040	6064	3772	242	195	582	5043	27,8	12,1	58,0	43,7
B02	16763	5423	3566	352	173	955	4781	25,2	13,5	56,3	49,5
B03	13658	6157	3692	378	213	1676	3184	29,8	13,8	55,0	56,9
B04	13070	5799	3867	310	133	940	3412	30,0	15,4	61,2	44,7
B05	14772	5733	3263	349	211	1131	3664	24,9	13,3	48,3	37,3
B06	14758	6865	3841	256	222	955	3609	36,7	12,8	62,3	69,2
B07	14032	6651	4410	291	96,6	705	3919	39,5	9,45	61,4	37,9
B08	12631	6221	4203	251	82,1	554	3983	36,5	9,26	51,6	36,8
B09	10889	6029	3374	285	96,6	951	3126	34,0	10,9	45,4	36,3
B10	9739	5867	4353	333	219	941	4175	24,7	9,77	55,0	41,5
B11	11005	6283	3938	235	160	1022	3335	30,1	9,39	47,2	36,6
B12	8218	5258	4686	276	95,2	658	3134	39,2	8,71	63,5	27,0
B13	10985	6204	4105	355	208	1405	3044	33,0	10,8	46,6	27,0

Continuação da Tabela 10.

	K	Ca	Mg	Al	Fe	Mn	P	Sr	Cu	Ba	Zn
B14	10911	5891	4467	280	132	717	3335	34,2	9,08	50,2	27,6
B15	11396	6477	3638	195	96,5	1831	2827	33,6	12,8	53,6	77,5
B16	10363	6215	4452	260	125	1044	3383	28,9	9,99	50,4	32,6
B17	12264	6183	4365	360	157	934	3590	33,4	9,42	52,8	38,3
B18	10845	6212	3778	192	160	560	4222	31,4	15,0	61,3	68,5
B19	8845	7037	5016	323	151	1194	3273	32,9	12,0	53,2	51,4
P01	12430	6268	4281	293	149	588	3235	34,9	8,63	48,4	88,9
P02	11222	6651	3965	434	383	753	3214	35,9	8,99	49,8	76,7
P03	12492	6493	4156	210	101	533	2925	35,9	7,70	50,4	118
P04	11141	6325	3855	379	361	794	3063	36,6	14,2	54,1	86,3
P05	11678	7132	3589	284	273	631	2953	40,5	11,7	40,8	72,2
P06	12888	6770	5078	402	294	726	3080	31,6	11,3	40,0	55,5
P07	13290	7070	4667	388	170	826	2878	34,5	12,0	57,0	49,7
P08	14229	6967	4937	693	270	986	3144	29,8	11,7	48,9	74,4
P09	14960	7085	4832	341	121	461	3090	40,2	11,5	56,5	68,1
P10	14918	7470	4963	423	207	859	2989	33,3	11,2	55,1	71,7
P11	15851	7366	4726	367	220	811	2984	33,4	11,8	62,1	69,2
P12	15757	7971	5583	504	343	1014	2958	30,3	12,1	48,9	76,6
P13	14523	6735	4779	393	177	533	2129	35,8	11,0	44,6	41,8
P14	15692	6958	4953	267	94,4	708	2876	34,2	12,1	71,1	133
U01	14685	8821	5742	658	555	1501	4725	38,6	12,9	67,5	97,9
U02	12755	7235	5815	575	203	1291	2383	41,4	11,0	56,3	35,5
U03	13537	8496	5865	506	353	1560	4244	33,2	13,7	61,4	84,5
U04	13550	7557	5324	471	361	1252	4247	32,4	12,9	64,8	63,1
U05	14067	7123	5466	494	226	1368	3290	41,3	13,1	56,3	37,0
U06	12723	7371	5715	524	225	1669	3065	41,6	12,5	51,7	38,5
U07	12352	7012	5095	533	305	1478	3644	39,4	17,3	55,2	43,2

Tabela 11. Concentrações (ng g<sup>-1</sup>) dos elementos nas amostras de erva mate, obtidas mediante a técnica de ICP-MS.

Amostra	Li	Be	Ti	V	Cr	Ni	Co	As	Rb	Mo	Cd	La	Ce	Pb	U
A01	80,6	56,2	9655	474	1165	4049	319	42,0	25689	53,5	251	784	315	183	10,1
A02	72,6	31,1	5818	281	712	2465	202	29,3	17207	32,5	234	303	205	186	3,67
A03	76,5	15,3	9020	394	687	2054	119	46,5	13773	89,6	304	263	278	294	4,03
A04	112	< LD	5198	212	620	2536	160	35,2	19813	47,6	250	300	213	341	1,62
A05	41,4	15,3	5272	242	636	2166	145	32,2	15456	44,8	254	284	215	133	1,82
A06	46,4	19,7	4673	279	912	2148	270	29,5	16546	32,0	315	258	252	257	1,78
A07	90,5	26,8	4387	169	645	2644	208	39,0	13975	56,3	453	279	197	131	0,63
A08	57,6	27,7	5271	261	472	1975	89,5	31,4	11071	39,6	309	195	189	99,6	1,69
A09	50,0	19,7	4192	181	555	2651	335	31,4	20109	19,6	143	238	216	173	2,12
A10	39,1	24,1	4988	242	776	2735	140	44,3	13654	41,5	482	316	201	95,4	1,55
A11	59,1	17,5	4327	223	611	2354	202	53,5	13350	89,3	792	267	204	450	18,5
A12	81,0	24,8	25486	252	679	4428	222	68,6	40457	71,9	464	475	395	359	5,50
A13	88,9	23,4	9739	376	559	2788	247	49,7	21668	53,4	530	410	276	149	2,01
A14	41,3	13,6	8394	248	559	3095	269	49,3	23050	47,4	446	361	225	256	1,27
B01	494	13,9	8908	166	696	1275	49,0	49,5	27673	128	703	106	201	656	1,75
B02	74,7	18,5	9819	219	861	1374	75,5	52,5	57451	156	669	144	237	405	3,11
B03	< LD	< LD	6163	295	389	2219	69,8	15,0	24143	35,3	286	71,0	172	397	2,79
B04	< LD	< LD	5014	95,0	132	995	14,3	14,8	22421	41,2	230	73,7	126	123	2,08
B05	29,1	< LD	3693	141	173	961	18,4	18,3	27906	51,7	306	57,0	113	85	2,45
B06	31,6	< LD	4991	278	214	1239	47,2	14,0	22658	35,2	491	116	125	122	2,16
B07	< LD	42,3	6824	147	269	556	76,0	40,9	54492	143	944	95,4	125	336	3,29
B08	< LD	< LD	10060	175	376	1095	91,6	55,7	38983	104	678	109	319	453	3,62
B09	11,0	< LD	10845	201	289	4018	93,9	53,4	26131	38,6	389	127	218	873	1,96
B10	42,7	12,5	19325	763	430	3359	417	121	26945	58,0	695	314	363	248	1,00
B11	22,6	< LD	12507	379	362	3207	197	86,6	35215	56,6	677	132	185	899	2,75
B12	< LD	28,2	8574	229	250	3437	90,3	58,4	26870	77,2	295	101	182	312	2,21
B13	22,9	< LD	17722	625	258	4042	201	81,6	27866	23,5	242	176	310	565	3,59

Continuação da Tabela 11.

Amostra	Li	Be	Ti	V	Cr	Ni	Co	As	Rb	Mo	Cd	La	Ce	Pb	U
B14	23,1	12,5	8776	269	460	3000	132	75,1	31270	81,3	225	104	214	354	2,78
B15	< LD	< LD	8938	142	130	3246	182	49,5	33506	14,1	414	94,5	130	180	1,58
B16	28,9	< LD	11568	352	233	3301	164	34,9	33493	41,0	312	158	226	278	2,87
B17	84,3	< LD	13455	331	567	2892	192	75,4	39864	77,2	518	218	151	461	6,84
B18	29,4	< LD	9715	252	575	2117	158	25,4	23635	31,7	869	319	202	555	1,38
B19	< LD	< LD	11542	302	363	2922	31,5	37,3	20870	71,3	393	195	238	428	1,94
P01	63,0	16,7	11962	490	691	3733	319	75,1	27643	90,8	618	683	367	198	4,54
P02	115	15,7	30072	1297	876	1552	361	98,4	21640	104	442	677	666	329	12,6
P03	108	32,9	8490	345	566	3534	149	62,0	21710	96,8	553	516	312	187	4,13
P04	131	17,7	17835	839	788	4706	281	88,3	27585	88,3	184	627	419	354	6,89
P05	128	21,9	11668	598	823	3803	254	87,6	23483	77,6	336	1279	632	258	4,86
P06	148	31,3	18334	792	821	4368	182	87,4	24559	95,2	354	605	387	227	5,67
P07	24,1	30,2	9853	426	371	2547	200	46,2	26242	43,2	385	230	339	399	4,45
P08	270	27,7	11841	509	416	2859	254	52,0	15820	29,3	279	398	585	178	3,20
P09	193	23,6	6131	231	216	2935	142	33,4	19737	97,2	442	218	327	219	3,00
P10	154	28,8	9176	451	322	3547	238	39,7	22379	70,3	426	339	335	342	1,49
P11	110	27,3	10235	489	214	2507	196	33,1	24773	32,5	491	263	343	250	0,42
P12	34,9	18,8	15722	786	509	3087	208	63,5	18124	51,2	368	300	384	302	2,87
P13	124	25,9	6425	242	307	2518	115	53,3	20894	48,3	259	155	351	537	3,22
P14	138	23,8	5254	127	129	3023	279	20,0	16113	23,9	387	230	234	119	0,42
U01	67,0	13,6	12873	1160	846	2287	264	129	20766	82,1	367	434	564	229	9,67
U02	67,8	10,9	5646	292	851	3549	33,7	64,3	20730	96,6	173	174	354	669	6,47
U03	47,5	< LD	9180	564	759	2638	146	42,3	13803	66,7	330	276	295	133	7,12
U04	38,1	9,5	9035	408	569	2008	80,1	38,8	14228	86,2	267	185	254	182	3,10
U05	30,7	< LD	6461	240	584	2246	28,6	44,3	20160	66,4	208	103	202	267	6,23
U06	35,9	< LD	7956	334	694	3057	41,8	43,0	20718	91,6	329	138	316	379	1,81
U07	127	11,0	14071	557	564	3923	114	72,1	26402	134	394	199	378	344	5,75

