

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

*Estratégias quimiométricas para análise de plantas por  
espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser*

**Lidiane Cristina Nunes\***

Tese apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS,  
área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

**Orientador: Dr. Francisco José Krug**

**Co-orientador: Dr. Ronei Jesus Poppi**

**\*Bolsista CAPES**

São Carlos – SP

2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

N972eq

Nunes, Lidiane Cristina.

Estratégias quimiométricas para análise de plantas por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser / Lidiane Cristina Nunes. -- São Carlos : UFSCar, 2011. 149 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

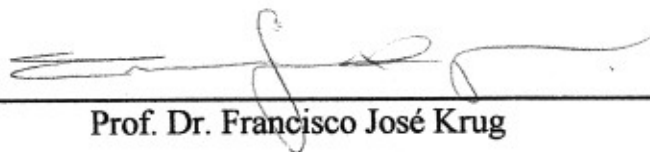
1. Química analítica. 2. Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser. 3. LIBS. 4. Quimiometria. 5. Calibração multivariada. I. Título.

CDD: 543 (20<sup>a</sup>)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Doutorado**

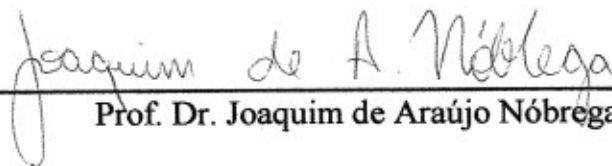
---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata Lidiane Cristina Nunes, realizada em 08 de dezembro de 2010:*



---

Prof. Dr. Francisco José Krug



---

Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega



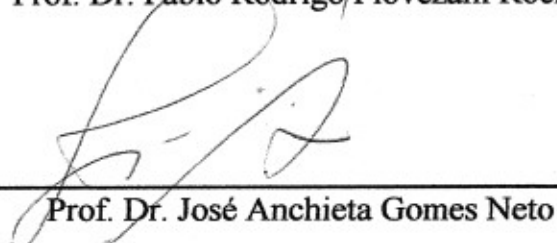
---

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro



---

Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha



---

Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto

Dedico esta Tese de Doutorado aos meus pais, Levi e Dasdores, aos meus queridos irmãos, pelo incentivo e apoio em todos os momentos de minha vida e aos meus sobrinhos por todo amor e carinho.

*Não importa onde você parou... Em que momento da vida você cansou... O que importa é que sempre é possível recomeçar. Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo... É renovar as esperanças na vida e, o mais importante... Acreditar em você de novo!*

*Carlos Drummond de Andrade*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante...

Ao Prof. Dr. Francisco José Krug, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela orientação, incentivo, confiança, convivência, amizade e pelo exemplo profissional.

Ao prof. Dr. Ronei Jesus Poppi, pelas valiosas sugestões e colaborações durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega (DQ/UFSCar), Dr. Renato Lajarim Carneiro (DQ/UFSCar), Dr. Fabio Rodrigo Piovezani (CENA/USP-Piracicaba) e Dr. José Anchieta Gomes Neto (IQAr/UNESP), membros da banca examinadora, por todos os comentários e sugestões.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo, força, confiança e exemplos de vida.

Aos meus queridos irmãos e cunhados, pela união, amor e apoio constante.

Aos meus amados sobrinhos, por todo carinho, amor e sorrisos.

Aos amigos Dário Santos Júnior, Jez Willian Braga e Lilian Trevizan, pelas discussões e valiosas contribuições para a realização desse trabalho.

Aos amigos do laboratório, Gabriel Gustinelli, Marcos Gomes, Paulino Souza, Paula Packer, Iolanda Rufini, Quienly Godoi, Flávio Leme e Kennedy Aragão, pela agradável convivência e valiosas contribuições.

Aos pesquisadores, técnicos e amigos do Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho” do CENA pelo agradável convívio.

Ao Dr. Carlos Eduardo Faroni do Centro de Tecnologia Canavieira e à Dra. Rafaella Rosseto do Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico do Centro Sul pelo fornecimento das amostras das folhas de cana-de-açúcar

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, pelo apoio institucional e facilidades oferecidas.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), pelo apoio institucional, disponibilidade de infraestrutura para execução da parte experimental e facilidades oferecidas.

À Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira pelas análises por ICP OES.

Aos professores do Departamento de Química da UFSCar que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos funcionários da Pós-Graduação em Química da UFSCar, em especial à Ariane, Cristina e Luciani, pela atenção e colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa.

A todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para realização deste trabalho.

Sem vocês a realização deste sonho não seria possível!

**MUITO OBRIGADA!!!**

## LISTA DE ABREVIATURAS

LIBS	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
ICP-MS	Espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado
LA-ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente empregando ablação com laser
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
BRANN	Rede neural artificial com regularização Bayesiana
GA	Algoritmo genético
SBR	Razão sinal/fundo
SNR	Razão sinal/ruído
MLR	Regressão linear múltipla
LTSD	Distância entre a lente e a amostra
MR	Multiresposta
RMSE	Soma do erro quadrático médio
PLSR	Regressão por mínimos quadrados parciais
PCR	Regressão por componentes principais
NAS	Sinal analítico líquido
iPLS	Mínimos quadrados parciais por intervalos
RMSECV	Erro quadrático médio de validação cruzada
RMSEP	Raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão
PCA	Análise de componentes principais
PLSDA	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais para análise discriminante
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
CRMs	Materiais de referência certificados
VL	Variável latente
ANOVA	Análise de variância
LOD	Limite de detecção



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Faixas de concentração de macro e micronutrientes em plantas de interesse agrônomico.....	8
TABELA 2.1 - Planejamento fatorial para 2 e 3 variáveis .....	17
TABELA 2.2 - Sinais dos efeitos de interação $x_1x_2$ .....	17
TABELA 2.3 - Matriz Doehlert para três variáveis .....	20
TABELA 2.4 - Planejamento fatorial completo para cinco variáveis estudadas no sistema LIBS com laser de Nd:YAG@1064 nm e espectrômetro LLA para determinação de Al, B, Ca, Cu, Fe, K, P, Mn, Mg, Si e Zn em pastilhas de tecido vegetal.....	34
TABELA 2.5 - Matriz Doehlert para cinco variáveis estudadas no sistema LIBS com laser de Nd:YAG@1064 nm e espectrômetro LLA para determinação de Al, B, Ca, Cu, Fe, K, P, Mn, Mg, Si e Zn em pastilhas de tecido vegetal.....	35
TABELA 2.6 - Matriz do planejamento fatorial para otimização das condições para preparo das pastilhas de tecidos vegetais e pa análises por LIBS com laser de Nd:YAG (1064 nm) e espectrômetro com óptica echelle acoplado com ICCD.....	40
TABELA 2.7 - Coeficientes da matriz Doehlert para valores de área de pico.....	56
TABELA 2.8 - Valores de área de pico obtidos no processo de otimização do preparo das pastilhas e das análises por LIBS.....	69
TABELA 2.9 - Valores de área de pico normalizados e a multiresposta obtidos no processo de otimização do preparo das pastilhas e das análises por LIBS.....	70
TABELA 2.10 - Condições para o preparo de amostra e aquisição dos espectros no sistema LIBS em pastilhas de tecidos vegetais.....	73
TABELA 3.1 - Materiais de referência certificados e amostras de folhas de diferentes espécies de plantas para calibração e validação dos modelos de regressão por PLS e univariado.....	83
TABELA 3.2 - Variedades de folhas de cana-de-açúcar utilizadas para calibração e validação dos modelos PLSR.....	84

TABELA 3.3 - Materiais de referência certificados utilizados na validação do procedimento de decomposição.....	87
TABELA 3.4 - Programa utilizado para digestão das amostras.....	88
TABELA 3.5 - Parâmetros operacionais utilizados nas análises por ICP OES.....	88
TABELA 3.6 - Tamanhos das partículas em função do tempo de moagem criogênica para folhas de cana-de-açúcar, variedade 12 CTC...	90
TABELA 3.7 - Tamanhos das partículas para diferentes variedades de cana-de-açúcar com 40 minutos de moagem criogênica.....	98
TABELA 3.8 - Comparação entre os valores obtidos por ICP OES e os teores certificados de micronutrientes.....	101
TABELA 3.9 - Comparação entre os valores obtidos por ICP OES e os teores certificados de macronutrientes.....	102
TABELA 3.10 - Valores de t calculado com 95% de confiança.....	102
TABELA 3.11 - Faixas de concentração de macro e micronutrientes do conjunto de amostras de calibração para folhas de diferentes culturas....	105
TABELA 3.12 - Resultados médios de algumas figuras de mérito para determinação de macronutrientes comparando as calibrações univariada e multivariada por PLS em amostras de diferentes culturas...	115
TABELA 3.13 - Resultados médios de algumas figuras de mérito para determinação de micronutrientes comparando as calibrações univariada e multivariada por PLS em amostras de diferentes culturas.....	116
TABELA 3.14 - Conjunto de amostras utilizadas para construção dos modelos de calibração e validação.....	119
TABELA 3.15 - Faixas de concentração de macro e micronutrientes do conjunto de calibração para folhas de cana-de-açúcar.....	120
TABELA 3.16 - Número de intervalos e subintervalos selecionados para construção dos modelos de calibração para P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn e B.....	124
TABELA 3.17 – Figuras de mérito para determinação de macro e micronutrientes em folhas de cana-de-açúcar com calibração multivariada por PLSR .....	132

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - Representação dos pontos experimentais de uma matriz Doehlert para otimização de três variáveis.....	20
FIGURA 2.2 - Representação de um neurônio biológico.....	22
FIGURA 2.3 - Representação de uma unidade de processamento artificial.....	22
FIGURA 2.4 - Representação típica de rede neural artificial.....	23
FIGURA 2.5 - Arranjo experimental utilizado.....	28
FIGURA 2.6 - Foto do sistema LIBS usado nos experimentos.....	28
FIGURA 2.7 - Detalhes de um espectro de emissão de pastilha de folhas de espinafre (NIST 1570a).....	29
FIGURA 2.8 - Fragmento do espectro de emissão de folhas de espinafre (NIST 1570a) mostrando uma linha espectral (Si I 288,158 nm) e regiões nas vizinhanças desta linha ( $R_1$ e $R_2$ ) para a correção da emissão de fundo e para o cálculo do limite de detecção.....	30
FIGURA 2.9 - Ilustração da sequência analítica para o preparo de pastilhas e análises em sistema LIBS.....	31
FIGURA 2.10 - Vista do sistema óptico (lente de focalização do laser, da câmara de ablação com amostra e do telescópio) do sistema LIBS.....	31
FIGURA 2.11 - Estrutura da rede neural artificial com cinco neurônios na camada de entrada e 11 neurônios na camada de saída.....	36
FIGURA 2.12 – Codificação hipotética de cada variável experimental no algoritmo genético.....	38
FIGURA 2.13 - Intensidades das áreas dos picos de emissão obtidos nas condições do planejamento fatorial para P e K em diferentes comprimentos de onda.....	42
FIGURA 2.14 - Intensidades das áreas dos picos de emissão obtidos nas condições do planejamento fatorial para Ca e Mg em diferentes comprimentos de onda.....	43

FIGURA 2.15 - Intensidades das áreas dos picos de emissão obtidos nas condições do planejamento fatorial para Mn e Fe em diferentes comprimentos de onda.....	44
FIGURA 2.16 - Intensidades das áreas dos picos de emissão obtidos nas condições do planejamento fatorial para Cu e Zn em diferentes comprimentos de onda.....	45
FIGURA 2.17 - Intensidades das áreas dos picos de emissão obtidos nas condições do planejamento fatorial para B e Al em diferentes comprimentos de onda.....	46
FIGURA 2.18 - Intensidades das áreas dos picos de emissão obtidos nas condições do planejamento fatorial para Si em diferentes comprimentos de onda.....	47
FIGURA 2.19 - Gráficos de Pareto do planejamento fatorial completo para P, K, Ca, Mg, Mn e Fe.....	48
FIGURA 2.20 - Gráficos de Pareto do planejamento fatorial completo para Cu, Zn, B, Al e Si.....	49
FIGURA 2.21 - Intensidades das áreas dos picos de emissão de Al, B, Ca, Cu, Fe e K em cada ensaio experimental do planejamento Doehlert.....	51
FIGURA 2.22 - Intensidades das áreas dos picos de emissão de Mg, Mn, P, Si e Zn em cada ensaio experimental do planejamento Doehlert.....	52
FIGURA 2.23 - Correlação entre valores de intensidade de áreas dos picos de emissão medidos e valores estimados pelos modelos obtidos do planejamento Doehlert para P, K, Ca, Mg, Mn e Fe ao nível de 95% de significância.....	57
FIGURA 2.24 - Correlação entre valores de intensidade de áreas dos picos de emissão medidos e valores estimados pelos modelos obtidos do planejamento Doehlert para P, K, Ca, Mg, Mn e Fe ao nível de 95% de significância.....	58
FIGURA 2.25 - Representação tridimensional dos valores de RMSE para P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, B, Si e Al com o modelo BRANN em 5 treinamentos da rede.....	59

FIGURA 2.26 - Resíduos para P, K, Ca, Mg, Mn e Fe obtidos do modelo BRANN.....	60
FIGURA 2.27 - Resíduos para Cu, Zn, B, Al e Si obtidos do modelo BRANN.....	61
FIGURA 2.28 - Regiões espectrais selecionadas para determinação de P, K, Ca, Mg, Mn e Fe em tecidos vegetais.....	63
FIGURA 2.29 - Regiões espectrais selecionadas para determinação de Cu, Zn, B, Al e Si em tecidos vegetais.....	64
FIGURA 2.30 - Valores de intensidade das áreas dos picos de emissão de P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, B e Al em tecidos vegetais obtidos com tratamento neuro-genético e melhor ponto experimental do planejamento Doehlert.....	65
FIGURA 2.31 - Valores de área de pico de P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, B, Al e Si em pastilhas de BCR 62 nas condições do ponto central do planejamento Doehlert, melhor ponto experimental do planejamento Doehlert (Exp. 21) e com tratamento neuro-genético (BRANN).....	66
FIGURA 2.32 - Valores de área de pico de P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, B, Al e Si em pastilhas de folhas de soja nas condições do ponto central do planejamento Doehlert, melhor ponto experimental do planejamento Doehlert (Exp. 21) e com tratamento neuro-genético (BRANN).....	67
FIGURA 2.33 - Valores de área de pico de P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, B, Al e Si em pastilhas de folhas de cafeeiro nas condições do ponto central do planejamento Doehlert, melhor ponto experimental do planejamento Doehlert (Exp. 21) e com tratamento neuro-genético.....	67
FIGURA 2.34 - Valores de área de pico de P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, B, Al e Si em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar nas condições do ponto central do planejamento Doehlert, melhor ponto experimental do planejamento Doehlert (Exp. 21) e com tratamento neuro-genético.....	68
FIGURA 2.35 - Valores de área de pico de P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, B, Al e Si em pastilhas de folhas de milho nas condições do ponto central do planejamento Doehlert, melhor ponto experimental do planejamento Doehlert (Exp. 21) e com tratamento neuro-genético.....	68