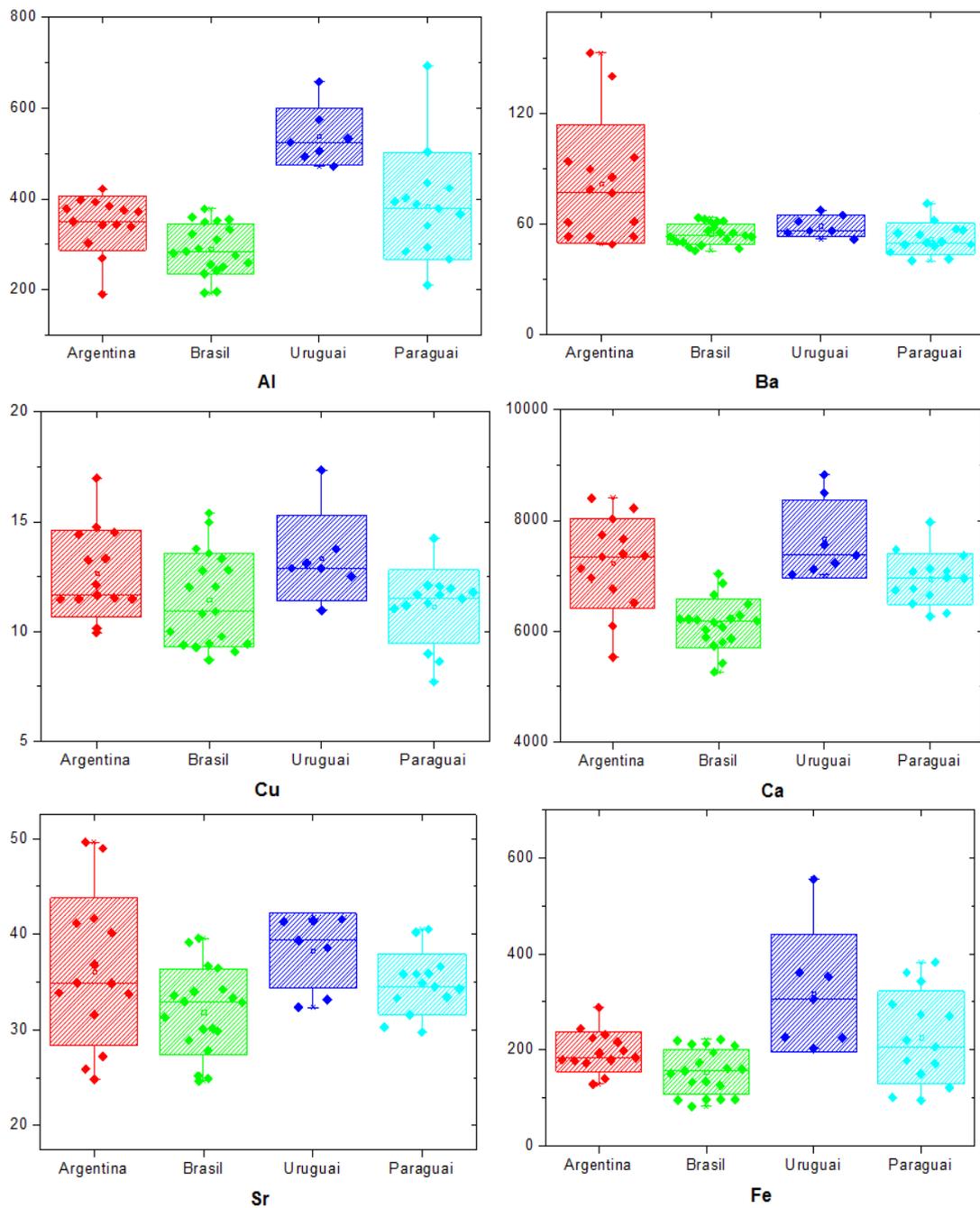


Figura 19. Dispersão Whisker-Box mostrando a amplitude das concentrações dos elementos nas amostras de erva mate. As linhas horizontais de cada dispersão são, de baixo para cima: o valor mínimo, o desvio padrão inferior, a mediana, o desvio padrão superior e o valor máximo. O ponto central marcado em cada caixa é a média aritmética e os demais pontos são as amostras. No eixo y são informadas as concentrações, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

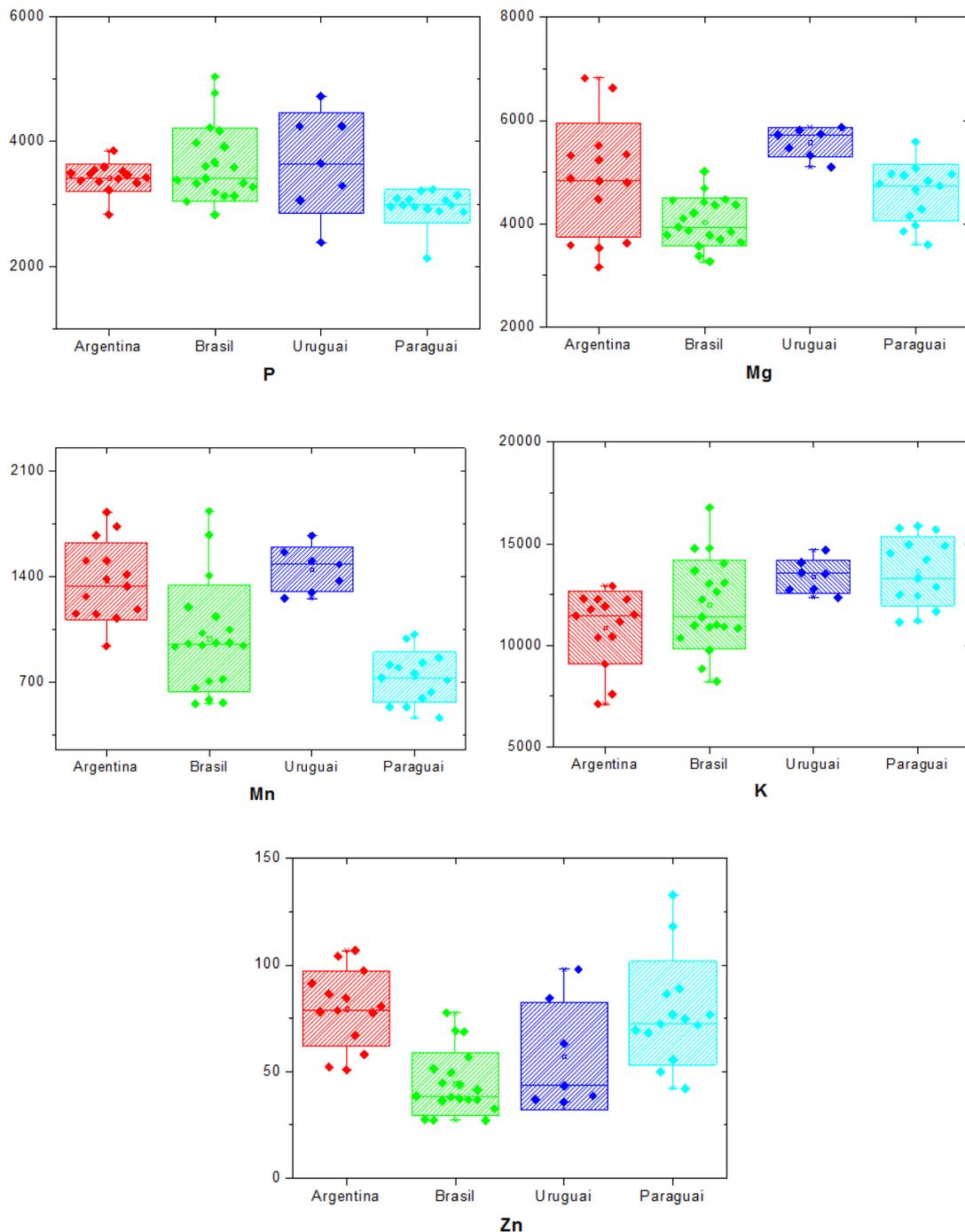


Figura 20. Dispersão Whisker-Box mostrando a amplitude das concentrações dos elementos nas amostras de erva mate. As linhas horizontais de cada dispersão são, de baixo para cima: o valor mínimo, o desvio padrão inferior, a mediana, o desvio padrão superior e o valor máximo. O ponto central marcado em cada caixa é a média aritmética e os demais pontos são as amostras. No eixo y são informadas as concentrações, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

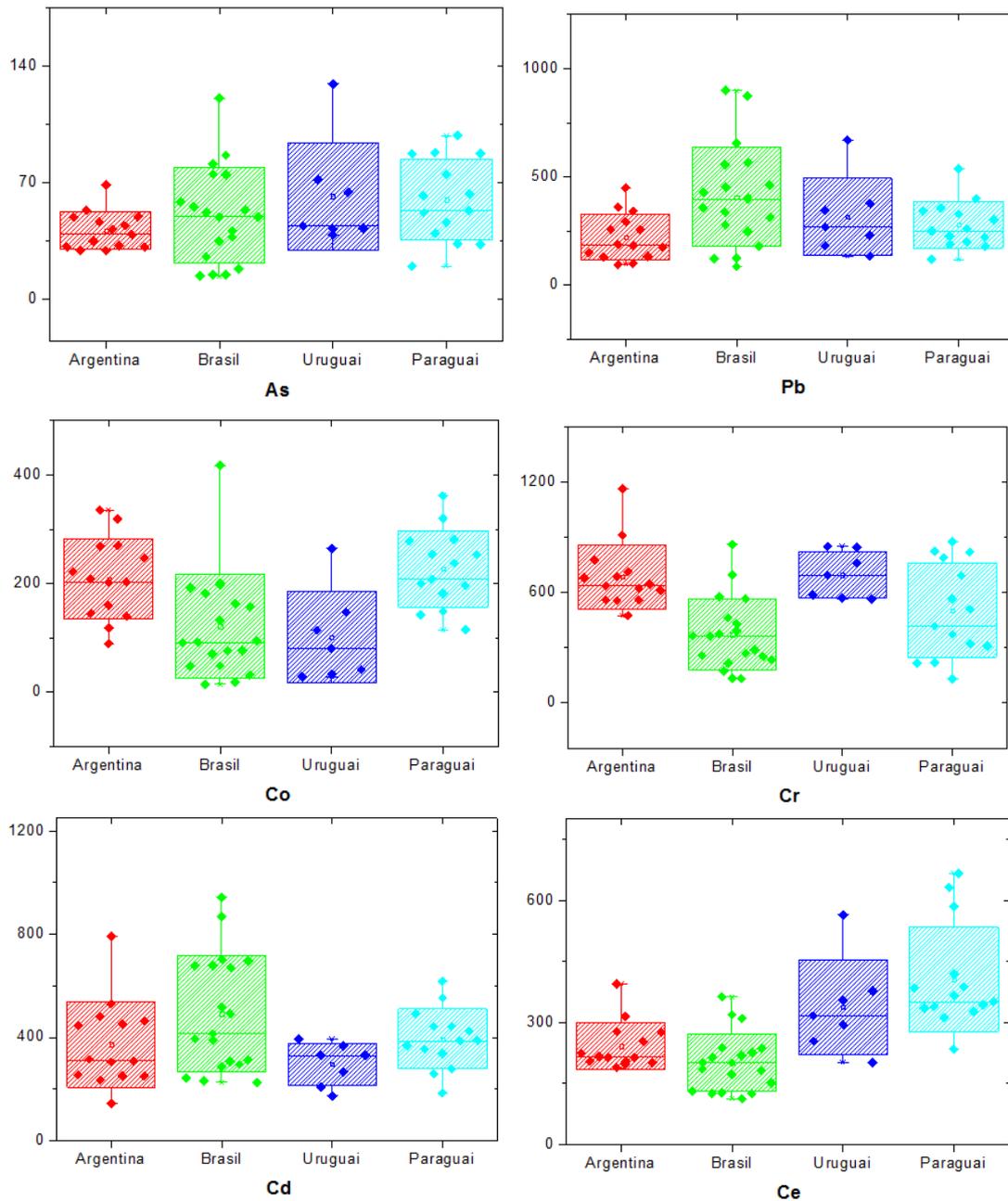


Figura 21. Dispersão Whisker-Box mostrando a amplitude das concentrações dos elementos nas amostras de erva mate. As linhas horizontais de cada dispersão são, de baixo para cima: o valor mínimo, o desvio padrão inferior, a mediana, o desvio padrão superior e o valor máximo. O ponto central marcado em cada caixa é a média aritmética, e os demais pontos são as amostras. No eixo y são informadas as concentrações, em  $\text{ng g}^{-1}$ .

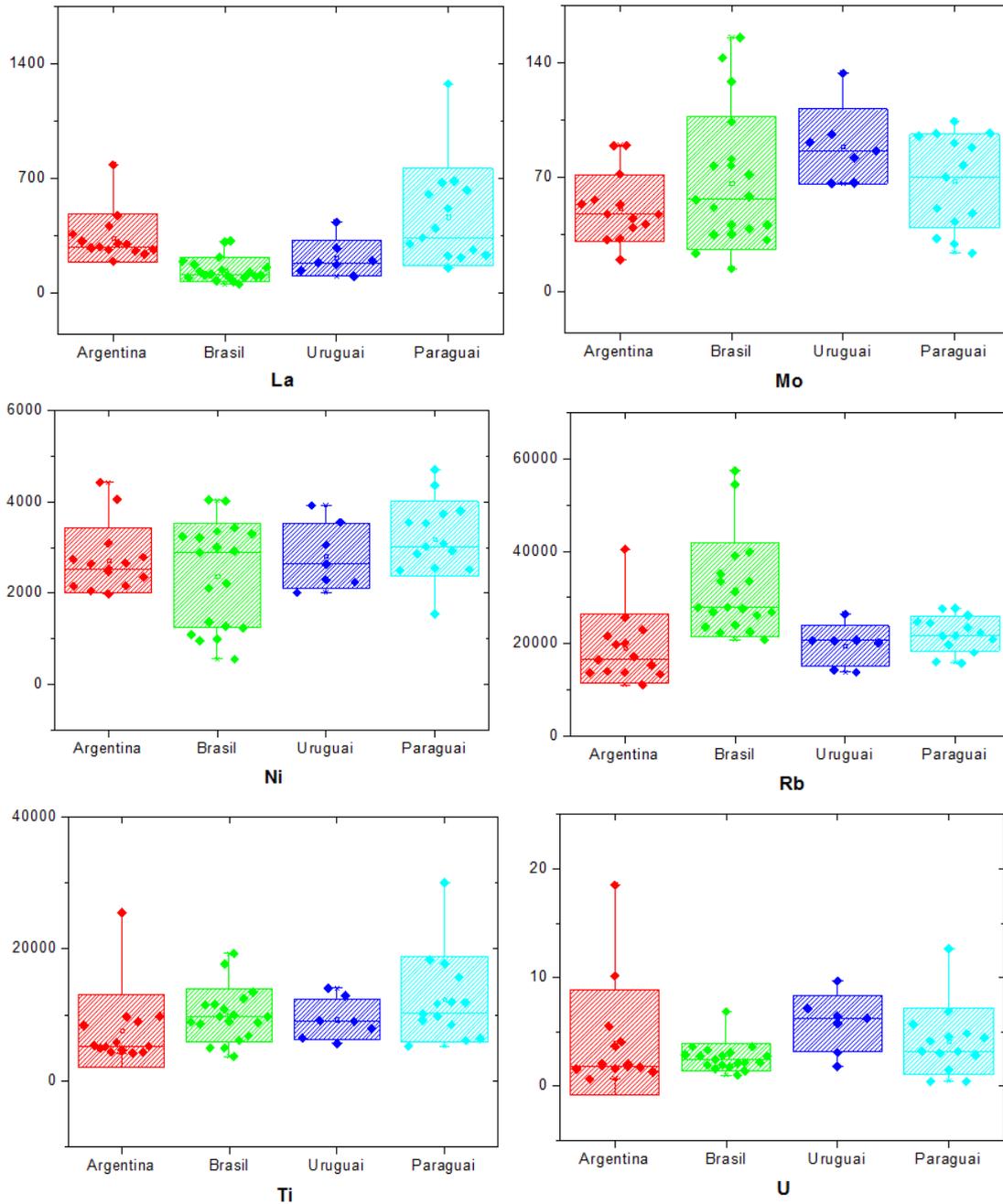


Figura 22. Dispersão Whisker-Box mostrando a amplitude das concentrações dos elementos nas amostras de erva mate. As linhas horizontais de cada dispersão são, de baixo para cima: o valor mínimo, o desvio padrão inferior, a mediana, o desvio padrão superior e o valor máximo. O ponto central marcado em cada caixa é a média aritmética e os demais pontos são as amostras. No eixo y são informadas as concentrações, em  $\text{ng g}^{-1}$ .

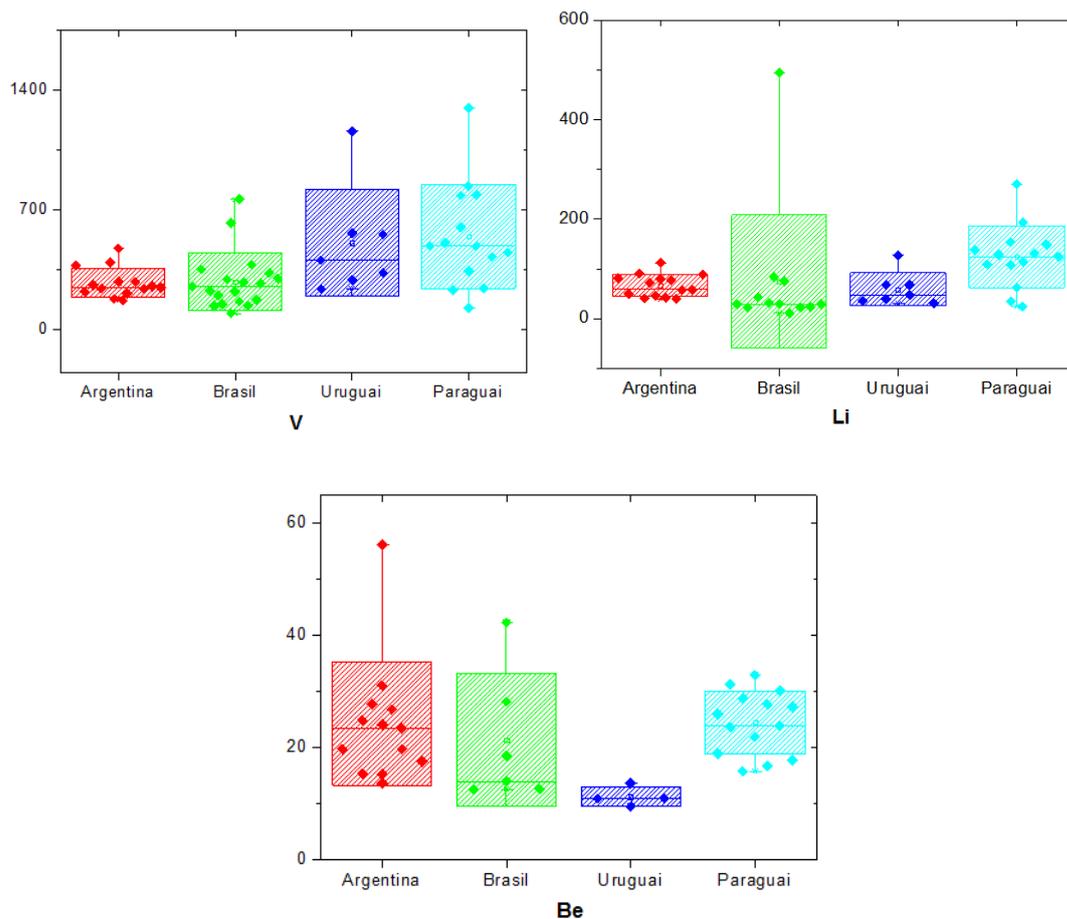


Figura 23. Dispersão Whisker-Box mostrando a amplitude das concentrações de dos elementos nas amostras de erva mate. As linhas horizontais de cada dispersão são, de baixo para cima: o valor mínimo, o desvio padrão inferior, a mediana, o desvio padrão superior e o valor máximo. O ponto central marcado em cada caixa é a média aritmética e os demais pontos são as amostras. No eixo y são informadas as concentrações, em  $\text{ng g}^{-1}$ .

As concentrações dos elementos na infusão de erva mate também foram investigadas. Para isto, foram realizadas extrações com água quente na erva mate comercial sem ser submetida a moagem em laboratório, com o objetivo de simular a preparação da infusão. Foram escolhidas cinco amostras aleatórias de todo o conjunto. Na Tabela 12 são apresentados os percentuais médios de extração, em relação à concentração total dos elementos encontrados na erva mate decomposta.

Tabela 12. Percentual médio de extração dos elementos na erva mate, relativo à concentração total, simulando o preparo da infusão. A média é para 5 amostras de erva mate.

Analito	Extraído (%)	Analito	Extraído (%)	Analito	Extraído (%)
Al	1	Cu	42	P	51
As	48	Fe	15	Pb	75
Ba	9	K	59	Rb	66
Be	39	La	60	Sr	2
Ca	12	Li	83	U	< LD
Cd	53	Mg	46	V	37
Ce	31	Mn	53	Zn	32
Co	65	Mo	50		
Cr	26	Ni	60		

De acordo com a Tabela 12, Al, Sr, Ba, Ca e Fe são poucos extraídos, indicando que estes elementos podem estar ligados a compostos da erva mate, enquanto outros podem estar presentes como contaminantes. Tendo-se em vista que no preparo da infusão de erva mate, a extração é sequencial, ou seja, a mesma erva passa por diversas extrações, cerca de 15 a 20 repetições, a quantidade extraída de cada elemento pode aumentar.<sup>11</sup>

#### 4.2.2 Análise Multivariada

Para a identificação da procedência da erva mate mediante a concentrações dos elementos, os dados foram separados em três grupos. No primeiro grupo (G1) foram incluídos apenas os dados referentes aos elementos determinados mediante a técnica de ICP OES, com o objetivo de investigar se somente as concentrações destes elementos já identificariam o país de origem da erva mate. No segundo grupo (G2) foram incluídos as concentrações dos elementos determinados mediante ICP-MS e no terceiro grupo (G3) foram incluídos as concentrações de todos os elementos. Em G2 e G3, não foram incluídas as concentrações de Li e Be, pois os mesmos não foram detectados em algumas amostras.

Nas Figuras 25 e 26 são apresentados os escores e os pesos da PCA para G1, com os dados autoescalados. Os elementos utilizados para a PCA foram escolhidos com o intuito de se obter a melhor separação possível entre os países (classes). Dessa forma, dos 11 elementos determinados por ICP OES, as concentrações de Sr e Fe foram excluídas. Nos escores, fica evidenciado a existência da separação entre as quatro classes, entretanto, a interface entre elas é mais sobreposta. Isto pode ser devido à quantidade de informações expressadas pelas três componentes, por representar apenas 68,21 % do total da informação.

A primeira componente, com 33,34 % da variância, separa amostras brasileiras e argentinas. Esta separação é aprimorada com a adição da terceira componente, com 15,31 % da variância. As amostras uruguaias formam um grupo distinto mediante as componentes 1 e 3. A segunda componente, com 19,56 % da variância, é responsável pela distinção das amostras paraguaias.

As amostras A07 e A10 formam um grupo à parte. Isto é devido às concentrações de Mg, Mn, P, Ba e Cu, cujas combinações tornaram estas amostras distintas e similares entre si. A amostra A14 é diferente das amostras de sua classe, sendo similar às amostras brasileira.

Nos pesos, estão dispersos os elementos responsáveis pela separação apresentada nos escores. As amostras argentinas, dispostas sobre o eixo da PC 1, contem um teor mais elevado de Ca e Al. As amostras uruguaias apresentam perfis similares aos das argentinas, no entanto os teores de K, Mn e Mg, que estão no eixo da PC 2, os diferencia desta classe. As amostras paraguaias são identificadas nos escores devido às baixas concentrações de Ba, Mn e Mg em relação às demais classes. As amostras brasileiras separaram-se devido às diferentes concentrações de Cu, Zn e P.

A etapa seguinte foi a criação dos modelos de classificação a partir do grupo treinamento e sua avaliação mediante o grupo teste. As 54 amostras foram agrupadas segundo o algoritmo de Kennard-Stone, o qual separa as amostras em dois grupos por similaridade.