FIGURA 2.36 - Gráficos de Pareto do planejamento fatorial completo para P, K, Ca e Mg.....	71
FIGURA 2.37 - Gráficos de Pareto do planejamento fatorial completo para Mn, Fe, Cu, Zn, B e Al.....	72
FIGURA 2.38 - Gráficos de Pareto do planejamento fatorial completo para Si e multiresposta (MR).....	73
FIGURA 3.1 - Representação esquemática da decomposição em variáveis latentes das matrizes <b>X</b> e <b>Y</b> para o modelo PLS.....	77
FIGURA 3.2 - Distribuição do tamanho das partículas e respectivas micrografias obtidas por MEV em folhas de cana-de-açúcar (variedade 12 CTC) após 10, 20 e 30 min de moagem criogênica.....	91
FIGURA 3.3 - Distribuição do tamanho das partículas e respectivas micrografias obtidas por MEV em folhas de cana-de-açúcar (variedade 12 CTC) após 40, 50 e 60 min de moagem criogênica.....	92
FIGURA 3.4 - Valores de intensidade de emissão de P, K, Ca e Mg em folhas de cana-de-açúcar, variedade 12 CTC, em diferentes tempos de moagem criogênica.....	94
FIGURA 3.5 - Valores de intensidade de emissão de Mn, Fe, Cu, B e Zn em folhas de cana-de-açúcar, variedade 12 CTC, em diferentes tempos de moagem criogênica.....	95
FIGURA 3.6 - Teores de P, K, Ca e Mg obtidos por ICP OES e respectivos desvios-padrão (n = 3) em folhas de cana-de-açúcar, variedade 12 CTC, em diferentes tempos de moagem criogênica.....	96
FIGURA 3.7 - Teores de Mn, Fe, Cu, B e Zn obtidos por ICP OES e respectivos desvios-padrão (n = 3) em folhas de cana-de-açúcar, variedade 12 CTC, em diferentes tempos de moagem criogênica.....	97
FIGURA 3.8 - Distribuição do tamanho das partículas com 40 min de moagem criogênica de folhas de cana-de-açúcar das variedades 5 IAC, 5 CTC e 10 CTC.....	99
FIGURA 3.9 - Distribuição do tamanho das partículas com 40 min de moagem criogênica de folhas de cana-de-açúcar das variedades 15 CTC, 18 CTC e RB 855453.....	100

FIGURA 3.10 - Representação gráfica das duas componentes principais obtidas para 19 pastilhas de folhas de diferentes culturas.....	104
FIGURA 3.11 - Representação gráfica das duas componentes principais obtidas para 18 pastilhas de folhas de diferentes culturas.....	104
FIGURA 3.12 - Representação gráfica das duas componentes principais obtidas para 17 pastilhas de folhas de diferentes culturas.....	104
FIGURA 3.13 - Fragmentos espectrais de P, K, Ca e Mg utilizados nos modelos de regressão por PLS para amostras de diferentes culturas.....	106
FIGURA 3.14 - Fragmentos espectrais de Mn, Fe, Cu, Zn e B utilizados nos modelos de regressão por PLS para amostras de diferentes culturas.....	107
FIGURA 3.15 - Valores de RMSECV em função do número de variáveis latentes nos modelos PLS para Mg, P, Ca, K, B, Cu, Zn, Fe e Mn em folhas de plantas de diferentes culturas.....	108
FIGURA 3.16 - Correlação entre concentrações de referência e sinal analítico líquido do modelo PLS (NAS) em sua forma pseudo-univariada para P, K, Ca e Mg em folhas de plantas de diferentes culturas.....	109
FIGURA 3.17 - Correlação entre concentrações de referência e sinal analítico líquido do modelo PLS (NAS) em sua forma pseudo-univariada para Mn, Fe, Cu, Zn e B em folhas de plantas de diferentes culturas.....	110
FIGURA 3.18 - Comparação entre resultados de P, K e Ca nas amostras de validação, para diferentes culturas, obtidos por LIBS com calibração multivariada (PLS), univariada e por ICP OES. As barras de incerteza são representadas por $\pm 1$ desvio-padrão ( $n = 3$ ).....	112
FIGURA 3.19 - Comparação entre resultados de Mg, Mn e Fe nas amostras de validação, para diferentes culturas, obtidos por LIBS com calibração multivariada (PLS), univariada e por ICP OES. As barras de incerteza são representadas por $\pm 1$ desvio-padrão ( $n = 3$ ).....	113
FIGURA 3.20 - Comparação entre resultados de Cu, Zn e B nas amostras de validação, para diferentes culturas, obtidos por LIBS com calibração multivariada (PLS), univariada e por ICP OES. As barras de incerteza são representadas por $\pm 1$ desvio-padrão ( $n = 3$ ).....	114

FIGURA 3.21 - Representação gráfica das duas componentes principais obtidas para 67 amostras de folhas de cana-de-açúcar.....	117
FIGURA 3.22 - Representação gráfica das duas componentes principais obtidas para 65 amostras de folhas de cana-de-açúcar.....	118
FIGURA 3.23 - Valores de RMSECV observados em diferentes intervalos obtidos com o iPLS para P, K e Ca.....	121
FIGURA 3.24 - RMSECV observados em diferentes intervalos obtidos com o iPLS para Mg, Mn e Fe.....	122
FIGURA 3.25 - Valores de RMSECV observados em diferentes intervalos obtidos com o iPLS para Zn e B.....	123
FIGURA 3. 26 -Valores de RMSECV para Mg, P, Ca, K, B, Zn, Fe, Mn e Al em função do número de variáveis latentes para os modelos PLS.....	125
FIGURA 3.27 - Correlação entre concentrações de referência e sinal analítico líquido do modelo PLS (NAS) em sua forma pseudo-univariada para P, K, Ca e Mg em folhas de cana-de-açúcar.....	126
FIGURA 3.28 - Correlação entre concentrações de referência e sinal analítico líquido do modelo PLS (NAS) em sua forma pseudo-univariada para Mn, Fe, Cu, Zn e B em folhas de plantas de cana-de-açúcar.....	127
FIGURA 3.29 - Comparação entre resultados de P, K e Ca nas amostras de validação, para folhas de cana-de-açúcar, obtidos por LIBS com calibração multivariada (PLS) e por ICP OES. As barras de incerteza são representadas por $\pm 1$ desvio-padrão ( $n = 3$ ).....	128
FIGURA 3.30 - Comparação entre resultados de Mg, Mn e Fe nas amostras de validação, para folhas de cana-de-açúcar, obtidos por LIBS com calibração multivariada (PLS) e por ICP OES. As barras de incerteza são representadas por $\pm 1$ desvio-padrão ( $n = 3$ ).....	129
FIGURA 3.31 - Comparação entre resultados de Zn, B e Al nas amostras de validação, para folhas de cana-de-açúcar, obtidos por LIBS com calibração multivariada (PLS) e por ICP OES. As barras de incerteza são representadas por $\pm 1$ desvio-padrão ( $n = 3$ ).....	130



## RESUMO

ESTRATÉGIAS QUIMIOMÉTRICAS PARA ANÁLISE DE PLANTAS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR LASER. Foram desenvolvidos procedimentos quimiométricos para a determinação simultânea de P, Ca, K, Mg, P, B, Cu, Fe, Mn, Zn e Al em pastilhas de folhas de plantas por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS). Utilizou-se um laser Q-Switched Nd:YAG a 1064 nm (pulsos de 5 ns, 10 Hz, 360 mJ). e espectrômetro com óptica Echelle e detector ICCD. Para definir as condições experimentais mais apropriadas para a determinação simultânea dos elementos, empregaram-se métodos de otimização multivariada através da abordagem neuro-genética e utilizaram-se pastilhas preparadas com o material certificado de folhas de espinafre (NIST 1570a). Dez espectros acumulados foram coletados em diferentes posições da pastilha e a média desses espectros foi utilizada como uma porção amostrada. A resposta avaliada foi área dos picos de emissão. As condições otimizadas corresponderam a 110 mJ/pulso do laser, 17,5 cm de distância entre a lente de focalização do laser e a superfície da pastilha, 25 pulsos acumulados, tempo de atraso de 2,0  $\mu$ s e tempo de integração de 4,5  $\mu$ s. Para a determinação quantitativa dos elementos, construíram-se modelos de calibração multivariada por meio da regressão dos mínimos quadrados parciais (PLSR), selecionando-se intervalos espectrais por iPLS e/ou com base no banco de dados do NIST. Para a calibração, utilizaram-se dois conjuntos de amostras, um constituído por folhas de diferentes culturas e outro por diferentes variedades de cana-de-açúcar. De modo geral, a 95% de confiança, os resultados obtidos por LIBS com emprego de PLSR apresentaram boa concordância com os valores obtidos por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES). Os limites de detecção estimados e os coeficientes de variação obtidos foram apropriados para análise foliar.

## ABSTRACT

CHEMOMETRIC STRATEGIES FOR PLANT ANALYSIS BY LASER INDUCED BREAKDOWN SPECTROMETRY. A simultaneous optimization strategy based on neuro-genetic approach is proposed for selection of operational parameters for the simultaneous determination of macronutrients (Ca, Mg and P), micronutrients (B, Cu, Fe, Mn and Zn), Al and Si in plants by laser induced breakdown spectroscopy (LIBS). Laser pulse energy, lens-to-sample distance, number of accumulated laser pulses, delay time and integration time gate were optimized. A Q-Switched Nd: YAG laser operating in the fundamental wavelength (1064 nm) with repetition rate of 10 Hz and spectrometer with optical Echelle and ICCD detector was employed. Pellets of spinach leaves (NIST 1570a) were employed as laboratory samples. Measurements of LIBS spectra were based on three replicates and each replicate consisted of an average of ten spectra collected in different sites (i.e. test portions) of the pellet. In order to find a model that could correlate LIBS operational parameters and peak areas of all elements simultaneously a Bayesian Regularized Artificial Neural Network (BRANN) approach was employed. Subsequently, genetic algorithm (GA) was applied to find the optimal parameters for the neural network model. A single LIBS working condition pointed out by genetic algorithm (GA) was obtained with the following optimized parameters: 17.5 cm lens-to-sample distance, 25 accumulated laser pulses, 2.0  $\mu$ s delay time and 4.5  $\mu$ s integration time gate using a laser Nd:YAG at 1064 nm with 110 mJ per pulse focused on a pellet surface prepared from ground plant samples. Quantitative determinations were carried out by using chemometric methods, such as PLSR and iPLS. Samples of different cultures were used. For comparative purpose, the laboratory samples were also microwave-assisted digested and further analyzed by ICP OES. In general, results obtained by LIBS did not differ significantly from ICP OES data by applying a *t*-test at 95% confidence level. It is demonstrated that LIBS is a powerful tool for determination of macro and micronutrients in pellets of plant materials.

# SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser .....	1
1.1 – Introdução.....	2
1.2 - Fundamentos da espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser - LIBS.....	5
1.3 - Estado da arte na determinação de elementos em tecidos vegetais por LIBS.....	7
1.4 – Objetivo.....	12
CAPÍTULO 2 - Otimização das condições experimentais.....	13
2.1 - Fundamentos teóricos.....	14
2.1.1 – Planejamento e otimização experimental.....	14
2.1.2 - Planejamento fatorial completo.....	15
2.1.3 - Planejamento Doehlert.....	18
2.1.4 - Otimização simultânea por abordagem neuro-genética.....	21
2.1.4.1 - Redes neurais artificiais.....	21
2.2 – Parte Experimental.....	27
2.2.1 – Instrumentação.....	27
2.2.2 - Sinais de emissão em LIBS.....	29
2.2.3 – Preparo das amostras.....	30
2.2.4 - Otimização das condições experimentais para aquisição dos espectros LIBS .....	32
2.2.5 - Otimização das condições para o preparo das pastilhas.....	38
2.3 - Resultados e Discussão.....	41
2.3.1 - Planejamento fatorial completo.....	41
2.3.2 - Planejamento Doehlert.....	50
2.3.3 - Aplicação das redes neurais artificiais e algoritmo genético	59

2.3.4 - Avaliação das condições experimentais para diferentes culturas.....	65
2.3.5 - Otimização das condições para o preparo das pastilhas.....	69
<b>CAPÍTULO 3 – Calibração Multivariada.....</b>	<b>74</b>
3.1 – Fundamentos teóricos da calibração multivariada.....	75
3.1.1 - Regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR).....	75
3.1.2 - Seleção de variáveis em calibração de primeira ordem e sinal analítico líquido (NAS).....	77
3.1.3 - Aplicações de calibração multivariada em LIBS.....	79
3.2 - Parte experimental.....	81
3.2.1 - Preparo das amostras.....	81
3.2.2 – Amostras de diferentes culturas e materiais de referência certificados.....	83
3.2.3 - Amostras de folhas de cana-de-açúcar.....	84
3.2.4 - Modelos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR).....	85
3.2.5 - Preparo das amostras para o método comparativo.....	87
3.3 - Resultados e Discussão.....	89
3.3.1 – Efeito do tempo de moagem das amostras para o preparo das pastilhas.....	89
3.3.2 – Análise de materiais de referência certificados.....	101
3.3.3 - Calibração multivariada para determinação de macro e micronutrientes em amostras de diferentes culturas.....	103
3.3.4 - Calibração multivariada para determinação de macro e micronutrientes em folhas de cana-de-açúcar.....	117
Conclusões.....	133
Referências Bibliográficas.....	134

## **CAPÍTULO 1**

*Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser*

## 1.1- Introdução

As técnicas analíticas fundamentadas na emissão de radiação eletromagnética utilizam uma fonte de energia para promover as espécies presentes na amostra para níveis de energia mais altos onde elas sofrem um processo de decaimento, emitindo radiação característica que é coletada, enviada a um seletor de comprimento de onda e detectada. A amostra pode estar no estado sólido, líquido ou gasoso. No entanto, algumas técnicas de emissão não são capazes de processar as amostras em seu estado original necessitando de alguma forma de pré-tratamento antes da análise.

As técnicas que mais se destacam para determinação de macro (P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) são a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Como estas técnicas requerem a introdução das amostras na forma de soluções, são necessários procedimentos de decomposição e/ou dissolução em blocos digestores ou assistida por radiação micro-ondas, por exemplo. Esta última é caracterizada por menor consumo de reagentes, maior rapidez, risco reduzido de perdas de analitos por volatilização e de contaminações, utilizando-se sistema com frascos fechados <sup>1</sup>.

O pré-tratamento da amostra é frequentemente a etapa mais crítica, trabalhosa e sujeita à indução de erros devido à contaminação e perda de material. Além disso, a necessidade de pré-tratamentos limita o uso destas técnicas em campo, uma necessidade cada vez mais presente em relação às expectativas de diversas áreas de interesse. Dessa forma há uma crescente busca por métodos de preparo de amostra cada vez mais rápidos e versáteis bem como o desenvolvimento de métodos de análise direta sem nenhum ou com o mínimo pré-tratamento de amostra <sup>1</sup>.

Dentro do panorama da química analítica moderna, a análise direta de amostras tornou-se um grande desafio, pois pode melhorar a eficiência analítica eliminando as etapas de digestão, reduzindo os riscos de contaminação das amostras além de eliminar o uso ou a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente.

A análise direta de amostras usando lasers tem despertado grande interesse da comunidade científica devido, principalmente, aos conceitos de sustentabilidade, química limpa e ao grande avanço da indústria de componentes ópticos e eletrônicos <sup>2,3</sup>.

A teoria necessária para a construção do primeiro laser foi proposta por SHAWLOW e TOWNES em 1958 <sup>4</sup>, mas foi MAIMAN <sup>3</sup>, que construiu o primeiro laser de rubi em 1960. Em 1962, o laser de rubi foi usado por BRECH <sup>5</sup> para produzir vapores na superfície de materiais metálicos e não-metálicos. Esses vapores foram então excitados por uma fonte de energia auxiliar para formar um microplasma, com o objetivo de detectar seu espectro de emissão. Esse experimento é considerado como o nascimento de uma das primeiras técnicas analíticas a utilizar o laser como fonte de energia a qual é denominada Laser Induced Breakdown Spectroscopy – LIBS <sup>6</sup>.