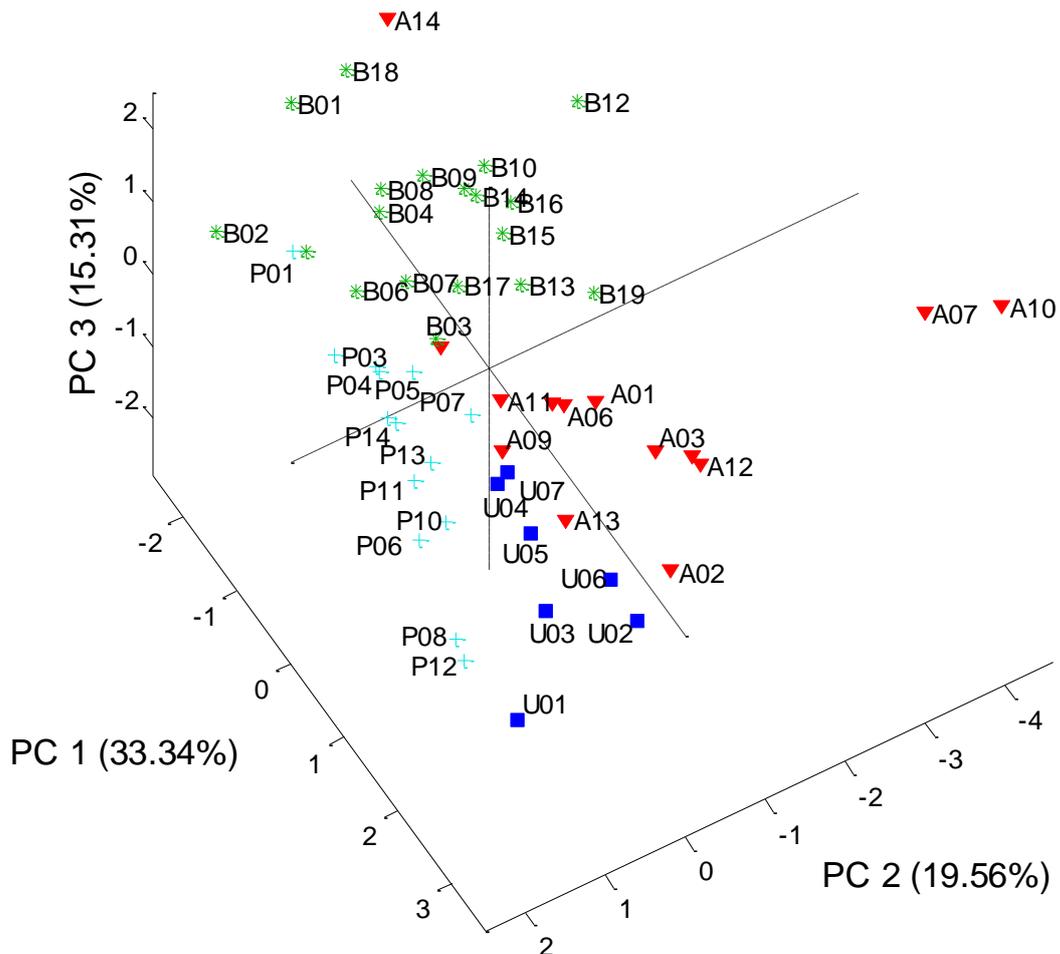


Figura 24. Escores no espaço das três primeiras componentes principais para as concentrações dos elementos determinados mediante a técnica de ICP OES, com exceção de Sr e Fe. Os dados foram autoescalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

O grupo de treinamento foi composto por 36 amostras enquanto que o grupo teste foi composto pelas outras 18. Estes dois grupos foram utilizados para análise multivariada supervisionada mediante os quatro algoritmos estudados. Os mesmos pré-tratamentos e as mesmas variáveis foram escolhidos em relação aos utilizados pela PCA para o G1. Os mesmos parâmetros utilizados para avaliar a classificação para os espectros de reflexão no NIR, a especificidade e a sensibilidade, foram usados. Para estes três grupos, os resultados são citados nas Tabelas 15, 16, 17, 18, 19 e 20 (vide páginas 92, 93 e 94).

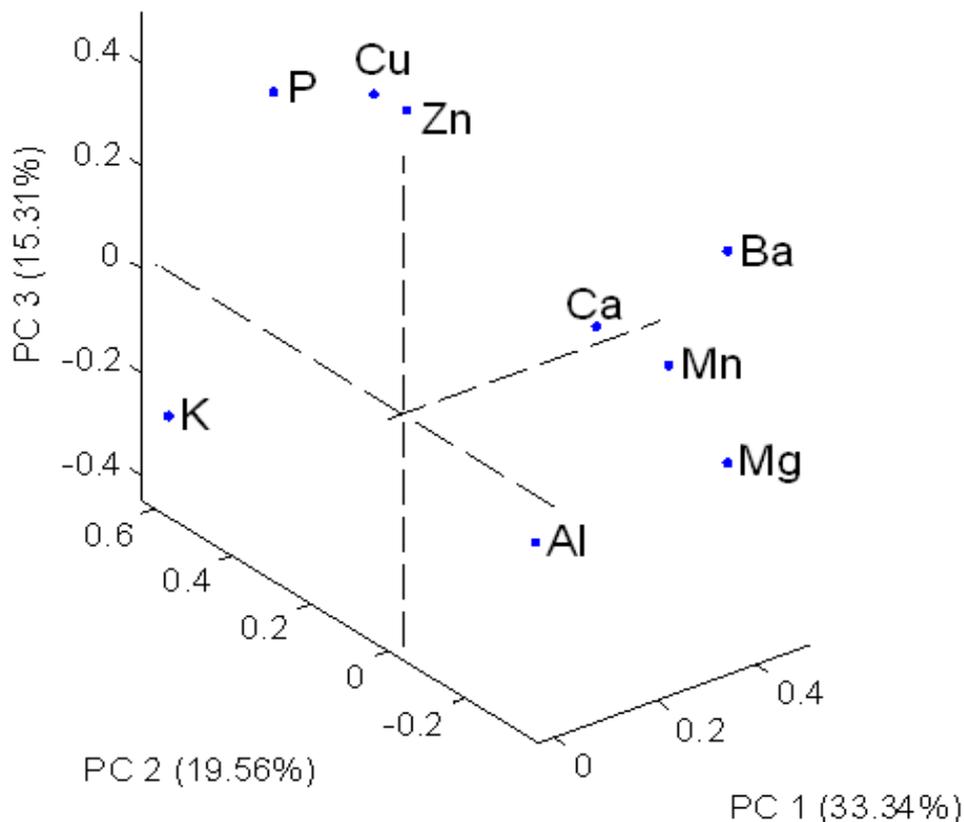


Figura 25. Pesos no espaço das três primeiras componentes principais para as concentrações dos elementos determinados mediante a técnica de ICP OES, com exceção de Sr e Fe. Os dados foram autoescalados.

O primeiro algoritmo a ser aplicado para análise multivariada foi o kNN. Para aplicação deste, as concentrações dos elementos foram autoescaladas e foi escolhido  $k = 3$ , com a mesma justificativa apresentada para o NIR. Por este método, a classificação das amostras brasileiras e paraguaias foi 100 % correta. A amostra A14, que pelo algoritmo de Kennard-Stone foi selecionada para o grupo de teste, foi considerada como uma amostra brasileira. Desta forma, reiterando os resultados obtidos pela PCA. Já em relação às amostras uruguias, a amostra U04 foi considerada como argentina. Tendo em vista que, segundo a PCA, a amostra U04 está em região de fronteira na dispersão dos escores entre Argentina e Uruguai, reitera-se que a separação obtida pela PCA pode ser aprimorada com o aumento do número de componentes. Isto porque o kNN utiliza 100 % da informação, através das distâncias e as quantidades de vizinhos mais próximos como critérios de classificação, enquanto que a PCA pode ser generalizada como uma rotação dos eixos de modo a se obter a maior variância nos principais eixos.

Para o SIMCA, foi utilizado o método de validação cruzada *leave one out* e os dados foram autoescalados. A escolha do número de componentes principais para cada classe foi de tal modo que a classificação fosse a melhor possível. Desse modo, foram escolhidos 3 PCs para todas as classes. Pelo SIMCA, as amostras de todas as classes foram classificadas corretamente, tanto no grupo de teste quanto de treinamento, com duas exceções. Similarmente ao kNN e a PCA, a amostra A14 foi considerada como brasileira, enquanto que a amostra U04 foi considerada como sendo pertencente à classe das paraguaias.

Para a PLS-DA foram utilizadas seis variáveis latentes e também foi utilizado o método *leave one out* para a validação cruzada. Os resultados da classificação por este algoritmo são apresentados nas Figuras 27, 28, 29 e 30. Nessas figuras, a linha horizontal vermelha marca o limite em que uma amostra é considerada daquela classe, a linha vertical preta separa as amostras do grupo de treinamento daquelas do grupo de teste. A classificação pela PLS-DA foi pior em relação ao SIMCA e ao kNN, para este conjunto de dados. Para as amostras argentinas, conforme a Figura 27, duas amostras pertencentes à classe foram classificadas como não pertencentes, a amostra A13, pertencente ao grupo de treinamento, e a A14 do grupo de teste. Em relação à especificidade, as amostras B15 e U01 foram consideradas como sendo argentinas. Quanto às amostras brasileiras, todas elas foram classificadas corretamente, porém a amostra A14 também foi considerada como brasileira. Já para a classificação das amostras de erva mate do Uruguai, o modelo apresentou 100 % de sensibilidade, no entanto, quanto ao parâmetro de especificidade, duas amostras paraguaias foram especificadas como uruguaias. Por fim, as amostras paraguaias foram corretamente especificadas e selecionadas.

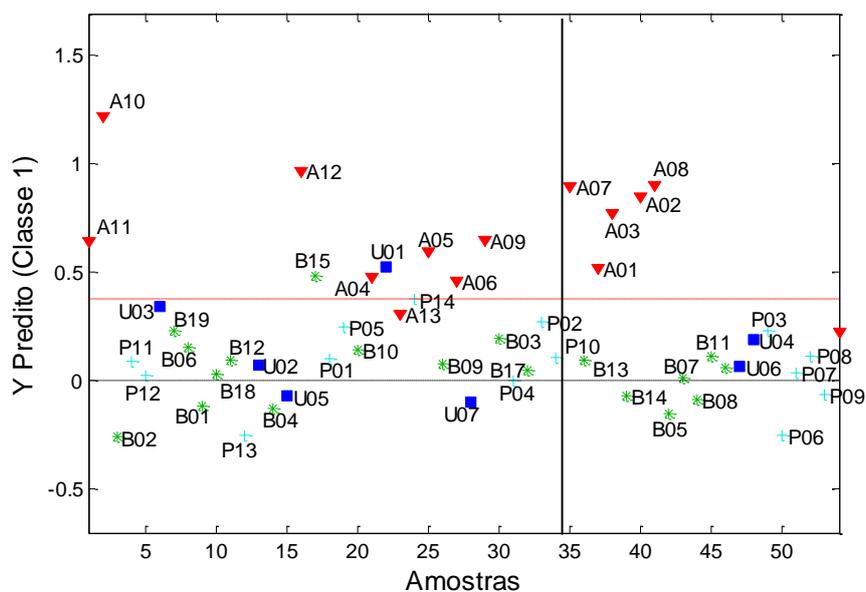


Figura 26. Classificação das amostras de erva mate por PLS-DA de acordo com o grupo de treinamento para a Argentina, através das concentrações dos elementos obtidos mediante ICP OES. Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

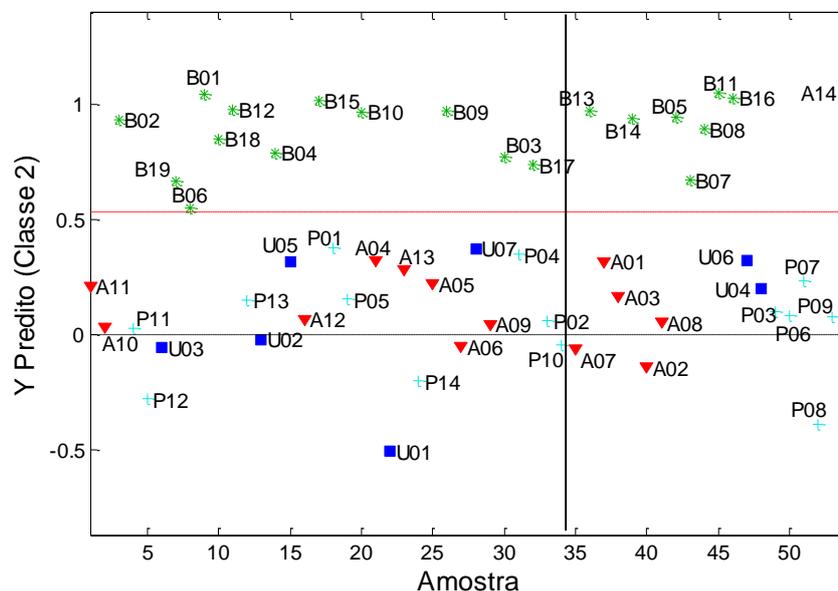


Figura 27. Classificação das amostras de erva mate por PLS-DA de acordo com o grupo de treinamento para o Brasil, através das concentrações dos elementos obtidos mediante ICP OES. Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