Apesar do primeiro trabalho utilizando LIBS para fins analíticos ter sido reportado na década de 60 <sup>5</sup>, sua utilização passou por um período de estagnação durante as décadas de 60 e 70 devido ao elevado custo da instrumentação e baixo desempenho analítico, quando comparada às técnicas de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) e ICP OES <sup>6</sup>.

Após esse período os primeiros trabalhos com LIBS foram realizados por CREMERS et al. <sup>7</sup> e WACHTER e CREMERS <sup>8</sup> no início de 1980, período em que os lasers foram mais difundidos.

Maior interesse pela técnica LIBS foi observado em meados dos anos 90, com a disponibilidade comercial de lasers mais estáveis e robustos; sistemas óticos dispersivos de alta resolução em um amplo intervalo espectral;

desenvolvimento de detectores mais sensíveis (ICCD - *Intensified Charge-Coupled Device*) que possibilitam melhor resolução temporal nas medidas espectroscópicas e melhor discriminação entre o espectro de emissão e o espectro de fundo proveniente da emissão do contínuo do plasma.

Nos últimos anos, LIBS emergiu como uma poderosa técnica analítica para análise rápida e precisa, devido à sua versatilidade, simplicidade da estrutura operacional e mínimo ou nenhum pré-tratamento de amostras, o que a torna uma ferramenta interessante para analisar diferentes materiais. Progressos tecnológicos recentes no domínio das fontes de laser compactos e tratamento de dados facilitam a aplicação de LIBS.

LIBS apresenta uma série de características relevantes para a abordagem dos problemas analíticos atuais. Dentre estas características destacam-se:

- A técnica pode ser aplicada diretamente em amostras sólidas, líquidas e gasosas sem ou com mínima necessidade de pré-tratamento ou procedimentos de decomposição;
- O efeito de um único pulso de laser sobre a amostra compromete pouco sua integridade, podendo considerá-la uma técnica semi-destrutiva;
- Apresenta característica micro-analítica, que permite seu uso em análises de superfícies e de profundidade em amostras sólidas, com resolução espacial de poucos  $\mu\text{m}$ ;
- Permite a redução de tamanho do equipamento necessário à sua implementação, possibilitando a construção de equipamentos portáteis que podem ser levados a campo.
- O uso de instrumentação adequada permite a aplicação da técnica em ambientes insalubres e no monitoramento à distância de amostras perigosas como explosivos;
- Análise em tempo real com curto tempo de aquisição do espectro (1 a 10 espectros por segundo, dependendo da taxa de repetição do laser).



Os desenvolvimentos alcançados por esta técnica têm sido revisados em numerosos artigos <sup>6,9-16</sup> e livros <sup>17-19</sup>, o que atesta o grau de interesse em seu desenvolvimento e futura consolidação.

Recentes aplicações têm demonstrado a habilidade de LIBS para análises de jóias <sup>20-22</sup>, metais e ligas metálicas <sup>23-26</sup>, polímeros <sup>27-29</sup>, madeira <sup>30</sup>, objetos de arte <sup>31-33</sup>, materiais explosivos <sup>34-36</sup>, solos e minerais <sup>26,37-41</sup>, materiais biológicos <sup>42-44</sup> e análise forense <sup>45,46</sup>.

Algumas aplicações biológicas da técnica LIBS consistem na determinação de elementos-traço em dentes <sup>47</sup>, minerais e elementos potencialmente tóxicos em tecido calcificado <sup>48</sup>, Zn em pele humana <sup>49</sup>, Ca em brotos de girassol <sup>50</sup> e Mg, K, Ca e Na em cabelo humano <sup>51</sup>. Desta maneira, LIBS tem se revelado como uma técnica versátil para análise elementar de diferentes tipos de amostras.

## **1.2 – Fundamentos da espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser - LIBS**

A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser é uma técnica espectroanalítica que se baseia na análise de emissões atômicas, iônicas e moleculares de espécies presentes em um plasma que é obtido pelo pulso de um laser focalizado na superfície da amostra.

A radiação emitida é monitorada por meio de um seletor de comprimento de onda e sistema de detecção e está associada com a composição química da amostra. Um pulso do laser com energia suficiente é capaz de provocar a vaporização e excitação de espécies químicas presentes na amostra. As espécies excitadas emitem radiação em comprimentos de onda específicos que são característicos dos elementos presentes na amostra. O espectro de

emissão do plasma é obtido e a intensidade de emissão dos elementos químicos presentes é utilizada como resposta analítica <sup>52</sup>.

A composição do plasma é dependente não só da composição da amostra, mas também dos parâmetros do laser, das condições da superfície da amostra, bem como das propriedades térmicas e ópticas da amostra <sup>53</sup>.

Em geral, utiliza-se um laser pulsado de 1 a 10 ns, com taxa de repetição entre 1 e 10 Hz, alternativamente podem ser utilizados lasers com duração de ps a fs.

Um sistema LIBS típico é constituído pelos seguintes componentes:

- um laser pulsado com energia suficiente para formação do plasma;
- um sistema óptico para focalizar a energia do laser na superfície da amostra;
- um sistema óptico (telescópio) para coletar a radiação emitida pelo plasma e focalizá-la na fenda de entrada do espectrômetro;
- um detector para medidas simultâneas das radiações emitidas nas regiões UV e visível do espectro eletromagnético.
- um computador para o controle do laser e do espectrômetro, assim como para aquisição e processamento dos espectros de emissão.

Embora uma variedade de tipos de laser (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, KrF, XeCl) possam ser utilizados, o mais comum é o laser de Nd:YAG no comprimento de onda fundamental (1064 nm), pulsado em regime temporal de ns, com irradiância da ordem de GW cm<sup>-2</sup> incidindo sobre a superfície da amostra e promovendo a formação de um plasma de temperatura elevada (8000-12000 K).

Na formação do plasma, os elétrons interagem e se recombinam com íons para liberar energia. Durante a relaxação, os átomos, íons e fragmentos de moléculas excitados no plasma emitem um espectro de emissão característico do material volatilizado da amostra <sup>37</sup>. O espectro de emissão altera-se em função da evolução temporal do plasma. Nos primeiros instantes, o espectro é caracterizado pela emissão de radiação do contínuo e de espécies iônicas excitadas. O contínuo é a “luz branca” emitida pelo plasma, proveniente,

principalmente, de reações de recombinação dos elétrons livres com os íons e de fenômenos *bremstrahlung*. Ao longo do decaimento do plasma, o espectro começa a ser caracterizado pela radiação emitida por átomos neutros e, eventualmente, por moléculas simples, formadas pela recombinação de espécies atômicas. Na prática, durante o decaimento, observa-se uma diminuição da intensidade de emissão da radiação de fundo.

### **1.3 - Estado da arte na determinação de elementos em tecidos vegetais por LIBS**

Os elementos essenciais para a nutrição das plantas podem afetar a produção agrícola quando não estão disponíveis em concentrações adequadas. Esses elementos podem ser exigidos em maiores quantidades (macronutrientes) ou em menores quantidades (micronutrientes). Dessa forma, a determinação de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S) e micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Zn, B, Mo, Ni e Cl) em tecido vegetal é, frequentemente, recomendada para avaliar o estado nutricional da cultura <sup>54</sup>.

As faixas de concentração de macro e micronutrientes comumente encontradas na maioria das plantas de interesse agrônômico são mostradas na TABELA 1.1 <sup>55,56</sup>.

A análise foliar é normalmente empregada para diagnose nutricional, uma vez que a concentração de um determinado nutriente na folha é uma indicação da sua disponibilidade no solo. As alterações nas suas concentrações estão relacionadas com alterações no desenvolvimento e produção.

Vale ressaltar que um elemento benéfico, macro ou micronutriente, pode se tornar potencialmente tóxico se presente em concentração excessiva.

TABELA 1.1 - Faixas de concentração de macro e micronutrientes em plantas de interesse agrônômico

Elemento	Intervalo de concentração (g kg <sup>-1</sup> )
P	0,8 – 10
K	6 – 60
Ca	2 – 60
Mg	1 – 10
	Intervalo de concentração (mg kg <sup>-1</sup> )
Mn	20 – 2000
Fe	50 – 900
Cu	3 – 50
Zn	5 – 200
B	10 – 2005

As plantas que sofrem de deficiência de fósforo apresentam folhas menores e de aparência verde-azulada nos primeiros estágios de crescimento. Além disso, as árvores frutíferas apresentam reduzido crescimento de novos frutos e a formação das flores é comprometida<sup>55</sup>.

A deficiência de potássio não resulta em sintomas imediatamente visíveis, mas as plantas afetadas apresentam maior suscetibilidade a ataques de fungos. O cálcio desempenha um papel importante no crescimento e desenvolvimento das plantas e a sua deficiência pode causar deformações nas folhas mais jovens<sup>55</sup>.

Os sintomas da deficiência de magnésio diferem entre as espécies de plantas o que torna difícil uma descrição generalizada, mas as folhas tornam-se rígidas e quebradiças com nervuras intercostais torcidas podendo afetar o crescimento das raízes<sup>55</sup>.

A disponibilidade de micronutrientes é essencial para o desenvolvimento adequado das plantas. A deficiência de ferro, por exemplo, pode ser detectada nas folhas mais jovens que apresentam aparência amarelada. Quantidades insuficientes de manganês diminuem o volume celular, afetando também o desenvolvimento das folhas mais jovens, assemelhando-se muito com a deficiência de ferro<sup>57</sup>.

O sintoma de deficiência de cobre é a produção de folhas verdes escuras, retorcidas ou malformadas. Dependendo do grau de deficiência, pode ocorrer queda prematura das folhas e impedimento da germinação de novos brotos. Plantas com deficiência de zinco também apresentam folhas pequenas e retorcidas, com aparência enrugada e amarelada. Nas com deficiência de boro, as folhas mais novas são deformadas, quebradiças e apresentam coloração verde-azulada<sup>57</sup>.

Um dos métodos mais recomendados para análises de rotina é a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente<sup>58-62</sup>, devido à sua capacidade multielementar e simultânea. Alternativamente, espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)<sup>63</sup> e a espectrometria de absorção atômica com chama<sup>64</sup> podem ser utilizadas. Geralmente, essas técnicas requerem etapas de pré-tratamento como secagem, moagem e decomposição ácida em sistemas fechados ou abertos, para determinação dos elementos essenciais.

Apesar dessas técnicas serem amplamente utilizadas, a análise direta de plantas ainda consiste em um desafio na química analítica. Até o momento, poucos trabalhos investigam a possibilidade de utilização de LIBS para análise de plantas. A aplicação de LIBS para análise direta em vegetais e folhas de plantas tem sido realizada com sucesso para mapeamento de elementos de interesse<sup>65-67</sup>.

Um método multielementar para análise direta de folhas de plantas por LIBS foi avaliado por SUN et al.<sup>68</sup> para determinação de 3 macronutrientes (Ca, Mg, P), 4 micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Zn) e Al. Três materiais de referência certificados e a mistura destes materiais em diferentes proporções foram utilizados para calibração analítica. O material moído foi aplicado em uma fita dupla-face e laser Nd:YAG (1064 nm, 100 mJ por pulso) e utilizado para formação do plasma. Melhor razão sinal/fundo foi obtida após 1  $\mu$ s de atraso, 10  $\mu$ s de integração e 20 pulsos do laser. Os coeficientes de variação das medidas variaram entre 8 e 15 %. Segundo os autores, o método mostrou-se rápido para determinação dos analitos em materiais botânicos, agrícolas e outros materiais com matriz semelhante. A exatidão foi avaliada utilizando materiais de referência certificados para Mn, Zn, P, Fe, Cu e Al. Nenhuma informação adicional foi fornecida para Ca e Mg.

SAMEK et al.<sup>69</sup> utilizaram um laser de fs para a determinação direta de Fe em folhas de plantas, propondo um procedimento que fornece informações sobre a distribuição do analito na folha.

KAISER et al.<sup>70</sup> avaliaram a bioacumulação espacial de Cd e Pb em folhas e raízes de girassol utilizando fs-LIBS e técnicas baseadas em microscopia com raios-X. Devido a dificuldades para a calibração apenas a análise qualitativa foi realizada, sinais de emissões mais intensos desses elementos foram encontrados no xilema.

KAISER et al.<sup>66</sup> monitoraram a acumulação de Mg, Cu Pb em folhas de girassol por LIBS com laser Nd:YAG (532 nm, 10 mJ, 10 Hz). Os resultados foram comparados com os obtidos por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente empregando ablação com laser (LA-ICP-MS). Segundo os autores, LIBS pode ser aplicada para monitoramento ambiental e para investigar a migração de elementos químicos em diferentes partes das plantas.

ASSION et al.<sup>50</sup> descreveram um método para medidas diretas na superfície de sementes de girassol *in natura* com lasers com pulsos de fs e ns, propondo um procedimento para determinar a distribuição de Ca na superfície das sementes. Segundo os autores, redução significativa do contínuo foi observada quando fs-LIBS foi utilizado.

GORNUSHKIN et al.<sup>71</sup> utilizaram um laser Nd:YAG e detector CCD para determinar Mg em materiais certificados (NIST) de folhas de plantas e diferentes matrizes e investigaram a influência da matriz nos sinais de emissão. Os autores sugeriram o uso das linhas de Mg II 292,87 nm e Mg II 293,65 nm que apareciam somente em amostras com concentração > 0,7 %. Para amostras com baixas concentrações (< 0,001 % m/m) as linhas Mg II 279,806 nm, Mg II 280,27 nm e Mg I 285,213 nm foram recomendadas. Porém, essas linhas podem ser atenuadas por processo de auto-absorção em concentrações acima de 0,5 %, reduzindo a faixa linear de calibração. O método proposto foi apropriado para reduzir efeitos de matriz e para análise de amostras de diferentes composições.

GALIOVÁ et al.<sup>72</sup> utilizaram laser Nd:YAG 532 nm para mapear a distribuição de Ag e Cu em folhas de girassol (*Helianthus Annuus L.*) empregando ns-LIBS (Nd:YAG, 532 nm, 10 mJ/pulso, 1 µs de atraso e 10 µs de integração). Foram utilizadas as linhas Ag I 328,07 nm e Cu I 324,75 nm.

Nos últimos anos, o grupo de pesquisa de espectrometria atômica do CENA-USP empregou a técnica LIBS para determinar macro e micronutrientes em tecidos vegetais, baseada na calibração com materiais de referência certificados<sup>73,74</sup> e para a otimização das condições experimentais por meio de algoritmo neuro-genético visando à determinação simultânea de macro e micronutrientes em pastilhas de tecidos vegetais<sup>75</sup>. As condições otimizadas foram utilizadas para determinação de micronutrientes em pastilhas de tecidos vegetais de diferentes culturas<sup>76</sup>.

## **1.4 – Objetivo**

Avaliar estratégias quimiométricas para otimização das condições experimentais e o emprego de calibração multivariada visando à determinação simultânea de P, Ca, K, Mg, P, B, Cu, Fe, Mn e Zn em tecidos vegetais por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser.



**CAPÍTULO 2**  
*Otimização das condições experimentais*

## 2.1 - Fundamentos teóricos

### 2.1.1 – Planejamento e otimização experimental

A obtenção de dados numéricos tem crescido em todos os campos da ciência devido ao desenvolvimento de novas técnicas e instrumentação que permitem obter uma resposta de forma mais rápida. Neste contexto, ferramentas quimiométricas tem sido frequentemente empregadas, para otimização, entender e para explorar um conjunto de dados e informações originados de um determinado sistema <sup>77</sup>.

No processo de otimização de um procedimento analítico existe a necessidade de selecionar as variáveis e ajustá-las para estabelecer as melhores condições experimentais para análise.