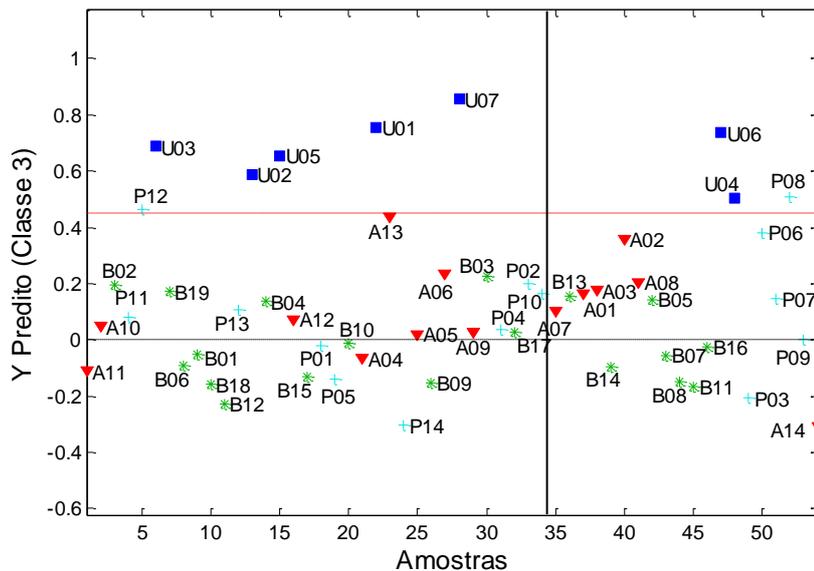


Figura 28. Classificação das amostras de erva mate por PLS-DA de acordo com o grupo de treinamento para o Uruguai, através das concentrações dos elementos obtidos mediante ICP OES. Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

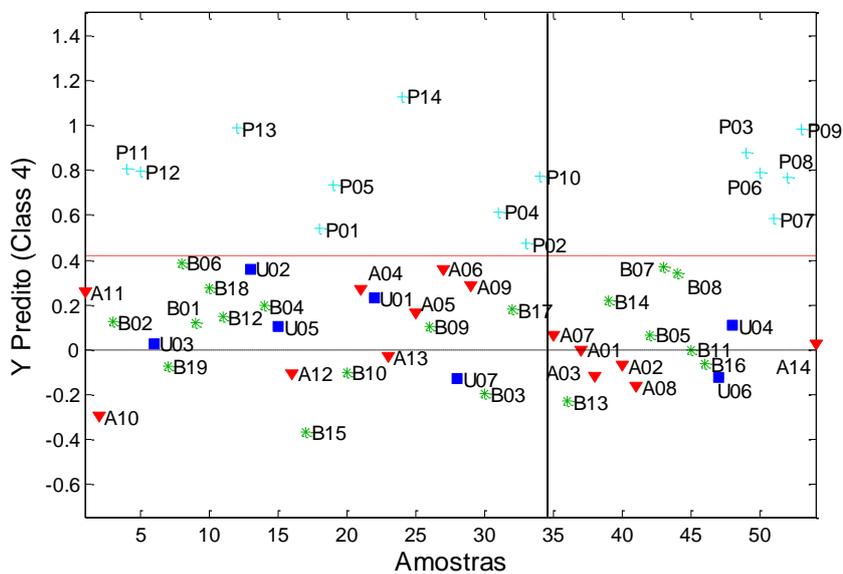


Figura 29. Classificação das amostras de erva mate por PLS-DA de acordo com o grupo de treinamento para o Paraguai, através das concentrações dos elementos obtidos mediante ICP OES. Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

O algoritmo SVM-DA foi o que melhor classificou as amostras de erva mate, de acordo com as concentrações dos elementos do grupo G1, devido a sua capacidade de otimização. A amostra A14 foi a única que não foi classificada corretamente, sendo considerada brasileira. Para todas as demais, a classificação foi correta.

O segundo grupo de dados estudado foram os elementos determinados por ICP-MS (G2) e para tal foram utilizados apenas métodos de análise supervisionada. Para G2, o grupo de treinamento foi composto por 36 amostras enquanto que o grupo teste foi composto pelas outras 18 amostras definidas pelo algoritmo de Kennard-Stone.

Para o kNN, foi utilizado  $k = 3$ . Por este método, todas as amostras argentinas foram classificadas corretamente. Dentre as amostras brasileiras, a B18 foi predita como sendo argentina. Das amostras uruguaias, a U06 foi considerada com sendo brasileira, e, por fim, das amostras paraguaias, a P10 foi predita como argentina. Todas as demais amostras foram classificadas corretamente.

Pelo método SIMCA, o modelo de classificação não foi eficiente. Para as amostras argentinas e uruguaias foram utilizados 2 PCs e para as brasileiras e paraguaias, 4 PCs. Desse modo, para a erva mate de origem argentina, todas as amostras foram classificadas corretamente. Porém, para a erva mate de procedência brasileira, as amostras B02, B07, B08 e B18 foram preditas como sendo de origem argentina e a amostra B13 como sendo de origem paraguaia. Para as amostras uruguaias, as duas amostras do grupo teste foram consideradas como estrangeiras, a U06 como argentina e a U02 como paraguaia. Por fim, para as amostras de origem paraguaia, as amostras P05 e P03 foram preditas como argentinas.

Para a PLS-DA foram utilizados 6 LVs para criação dos modelos de classificação. Em relação às amostras argentinas, todas as do grupo teste foram classificadas corretamente, porém as amostras A12 e A03 do grupo de treinamento não foram preditas como sendo argentinas. Em relação as amostras estrangeiras, às amostras de erva mate U03, P01, P03, P05, P14, B18 foram preditas como também sendo argentinas. Logo, o modelo não se mostrou eficiente na classificação das amostras argentinas. Para a erva mate de origem brasileira, apenas a B19, pertencente ao grupo de treinamento, não foi predita como brasileira. As amostras P07, P11 e A12 também foram classificadas como de origem brasileira. As amostras

uruguayas foram todas classificadas corretamente, porém as amostras B14 e A03 também foram preditas como sendo uruguayas. Por fim, as amostras paraguayas foram todas classificadas corretamente, todavia a amostra B13 também foi considerada como sendo de origem paraguaia.

A SVM-DA foi o algoritmo que melhor classificou as amostras conforme os elementos do grupo G2. Por este método, todas as amostras argentinas, brasileiras e paraguayas foram classificadas corretamente. As amostras de erva mate de procedência paraguaia do grupo de treinamento também foram preditas de forma correta, porém as amostras do grupo de teste, U02 e U06, foram consideradas como paraguaia e brasileira, respectivamente.

Por fim, foi avaliado o grupo G3, em que os dados referentes aos elementos determinados mediante as duas técnicas espectrométricas foram incluídos. A utilização de todos os elementos como variáveis se mostrou como sendo a melhor para a classificação da erva mate.

Para aplicação do método kNN foi utilizado  $k = 3$ . Por este método, todas as amostras argentinas, brasileiras e paraguayas foram classificadas corretamente. Das amostras de erva mate uruguayas, apenas U06 não foi classificada corretamente, sendo considerada de procedência argentina.

Para o SIMCA, para o modelo de classificação foram utilizadas 2 PCs para as amostras uruguayas, e 3 PCs para aquela dos demais países. Desse modo, as amostras de erva mate de origem argentina, brasileira e uraguaia foram classificadas corretamente. Entre as amostras de origem paraguaia, apenas a P13 foi não foi classificada corretamente, sendo considerada de procedência brasileira.

Os resultados da classificação pela PLS-DA são apresentados nas Figuras 31, 32, 33 e 34. Nessas figuras, a linha horizontal vermelha marca o limite em que uma amostra é considerada daquela classe, a linha vertical preta separa as amostras do grupo de treinamento daquelas do grupo de teste. Foram utilizadas seis variáveis latentes. Em relação às amostras argentinas, todas elas foram classificadas corretamente. Porém, as amostras de erva mate B15, B18 e U03 foram preditas como também sendo argentinas. Quanto às amostras brasileiras e paraguayas, todas foram classificadas corretamente. Por fim, as amostras de

procedência uruguaia também foram preditas corretamente, porém uma amostra paraguaia, a P12, também foi predita como sendo desta origem.

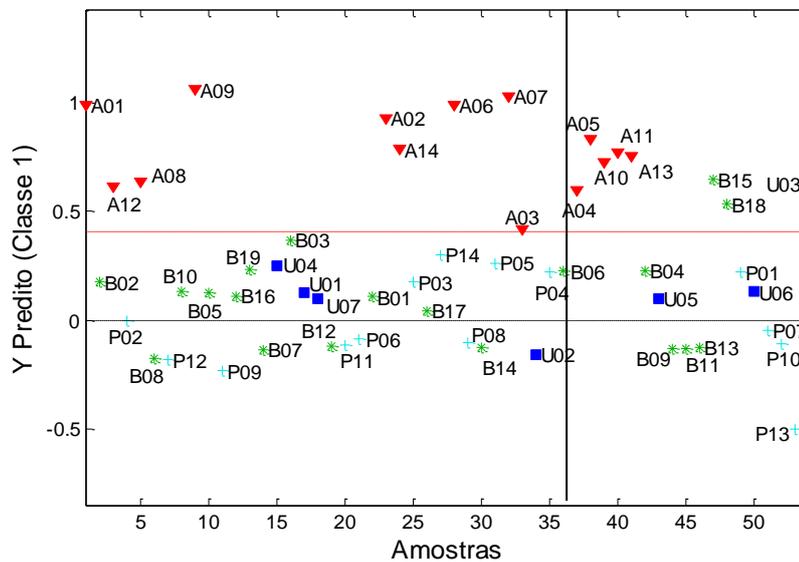


Figura 30. Classificação das amostras de erva mate por PLS-DA de acordo com o grupo de treinamento para o Argentina, através das concentrações de todos os elementos determinados (exceto Li e Be). Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

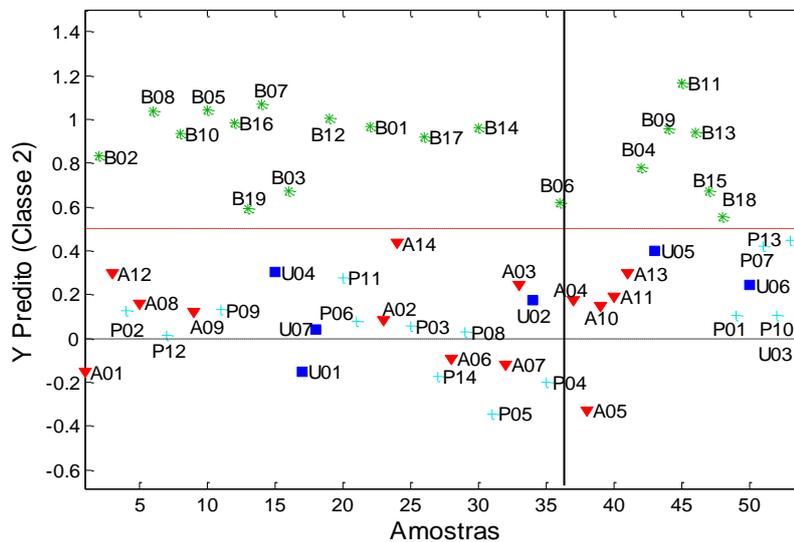


Figura 31. Classificação das amostras de erva mate por PLS-DA de acordo com o grupo de treinamento para o Brasil, através das concentrações dos todos os elementos determinados (exceto Li e Be). Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

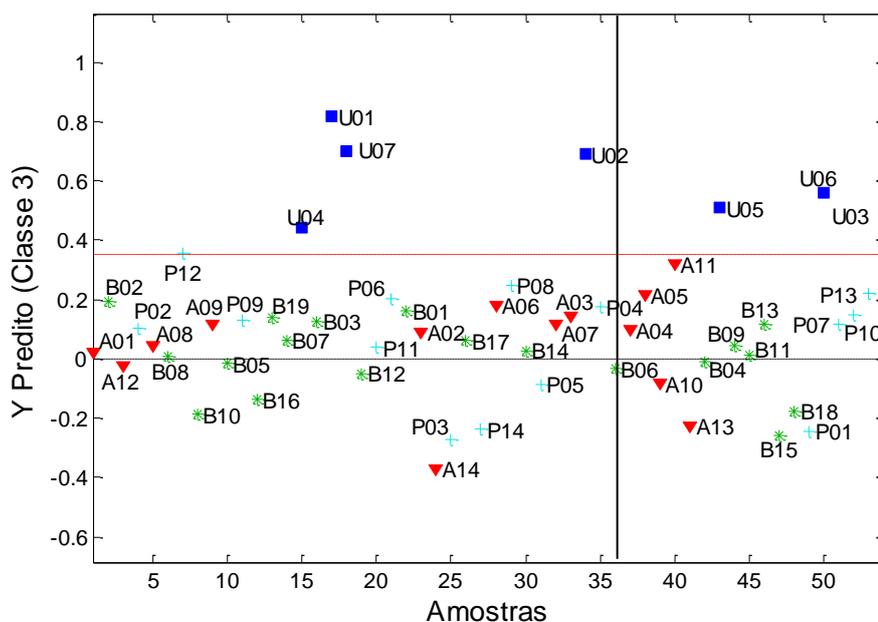


Figura 32. Classificação das amostras de erva mate por PLS-DA de acordo com o grupo de treinamento para o Uruguai, através das concentrações dos todos os elementos determinados (exceto Li e Be). Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

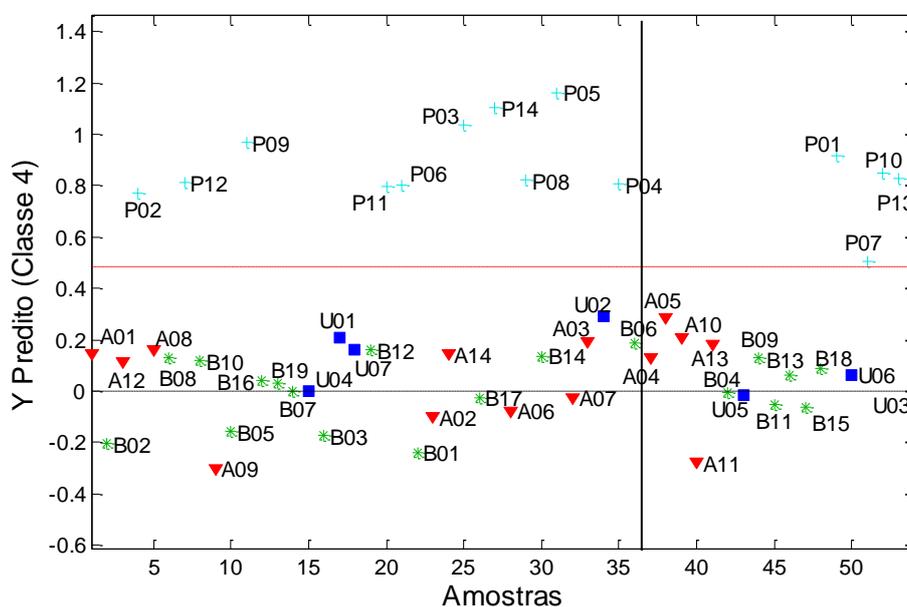


Figura 33. Classificação das amostras de erva mate por PLS-DA de acordo com o grupo de treinamento para o Paraguai, através das concentrações dos todos os elementos determinados (exceto Li e Be). Para a escolha dos grupos de treinamento e teste foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone. Os dados foram auto escalados. A = Argentina, B = Brasil, P = Paraguai e U = Uruguai.

A SVM-DA foi o algoritmo que melhor classificou as amostras de erva mate e os melhores resultados para o grupo G3 foram assim obtidos. Por este método, todas as amostras foram classificadas corretamente.

A classificação da erva mate por país de origem mediante a concentração dos elementos pode ser entendida, tendo-se em vista que os processos de produção, as diferentes formas de cultivo e as condições ambientais podem alterar as concentrações dos elementos na erva mate.

Os macronutrientes, K, Ca, Mg e P e micronutrientes, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn, estão comumente presentes em baixas concentrações nos solos e a disponibilidade dos mesmos depende de fatores como precipitação pluviométrica, temperatura, vento, tipo de solo e pH do solo. Os baixos teores destes elementos assim como pH inadequados para o cultivo induzem a adição de fertilizantes e corretivos de acidez.<sup>110,111</sup> As concentrações de elementos tais como Al, Se e Co, considerados benéficos as plantas, também são fortemente dependentes do tipo de solo, sendo que a concentração de Se e Co são muito baixas no solo e na água.<sup>106</sup>

Os elementos traço presentes nas plantas podem ser derivados da contaminação do ar e/ou do solo. Elementos como Pb, Cd e Cr podem ser acumulados nas folhas devido à contaminação do ar, quando as plantações estão próximas a estradas movimentadas ou indústrias.<sup>112</sup> O Cd também tem a característica de substituir o Zn em reações enzimáticas nas plantas quando há deficiência deste elemento. Já o As pode mimetizar o comportamento do P e do S, ambos essenciais à planta. Tanto o Cd quanto o As são tóxicos para a maioria das plantas, e a acumulação destes dois elementos nas mesmas também pode ser atribuída a utilização de herbicidas, pesticidas e fungicidas.<sup>113</sup>

Outros fatores que alteram a composição mineral das plantas são a idade e a forma como pestes, pragas e ervas daninhas são combatidas. A utilização ou não de fertilizantes também modifica a composição inorgânica do solo, devido ao esgotamento do mesmo. A utilização de herbicidas, fungicidas, pesticidas assim como corretivos de acidez do solo e fertilizantes podem levar à contaminação do solo por diversos elementos.<sup>54</sup>

Portanto, pode-se afirmar que a classificação da erva mate de acordo com o país de origem mediante as concentrações dos elementos está também diretamente relacionada com as condições empregadas de cultivo e de processamento da erva

mate. A classificação das amostras mediante o grupo G3 foi a melhor, pois continha mais informações sobre as amostras, ou seja, inclusão de um número maior de elementos auxiliou na classificação da erva mate. Excelentes resultados foram também obtidos quando se considerou apenas os elementos do grupo G1. Excluindo-se uma amostra considerada como *outlier*, a A14, a classificação segundo os elementos do grupo G1 (macro e micronutrientes) pode ser comparada com a obtido por G3. A classificação foi insatisfatória quando se considerou somente os elementos do grupo G2, ou seja, os determinados por ICP-MS. Isto por que muitos destes elementos são de origem antropogênica e a concentração dos mesmos pode variar aleatoriamente na erva mate.

### 4.3 ANÁLISE DE PROCEDÊNCIA E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A classificação obtida através dos espectros de reflexão no NIR foi correta para todas as amostras dos quatro países, segundo todos os algoritmos utilizados, e portanto, em comparação aos outros três grupos de dados (G1, G2 e G3), foi a melhor. Isto pode ser devido ao fato que o espectro no NIR possui mais informações acerca da composição da erva mate, se comparado com as concentrações dos elementos. Além disto, a composição orgânica é menos influenciada por ações antropogênicas. Por exemplo, a alteração do solo por meio de fertilizantes leva a um crescimento da planta e por consequência uma alteração na sua composição. Porém, o fertilizante atua diretamente na concentração de elementos disponíveis para a planta. Também é preciso considerar que os dados obtidos por ICP OES e ICP-MS possuem maior incerteza devido a erros associados nas etapas de preparo da amostra, assim como nas calibrações, volumes dos frascos, entre outros, que estão ausentes na obtenção dos espectros de reflexão no NIR.

Para os grupos G1 e G3, os resultados foram bons a excelentes. Com a exclusão da amostra A14 (*outlier*), as classificações segundo os elementos do grupo G1 (determinados por ICP OES) e segundo o grupo G3 (todos os elementos) foram muito similares. A pior classificação foi para o conjunto de elementos determinados por ICP-MS (grupo G2). Também é preciso considerar que os dados obtidos por ICP OES e ICP-MS possuem maior incerteza devido a erros associados nas etapas de preparo de amostra assim como nas calibrações, volumes dos frascos, entre outros, que estão ausentes na obtenção dos espectros por NIR.

Em relação aos algoritmos supervisionados, a SVM-DA foi o algoritmo que melhor classificou as amostras de erva mate. Isto é devido ao fato que o próprio algoritmo busca uma otimização do processo de classificação e, através disto, um melhor ajuste aos dados, fornecendo assim o melhor modelo. Os algoritmos PLS-DA, SIMCA e o kNN promoveram resultados satisfatórios e similares quanto à classificação da erva mate por país de origem.

Tabela 13. Sensibilidade da análise de procedência da erva mate mediante a reflexão no NIR.

Origem	n <sub>Total</sub>	n <sub>Treinamento</sub>	n <sub>Teste</sub>	PLS-DA <sup>a</sup>		SVM-DA		SIMCA <sup>b</sup>		kNN <sup>c</sup>
				Treinamento (%)	Teste (%)	Treinamento (%)	Teste (%)	Treinamento (%)	Teste (%)	Teste (%)
Argentina	14	8	6	100	100	100	100	100	100	100
Brasil	19	14	5	100	100	100	100	100	100	100
Paraguai	14	8	6	100	100	100	100	100	100	100
Uruguai	7	5	2	100	100	100	100	100	100	100

n é o número de amostras analisadas. <sup>a</sup> realizado com 5 VL. <sup>b</sup> realizado com: 2 PCs para Argentina e Uruguai, 3 PCs para Brasil e Paraguai. <sup>c</sup> realizado com k = 3.

Tabela 14. Especificidade da análise de procedência da erva mate mediante reflexão no NIR.

Estrangeiras classificadas como estrangeiras (%)						
Origem	n <sub>Total</sub>	PLS-DA	SVM-DA	SIMCA	kNN <sup>c</sup>	
Argentina	14	100	100	100	100	
Brasil	19	100	100	100	100	
Paraguai	14	100	100	100	100	
Uruguai	7	100	100	100	100	

Tabela 15. Sensibilidade da análise de procedencia da erva mate mediante a técnica de ICP OES para os elementos do grupo G1.

Origem	n <sub>Total</sub>	n <sub>Treinamento</sub>	n <sub>Teste</sub>	PLS-DA <sup>a</sup>		SVM-DA		SIMCA <sup>b</sup>		kNN <sup>c</sup>
				Treinamento (%)	Teste (%)	Treinamento (%)	Teste (%)	Treinamento (%)	Teste (%)	Teste (%)
Argentina	14	8	6	88	83	100	83	100	83	83
Brasil	19	12	7	100	100	100	100	100	100	100
Paraguai	14	9	5	100	100	100	100	100	100	100
Uruguai	7	5	2	100	100	100	100	100	50	50

n é o número de amostras utilizadas. <sup>a</sup> realizado com 6 VL. <sup>b</sup> realizado com: 3 PCs para Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai.