O método clássico de otimização é o univariado. Neste caso cada variável é otimizada de forma independente. Uma variável é estudada em um determinado nível, mantendo-se as demais constantes. A variável que está sendo otimizada é variada até que se encontre a melhor resposta e, uma nova variável passa a ser estudada. O processo se repete até que todas as variáveis sejam avaliadas e adequadas para se obter a melhor resposta. Nesse procedimento de otimização não é possível observar efeitos de interações entre as variáveis, e o número de experimentos aumenta com o número de variáveis.

Procedimentos envolvendo otimização multivariada baseados em ferramentas quimiométricas têm sido muito utilizados em química analítica para o desenvolvimento de métodos de análise. São ferramentas importantes para otimização de processos ou sistemas, pois fornecem com uma menor quantidade de experimentos uma maior quantidade de informações sobre a influência das variáveis estudadas bem como suas interações, resultando em menor consumo de reagente e tempo <sup>78</sup>.

Em geral, a otimização multivariada implica em uma investigação preliminar usando planejamentos fatoriais para selecionar as variáveis significativas. Para se obter uma condição experimental ótima empregam-se modelos de segunda ordem (metodologia de superfície de resposta) em que mais de dois níveis para cada variável são estudados <sup>79</sup>.

Em química analítica, técnicas multivariadas têm sido aplicadas para otimização de variáveis durante o desenvolvimento de estratégias analíticas envolvendo, entre outros, procedimentos para digestão de amostras <sup>80-83</sup> e sistemas de amostragem <sup>84</sup>. Outras aplicações incluem a otimização de parâmetros instrumentais para análises por GFAAS <sup>77,85</sup> e ICP OES <sup>86</sup>.

### **2.1.2 - Planejamento fatorial completo**

Planejamento fatorial completo de 2 níveis <sup>78</sup> é o planejamento de primeira ordem mais simples, em que cada fator é estudado em apenas dois níveis. Devido a sua simplicidade, são geralmente utilizados em investigações preliminares, quando se deseja saber se determinadas variáveis podem influenciar na resposta desejada <sup>78,79</sup>.

Um planejamento fatorial completo realiza experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis das variáveis. De um modo geral, se as combinações de  $k$  variáveis são investigadas em dois níveis, o planejamento fatorial pode ser representado por  $2^k$  experimentos, onde 2 é o número de níveis e  $k$  corresponde ao número de variáveis. É comum codificar os níveis estudados pelos sinais (+) e (-). A distribuição destes sinais aos níveis superiores ou inferiores é feita de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados <sup>87</sup>.

O número de experimentos necessário em um planejamento fatorial para 2 e 3 variáveis experimentais são mostradas na TABELA 2.1. O número de

ensaios experimentais necessários em um planejamento fatorial completo aumenta com o valor de  $k$ . Para 6 variáveis, por exemplo, têm-se  $2^6 = 64$  experimentos, para 7 variáveis têm-se  $2^7 = 128$  experimentos.

É importante a realização dos experimentos de forma aleatória, para evitar que desvios atípicos sejam obrigatoriamente associados à determinadas combinações de níveis, e a realização de experimentos em replicatas para se obter uma estimativa do erro experimental <sup>78</sup>.

Em um planejamento fatorial são investigados a influência de todas as variáveis experimentais e efeitos de interação sobre a resposta (triagem de variáveis). A observação dos efeitos de variáveis e interações entre elas é de extrema importância para entender os processos que estão sendo estudados em um determinado sistema.

Os efeitos são definidos como a mudança da resposta quando há variação do nível menor (-) para o maior (+) e podem ser classificados em efeitos principais e de interação. O efeito principal é o efeito causado por uma das variáveis quando seus níveis passam de um valor para outro. O efeito de interação é causado pela interação de variáveis e pode ser classificado de segunda, terceira ou de ordem superior, de acordo com o número de variáveis usadas no processo de otimização <sup>78</sup>.

Os sinais para os efeitos de interação de segunda ordem ou de ordem superior entre todas as variáveis do planejamento são definidos como o sinal do produto das variáveis envolvidas. Desta maneira, é possível construir as colunas de sinais para todas as interações. Em um experimento com 2 variáveis, por exemplo, o sinal de interação é definido como o produto das variáveis 1 e 2 (TABELA 2.2). Os sinais são obtidos de acordo com as regras normais de multiplicação. Usando estas regras é possível construir colunas com sinais para todas as interações nos ensaios experimentais do planejamento fatorial <sup>87</sup>.

TABELA 2.1 - Planejamento fatorial para 2 e 3 variáveis

2 variáveis			3 variáveis			
Exp.	Variáveis		Exp.	Variáveis		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-	-	1	-	-	-
2	+	-	2	+	-	-
3	-	+	3	-	+	-
4	+	+	4	+	+	-
			5	-	-	+
			6	+	-	+
			7	-	+	+
			8	+	+	+

TABELA 2.2 - Sinais dos efeitos de interação x<sub>1</sub>x<sub>2</sub>

X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>
-	-	+
+	-	-
-	+	-
+	+	+

A avaliação do planejamento pode ser feita através de análise de variância (ANOVA), que estima a significância dos efeitos principais e das interações entre as variáveis. O valor de  $p$  (probabilidade estatística) indica quando o efeito é estatisticamente significativo. Outra maneira de avaliar os resultados obtidos é através da análise do gráfico de Pareto. Neste caso, os valores absolutos dos efeitos são estimados através de barras horizontais e por uma linha vertical correspondente a um intervalo de confiança de 95%. Efeitos que apresentam valores acima desta linha de referência são considerados significativos<sup>87</sup>.

### 2.1.3 - Planejamento Doehlert

O planejamento Doehlert foi proposto em 1970 por David H. Doehlert<sup>88</sup>. É um sistema de otimização de experimentos de segunda ordem que possui seus pontos experimentais distribuídos uniformemente<sup>88-90</sup>.

A primeira aplicação do planejamento Doehlert em química analítica foi descrita em 1989 em um sistema de separação usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)<sup>91</sup>. Desde então, um crescente interesse pode ser observado na literatura.

Uma característica da matriz Doehlert é a necessidade de um número menor de experimentos para construção de superfície de resposta quando comparado com outros tipos de planejamentos, como por exemplo, o composto central, o que a torna mais eficiente.

A eficiência ( $\phi$ ) de um planejamento experimental é definida como o número de coeficientes ( $p$ ) da equação quadrática dividido pelo número de experimentos ( $N$ ). Um planejamento Doehlert com 3 variáveis ( $k = 3$ ), por exemplo, requer 13 experimentos; neste caso,  $p = 10$  e o valor de eficiência  $\phi$ , é igual a 0,77. Para um planejamento composto central com o mesmo número de variáveis ( $k = 3$ ),  $N = 15$ ,  $p = 10$ , um menor valor de eficiência é obtido ( $\phi=0,67$ )<sup>90</sup>.

Outra característica da matriz Doehlert é que o número de níveis avaliado não é o mesmo para todas as variáveis. Para um sistema com 3 variáveis, por exemplo, o número de níveis são 7, 5 e 3. Essa propriedade permite a livre escolha das variáveis que devem ser estudadas em maior ou menor nível. Diferentes critérios podem ser atribuídos como regra geral, a variável com maior efeito sobre a resposta deve ser estudada em um nível maior a fim de obter maior informação sobre o sistema estudado<sup>79</sup>.

A extensão do domínio experimental é explorada com um número de ensaios,  $N$  e é dado por:

$$N = k^2 + k + C_0$$

onde  $k$  é o número de variáveis e  $C_0$  é o número de experimentos no ponto central. Replicatas no ponto central são realizadas para validar o modelo por meio de uma estimativa da variância experimental <sup>79</sup>.