<sup>c</sup> kNN realizado com k = 3.

Tabela 16. Especificidade da análise de procedencia da erva mate mediante a técnica de ICP OES para os elementos do grupo G1.

Origem	n <sub>Total</sub>	Estrangeiras classificadas como estrangeiras (%)			
		PLS-DA	SVM-DA	SIMCA	kNN <sup>c</sup>
Argentina	14	92	100	100	97
Brasil	19	97	97	97	97
Paraguai	14	100	100	97	100
Uruguai	7	96	100	100	100

Tabela 17. Sensibilidade da análise de procedencia da erva mate mediante a técnica de ICP-MS para os elementos do grupo G2.

Origem				PLS-DA <sup>a</sup>		SVM-DA		SIMCA <sup>b</sup>		kNN <sup>c</sup>
	n <sub>Total</sub>	n <sub>Treinamento</sub>	n <sub>Teste</sub>	Treinamento (%)	Teste (%)	Treinamento (%)	Teste (%)	Treinamento (%)	Teste (%)	Teste (%)
Argentina	14	7	7	72	100	100	100	100	100	100
Brasil	19	12	7	92	100	100	72	100	17	83
Paraguai	14	8	6	100	100	100	100	100	66	75
Uruguai	7	5	2	100	100	100	100	100	0	50

n é o número de amostras utilizadas. <sup>a</sup> realizado com 6 VL. <sup>b</sup> realizado com: 2 PCs para Argentina e Uruguaias, 3 PCs para Brasil e Paraguai. <sup>c</sup> realizado com k = 3.

Tabela 18. Especificidade da análise de procedencia da erva mate mediante a técnica de ICP-MS, para os elementos do grupo G2.

Estrangeiras classificadas como estrangeiras (%)						
Origem	n <sub>Total</sub>	PLS-DA	SVM-DA	SIMCA	kNN <sup>c</sup>	
Argentina	14	85	97	80	95	
Brasil	19	91	100	100	97	
Paraguai	14	97	100	95	100	
Uruguai	7	96	98	100	100	

Tabela 19. Sensibilidade da análise de procedencia da erva mate mediante as técnicas de ICP OES e ICP-MS, para os elementos do grupo G3.

Origem	n <sub>Total</sub>	n <sub>Treinamento</sub>	n <sub>Teste</sub>	PLS-DA <sup>a</sup>		SVM-DA		SIMCA <sup>c</sup>		kNN <sup>d</sup>
				Treinamento (%)	Teste (%)	Treinamento (%)	Teste (%)	Treinamento (%)	Teste (%)	Teste (%)
Argentina	14	9	5	100	100	100	100	100	100	100
Brasil	19	12	7	100	100	100	100	100	100	100
Paraguai	14	10	4	100	100	100	100	100	75	100
Uruguai	7	4	3	100	100	100	100	100	100	100

n é o número de amostras utilizadas. <sup>a</sup> realizado com 6 VL. <sup>b</sup> realizado com: 3 PCs para Argentina, Brasil e Paraguai e 2 PCs para Uruguai. <sup>c</sup> realizado com k = 3.

Tabela 20. Especificidade da análise de procedencia da erva mate mediante as técnicas de ICP OES e ICP-MS, para os elementos do grupo G3.

Estrangeiras classificadas como estrangeiras (%)						
Origem	n <sub>Total</sub>	PLS-DA <sup>a</sup>	SVM-DA	SIMCA <sup>b</sup>	kNN <sup>c</sup>	
Argentina	14	92	100	100	100	
Brasil	19	100	100	97	100	
Paraguai	14	100	100	100	100	
Uruguai	7	98	100	100	100	

## 5. CONCLUSÕES

Foi desenvolvida uma metodologia de análise de erva mate para determinação de 31 elementos por ICP OES, ICP-MS e obtenção dos espectros de reflexão na região do NIR. Os dados obtidos foram avaliados, pré-processados e analisados multivariadamente para identificar o país de origem da erva mate, com sucesso.

O teste de Grubbs e a dispersão de Whisker-Box evidenciaram que as amostras analisadas apresentam uma grande variabilidade quanto às concentrações dos elementos medidos, demonstrada pelos desvios padrão e amplitudes das concentrações. Pela a ANOVA foi possível diferenciar as médias das concentrações de todos os elementos presentes nas amostras analisadas, de acordo com o país de origem, com exceção de Ti, Ni, As, Mo, Cd e U.

Mediante a espectroscopia no NIR, foi possível identificar a erva mate por local de origem mediante a HCA e a PCA. A classificação destas amostras mediante métodos supervisionados também foi eficiente, tendo em vista que para os quatro algoritmos estudados, kNN, SIMCA, PLS-DA e SVM-DA, todas as amostras foram corretamente classificadas e os parâmetros de mérito tais como especificidade e seletividade foram 100 %.

Para as concentrações dos elementos determinados por ICP OES, foi possível identificar as amostras por país de origem mediante a PCA. A classificação das amostras através dos métodos supervisionados se mostrou eficiente. A especificidade e a seletividade foram quase em sua totalidade 100 %. Conclui-se que é possível classificar a erva mate mediante as concentrações de Al, Ca, K, Mg, Zn, Ba, P, Cu, Mn, Li e Be.

A classificação obtida mediante o conjunto de dados obtido somente por ICP-MS foi pior. Todavia, a classificação pelos métodos supervisionados estudados foi satisfatória.

Por fim, para o conjunto de dados determinados por ambas as técnicas, ICP OES e ICP-MS, a classificação foi muito boa, e os parâmetros de mérito, em quase sua totalidade, foram 100% para quase todos os algoritmos estudados.

Entre os métodos de análise multivariada supervisionada estudados, o SVM-DA teve o melhor desempenho na classificação da erva mate por país de origem. Os métodos kNN, SIMCA e PLS-DA tiveram desempenhos similares na classificação.

Portanto, foi possível diferenciar e classificar a erva mate por país de origem e esta diferenciação é resultante dos diferentes processos de produção e formas de cultivo da erva mate posteriormente comercializada.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Heck, C. I.; De Mejia, E. G., *J. Food Sci.* 2007, 72 (9), R138-R151.
2. Vieira, M. A.; Rovaris, A. A.; Maraschin, M.; De Simas, K. N.; Pagliosa, C. M.; Podestá, R.; Amboni, R. D. M. C.; Barreto, P. L. M.; Amante, J. *Agri. Food Chem.* 2008, 56 (12), 4637-4642.
3. Luykx, D.; Van Ruth, S. M., *Food Chem.* 2008, 107 (2), 897-911.
4. Karoui, R.; De Baerdemaeker, J., *Food Chem.* 2007, 102 (3), 621-640.
5. Lin, H.; Zhao, J. W.; Sun, L.; Chen, Q. S.; Zhou, F., *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2011, 12 (2), 182-186.
6. Luypaert, J.; Massart, D. L.; Heyden, Y. V., *Talanta* 2007, 72 (3), 865-883.
7. Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S.; Pezuela, C., *Analyst* 1998, 123 (8), 135R-150R.
8. Balabin, R. M.; Safieva, R. Z., *Anal. Chim. Acta* 2011, 689 (2), 190-197.
9. Karoui, R.; Mazerolles, G.; Dufour, E., *Int. Dairy J.* 2003, 13 (8), 607-620.
10. Bracesco, N.; Sanchez, A. G.; Contreras, V.; Menini, T.; Gugliucci, A., *J. Ethnopharmacol.* 2011, 136 (3), 378-384.
11. Vazquez, A.; Moyna, P., *J. Ethnopharmacol.* 1986, 18 (3), 267-272.
12. Schmalko, M. E.; Alzamora, S. M., *Dry. Technol.* 2001, 19 (3-4), 599-610.
13. Pires, V. S.; Guillaume, D.; Gosmann, G.; Schenkel, E. P., *J. Agri. Food Chem.* 1997, 45 (4), 1027-1031.
14. Andersen, T.; Fogh, J., *J. Hum. Nutr. Diet.* 2001, 14 (3), 243-250.
15. Schinella, G.; Fantinelli, J. C.; Mosca, S. M., *Clin. Nutr.* 2005, 24 (3), 360-366.
16. Filip, R.; Lotito, S. B.; Ferraro, G.; Fraga, C. G., *Nutr. Res.* 2000, 20 (10), 1437-1446.
17. Gorzalczany, S.; Filip, R.; Alonso, M. A. D. R.; Miño, J.; Ferraro, G. E.; Acevedo, C., *J. Ethnopharmacol.* 2001, 75 (2-3), 291-294.
18. Loria, D.; Barrios, E.; Zanetti, R., *Rev. Panam. Salud Publica* 2009, 25 (6), 530-539.

19. Dartora, N.; Souza, L. M.; Santana, A. P.; Iacomini, M.; Valduga, A. T.; Gorin, P. A. J.; Sasaki, G. L., *Food Chem.* 2011, 129 (4), 1453-1461.
20. Reginatto, F. H.; Athayde, M. L.; Gosmann, G.; Schenkel, E. P., *J. Braz. Chem. Soc.* 1999, 10 (6), 443-446.
- 98
21. Taketa, A. T. C.; Breitmaier, E.; Schenkel, E. P., *J. Braz. Chem. Soc.* 2004, 15 (2), 205-211.
22. Bastos, D. H. M.; Fornari, A. C.; Queiroz, Y. S.; Torres, E., *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2006, 49 (3), 399-404.
23. Filip, R.; Lopez, P.; Giberti, G.; Coussio, J.; Ferraro, G., *Fitoterapia* 2001, 72 (7), 774-778.
24. Gnoatto, S. C. B.; Schenkel, E. P.; Bassani, V. L., *J. Braz. Chem. Soc.* 2005, 16 (4), 723-726.
25. Tenorio Sanz, M. D.; Torija Isasa, M. E., *Arch. Latinoam. Nutr.* 1991, 41 (3), 441-454.
26. Garcia, R. V.; Basualdo, I.; Peralta, I.; Herebia, M.; Caballero, S., *Arch. Latinoam. Nutr.* 1997, 47 (1), 77-80.
27. Carducci, C. N.; Dabas, P. C.; Muse, J. O., *J. AOAC Int.* 2000, 83 (5), 1167-1173.
28. Costa, A. M. G.; Nogami, E. M.; Visentainer, J. V.; Souza, N. E.; Garcia, E. E., *J. Agri. Food Chem.* 2009, 57 (1), 196-200.
29. Braganca, V. L. C.; Melnikov, P.; Zanoni, L. Z., *Biol. Trace Elem. Res.* 2011, 144 (1-3), 1197-1204.
30. Giulian, R.; Santos, C. E. I.; Shubeita, S. D.; Silva, L. M.; Yoneama, M. L.; Dias, J. F., *Food Sci. Technol.* 2009, 42 (1), 74-80.
31. Giulian, R.; Iochims dos Santos, C. E.; Moraes Shubeita, S.; Silva, L. M.; Dias, J. F.; Yoneama, M. L., *J. Agri. Food Chem.* 2007, 55 (3), 741-746.
32. Marchisio, P. F.; Sales, A.; Cerutti, S.; Marchevski, E.; Martinez, L. D., *J. Hazard. Mater.* 2005, 124 (1-3), 113-118.
33. Wrobel, K.; Urbina, E. M. C., *Biol. Trace Elem. Res.* 2000, 78 (1-3), 271-280.
34. Malik, J.; Szakova, J.; Drabek, O.; Balik, J.; Kokoska, L., *Food Chem.* 2008, 111 (2), 520-525.

35. Drivelos, S. A.; Georgiou, C. A., Trends Anal. Chem. 2012, 40, 38-51.
36. Cordella, C.; Moussa, I.; Martel, A. C.; Sbirrazzuoli, N.; Lizzani-Cuvelier, L., J. of Agri. Food Chem. 2002, 50 (7), 1751-1764.
37. Kelly, S.; Heaton, K.; Hoogewerff, J., Trends Food Sci. Technol. 2005, 16 (12), 555-567.
- 99
38. Profeta, A.; Balling, R.; Roosen, J., Food. Qual. Prefer. 2012, 26 (1), 1-11.
39. Manrai, L. A.; Lascu, D.-N.; Manrai, A. K., Inter. Bus. Ver. 1998, 7 (6), 591-615.
40. Bonnet, C.; Simioni, M., Euro. Rev. of Agri. Eco. 2001, 28 (4), 433-449.
41. Liefeld, J. P., J. Com. Beha. 2004, 4 (2), 85-87.
42. Pillonel, L.; Ampuero, S.; Tabacchi, R.; Bosset, J. O., Eur. Food Res. Technol. 2003, 216 (2), 179-183.
43. Muñoz-Valencia, R.; Jurado, J.; Ceballos-Magaña, S.; Alcázar, A.; Reyes, J., Food Anal. Meth. 2012, 1-7.
44. Boschetti, W.; Rampazzo, R. T.; Dessuy, M. B.; Vale, M. G. R.; de Oliveira Rios, A.; Hertz, P.; Manfroi, V.; Celso, P. G.; Ferrão, M. F., Talanta 2013, 111, 147-155.
45. Gonzalez, A.; Llorens, A.; Cervera, M. L.; Armenta, S.; Guardia, M., Food Chem. 2009, 112 (1), 26-34.
46. Capron, X.; Smeyers-Verbeke, J.; Massart, D. L., Food Chem. 2007, 101 (4), 1585-1597.
47. Brescia, M. A.; Monfreda, M.; Buccolieri, A.; Carrino, C., Food Chem. 2005, 89 (1), 139-147.
48. Sola-Larranaga, C.; Navarro-Blasco, I., Food Chem. 2009, 112 (1), 189-196.
49. Ceballos-Magana, S. G.; Jurado, J. M.; Muniz-Valencia, R.; Alcazar, A.; de Pablos, F.; Martin, M. J., Food Anal. Meth. 2012, 5 (2), 260-265.
50. Sampaio, O. M.; Reche, R. V.; Franco, D. W., J. Agri. Food Chem. 2008, 56 (5), 1661-1668.
51. Cardoso, D. R.; Andrade-Sobrinho, L. G.; Leite-Neto, A. F.; Reche, R. V.; Isique, W. D.; Ferreira, M. M. C.; Lima-Neto, B. S.; Franco, D. W., J. Agri. Food Chem. 2004, 52 (11), 3429-3433.

52. Bong, Y. S.; Shin, W. J.; Gautam, M. K.; Jeong, Y. J.; Lee, A. R.; Jang, C. S.; Lim, Y. P.; Chung, G. S.; Lee, K. S., *Food Chem.* 2012, 135 (4), 2666-2674.
53. Benabdelkamel, H.; Di Donna, L.; Mazzotti, F.; Naccarato, A.; Sindona, G.; Tagarelli, A.; Taverna, D., *J. Agri. Food Chem.* 2012, 60 (14), 3717-3726.
54. Laursen, K. H.; Schjoerring, J. K.; Olesen, J. E.; Askegaard, M.; Halekoh, U.; Husted, S., *J. Agri. Food Chem.* 2011, 59 (9), 4385-4396.
- 100
55. Gonzalez, A.; Armenta, S.; Guardia, M., *Food Chem.* 2011, 126 (3), 1254-1260.
56. Moreda-Pineiro, A.; Fisher, A.; Hill, S. J., *J. Food Compos. Anal.* 2003, 16 (2), 195-211.
57. Alda-Garcilope, C.; Gallego-Pico, A.; Bravo-Yague, J. C.; Garcinuno-Martinez, R. M.; Fernandez-Hernando, P., *Food Chem.* 2012, 135 (3), 1785-1788.
58. Bevilacqua, M.; Bucci, R.; Magri, A. D.; Magri, A. L.; Marini, F., *Anal. Chim. Acta* 2012, 717, 39-51.
59. Vitale, R.; Bevilacqua, M.; Bucci, R.; Magri, A. D.; Magri, A. L.; Marini, F., *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* 2013, 121, 90-99.
60. Gori, A.; Maggio, R. M.; Cerretani, L.; Nocetti, M.; Caboni, M. F., *Int. Dairy J.* 2012, 23 (2), 115-120.
61. Garcia-Gonzalez, D. L.; Tena, N.; Aparicio, R., *Grasas Aceites* 2012, 63 (1), 26-34.
62. Galtier, O.; Dupuy, N.; Le Dreau, Y.; Ollivier, D.; Pinatec, C.; Kister, J.; Artaud, J., *Anal. Chim. Acta* 2007, 595 (1-2), 136-144.
63. Tao, S.; Li, J.; Li, J.; Tang, J.; Mi, J.; Zhao, L., *Comp. and Comp. Technol. Agri.* V, Li, D.; Chen, Y., Eds. Springer Heidelberg: 2012; Vol. 369, pp 478-483.
64. Ruoff, K.; Luginbuhl, W.; Kunzli, R.; Iglesias, M. T.; Bogdanov, S.; Bosset, J. O.; von der Ohe, K.; von der Ohe, W.; Amado, R., *J. Agri. Food Chem.* 2006, 54 (18), 6873-6880.
65. Papotti, G.; Bertelli, D.; Graziosi, R.; Sivistri, M.; Bertacchini, L.; Durante, C.; Plessi, M., *J. Agri. Food Chem.* 2013, 61 (8), 1741-1746.
66. Del Castillo, M. L. R.; Caja, M. M.; Blanch, G. P.; Herraiz, M., *J. Food Prot.* 2003, 66 (8), 1448-1454.

67. Perez, A. L.; Smith, B. W.; Anderson, K. A., *J. Agri. Food Chem.* 2006, 54 (13), 4506-4516.
68. Jones, B. T.; Hou, X., *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*. John Wiley, Chichester, 2000.
69. Pelletier, J.; Moisan, M., *Physics of Collisional Plasmas*. Springer, Nova Iorque 2006.
70. Dean, J. R., *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy*. John Wiley, West Sussex, 2005.
71. Hill, S. J., *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*. Blackwell Publishing, Oxford, 2007.
72. Putzig, C. L.; Leugers, M. A.; McKelvy, M. L.; Mitchell, G. E.; Nyquist, R. A.; Papenfuss, R. R.; Yurga, L., *Anal. Chem.* 1994, 66 (12), R26-R66.
73. Gonzalez, A.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; Armenta, S., *Anal. Methods* 2011, 3 (1), 43-52.
74. Moros, J.; Garrigues, S.; Guardia, M. d. I., *Trends in Anal. Chem.* 2010, 29 (7), 578-591.
75. Stuart, B.; George, B.; McIntyre, P., *Modern Infrared Spectroscopy*. West Sussex, England, 1996.
76. Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*. Viçosa, Minas Gerais, 2007.
77. Ward, J. H., *J. Am. Stat. Assoc.* 1963, 58 (301), 236-244.
78. Morgano, M.; Queiroz, S. N.; Ferreira, M., *Braz. J. Food Technol.* 1999, 2 (1-2), 73-79.
79. Brereton, R. G., *Chemometrics*. John Wiley & Sons West Sussex, Inglaterra, 2003.
80. Lattin, J.; Carrol, J. D.; Green, P. E., *Análise Multivariada de Dados*. Cengage Learning: São Paulo, 2011.
81. Fernandes, A. P.; Santos, M. C.; Lemos, S. G.; Ferreira, M. M. C.; Nogueira, A. R. A.; Nobrega, J. A *Spectrochim. Acta B* 2005, 60 (5), 717-724.
82. Aguilar, E. G.; Cantarelli, M. A.; Marchevsky, E. J.; Escudero, N. L.; Camina, J. M., *J. Agri. Food Chem.* 2011, 59 (17), 9059-9064.

83. Pearson, K., *Philoso. Magazi.* 1901, 2 (6), 559-572.
84. Hotelling, H., *J. Edu. Psych.* 1933, 24 (6), 417-441.
85. Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P., *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* 1987, 2 (1-3), 37-52.
86. Andre, M., *Anal. Chem.* 2003, 75 (14), 3460-3467.
87. Arumugam, R.; Kannan, R. R. R.; Jayalakshmi, J.; Manivannan, K.; Devi, G. K.; Anantharaman, P., *Food Chem.* 2012, 135 (4), 2372-2377.
88. Kolasani, A.; Xu, H.; Millikan, M., *Food Chem.* 2011, 127 (4), 1465-1471.
- 102
89. Ni, L.-J.; Zhang, L.-G.; Xie, J.; Luo, J.-Q., *Anal. Chim. Acta* 2009, 633 (1), 43-50.
90. Monfreda, M.; Gobbi, L.; Grippa, A., *Food Chem.* 2012, 134 (4), 2283-2290.
91. Barker, M.; Rayens, W., *J. Chemometrics* 2003, 17 (3), 166-173.
92. Ottavian, M.; Facco, P.; Barolo, M.; Berzaghi, P.; Segato, S.; Novelli, E.; Balzan, S., *J. Food Eng.* 2012, 113 (2), 289-298.
93. Luna, A. S.; da Silva, A. P.; Ferré, J.; Boqué, R., *Spectrochim. Acta A*: 2013, 100 (0), 109-114.
94. Luna, A. S.; da Silva, A. P.; Pinho, J. S. A.; Ferré, J.; Boqué, R., *Spectro Acta A* 2013, 100, 115-119.
95. Lorena, A. C.; Carvalho, A. C. P. L. F., *Revista de Informática Teórica e Aplicada* 2007, pp 43-67.
96. Oliveira, G. M. Máquinas de Vetor de Suporte: estudo e análise de parâmetros para otimização de resultado. UFRGS, Centro de Informática, 2010.
97. Cortes, C.; Vapnik, V., *Mach. Learn.* 1995, 20 (3), 273-297.
98. Rinnan, A.; Berg, F.; Engelsen, S. B., *Trends Anal. Chem.* 2009, 28 (10), 1201-1222.
99. Coelho, G. C.; Rachwal, M. F. G.; Dedecek, R. A.; Curcio, G. R.; Nietsche, K.; Schenkel, E. P., *Biochem. System. Ecol.* 2007, 35 (2), 75-80.
100. Esmelindro, A. A.; Girardi, J. D.; Mossi, A.; Jacques, R. A.; Dariva, C., *J. Agri. Food Chem.* 2004, 52 (7), 1990-1995.
101. Kennard, R. W.; Stone, L. A., *Technometrics* 1969, 11 (1), 137-&.

102. Zhao, J. W.; Lin, H.; Chen, Q. S.; Huang, X. Y.; Sun, Z. B.; Zhou, F., *J. Food Eng.* 2010, 98 (4), 408-414.
103. Isolabella, S.; Cogoi, L.; Lopez, P.; Anesini, C.; Ferraro, G.; Filip, R., *Food Chem.* 2010, 122 (3), 695-699.
104. Rakocevic, M.; Martim, S., *Int. J. Biometeorol.* 2011, 55 (2), 161-171.
105. Miller, J. C. M., J. C., *Statistics and Chemometric for Analytical Chemistry.* Pearson Education: England, 2000.
106. Pilon-Smits, E. A. H.; Quinn, C. F.; Tapken, W.; Malagoli, M.; Schiavon, M., *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009, 12 (3), 267-274.
107. Kara, D., *Food Chem.* 2009, 114 (1), 347-354.
108. MERCOSUL, Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. 2011.
109. Grubbs, F. E., *Technometrics* 1969, 11 (1), 1-&.
110. Maathuis, F. J. M., *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009, 12 (3), 250-258.
111. Hansch, R.; Mendel, R. R., *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009, 12 (3), 259-266.
112. Harrison, R. M.; Chirgawi, M. B., *Sci. Total Environ.* 1989, 83 (1-2), 13-34.
113. Verbruggen, N.; Hermans, C.; Schat, H., *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009, 12 (3), 364-372.