Cada planejamento Doehlert é definido considerando o número de variáveis e os valores codificados ( $C_i$ ) da matriz experimental. A relação entre os valores codificados e os valores reais é dada pela Equação 1.

$$C_i = \left( \frac{X_i - X_i^0}{\Delta X_i} \right) \alpha \quad \text{Equação 1}$$

em que o  $C_i$  corresponde ao valor codificado para o nível do fator  $i$ ;  $X_i$  é o valor experimental;  $X_i^0$  é o valor real no ponto central do domínio experimental;  $\Delta X_i$  é a distância entre o valor experimental no ponto central e o valor experimental no nível superior ou inferior; e  $\alpha$  é o maior valor limite codificado na matriz para cada variável. Para cada variável experimental ocorrerá um valor determinado de  $\alpha$ , de acordo com o número de variáveis e dos níveis para cada variável do planejamento. Para um planejamento com 3 variáveis (TABELA 2.3),  $\alpha$  é igual a 1, 0,866 e 0,817 para a primeira, a segunda e a terceira variáveis, respectivamente <sup>79</sup>.

Em um planejamento Doehlert com três variáveis, forma-se um cuboctaedro (poliedro com faces quadradas e triangulares) que pode apresentar-se apoiado na face triangular ou na face quadrada gerando diferentes projeções. A representação do cuboctaedro e sua projeção no plano  $xy$  estão mostradas na FIGURA 2.1 e as coordenadas desses pontos estão mostradas na TABELA 2.3.

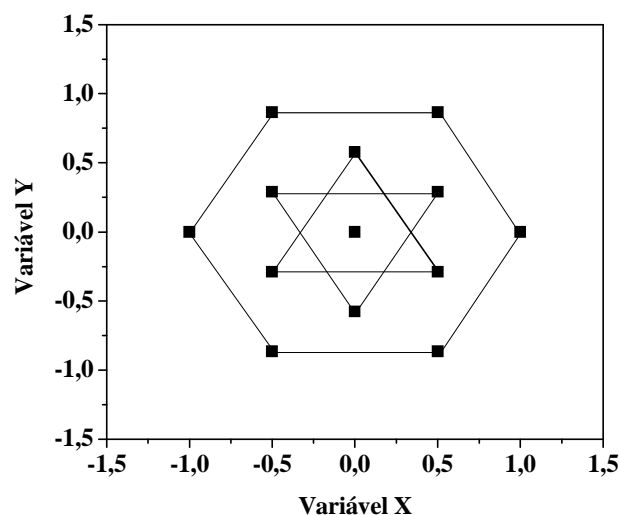


FIGURA 2.1 - Representação dos pontos experimentais de uma matriz Doehlert para otimização de três variáveis <sup>90</sup>.

TABELA 2.3 -. Matriz Doehlert para três variáveis

Variáveis experimentais – Matriz Doehlert		
3 variáveis		
X	Y	Z
1	0	0
0,5	0,866	0
0,5	0,289	0,817
-1	0	0
-0,5	-0,866	0
-0,5	-0,289	-0,817
0,5	-0,866	0
0,5	-0,289	-0,817
-0,5	0,866	0
0	0,577	-0,817
-0,5	0,289	0,817
0	-0,577	0,817
0*	0	0

\* ponto central



O modelo de segunda ordem para 3 variáveis,  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ , pode ser representado pela equação 2<sup>79,90</sup>:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad \text{Equação 2}$$

onde  $y$  é a resposta experimental que será otimizada;  $b_0$  é o termo constante;  $b_1$ ,  $b_2$  e  $b_3$  são os coeficientes dos termos lineares;  $b_{11}$ ,  $b_{22}$  e  $b_{33}$  são os coeficientes dos termos quadráticos e  $b_{12}$ ,  $b_{13}$  e  $b_{23}$  são os coeficientes de interação entre as três variáveis.

Uma revisão sobre o emprego da matriz Doehlert para otimização de métodos analíticos foi realizada por FERREIRA et al<sup>79</sup>. O trabalho inclui uma discussão sobre as vantagens desta matriz em comparação com outros modelos de superfície de resposta, como, por exemplo, o composto central e Box-Behnken, além de aplicações de matrizes Doehlert na otimização dos processos que envolvem técnicas espectroanalíticas, eletroanalíticas e cromatográficas.

## **2.1.4 - Otimização simultânea por abordagem neuro-genética**

### **2.1.4.1 - Redes neurais artificiais**

Redes neurais artificiais (do inglês, Artificial Neural Networks – ANN) são modelos computacionais projetados para simular a maneira pela qual o cérebro humano processa a informação e consistem do agrupamento de simples unidades de processamento ou neurônios<sup>92</sup>.

De maneira simplificada, um neurônio biológico pode ser descrito como um corpo celular formado pelos dendritos, que constituem um conjunto de terminais de entrada através dos quais as informações são introduzidas no

neurônio; pelo corpo central, onde ocorre o processamento dos dados, e pelos axônios, que são os terminais de saída e transmitem a informação para o neurônio consecutivo (FIGURA 2.2).

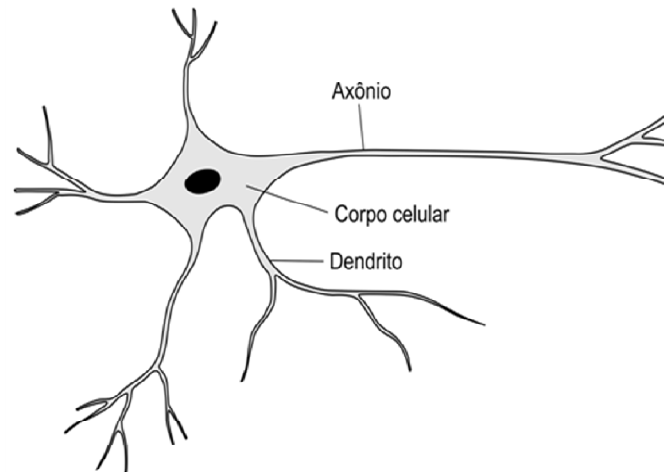


FIGURA 2.2 - Representação de um neurônio biológico

Analogamente aos neurônios biológicos, os neurônios artificiais possuem terminais de entrada, centro de processamento de dados e terminais de saída (FIGURA 2.3). A passagem do sinal de um neurônio para os dendritos de outro neurônio é chamada de sinapse. A quantidade de sinal trocado em uma sinapse depende de um parâmetro chamado de intensidade da sinapse. Em um neurônio artificial este parâmetro é simulado por um fator de ponderação chamado peso ou peso da sinapse<sup>92</sup>.

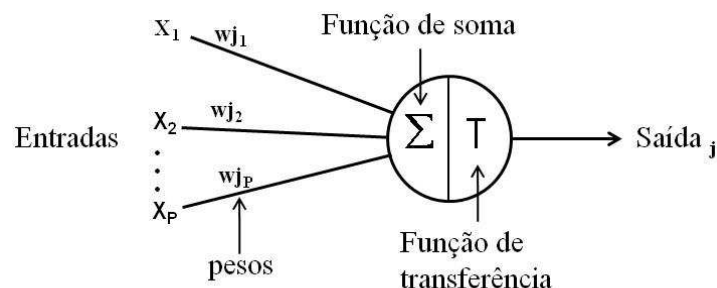


FIGURA 2.3 - Representação de uma unidade de processamento artificial.

Uma arquitetura típica de rede neural (FIGURA 2.4) é formada por uma camada de entrada, cujo número de neurônios corresponde ao número de variáveis de entrada, chamadas variáveis independentes; uma camada intermediária, onde os dados são processados; e uma camada de saída, onde o número de neurônios depende da quantidade de respostas monitoradas, também chamadas variáveis dependentes <sup>93</sup>.

Na FIGURA 2.4, pode-se observar 5 neurônios na camada de entrada, 2 neurônios na camada intermediária e 1 neurônio na camada de saída. As variáveis independentes são ponderadas por conexões entre os neurônios das camadas de entrada e intermediária. Os neurônios das camadas intermediárias recebem os sinais de entrada ponderados e executam a soma desses sinais e a projeção dessa soma em uma função de transferência.

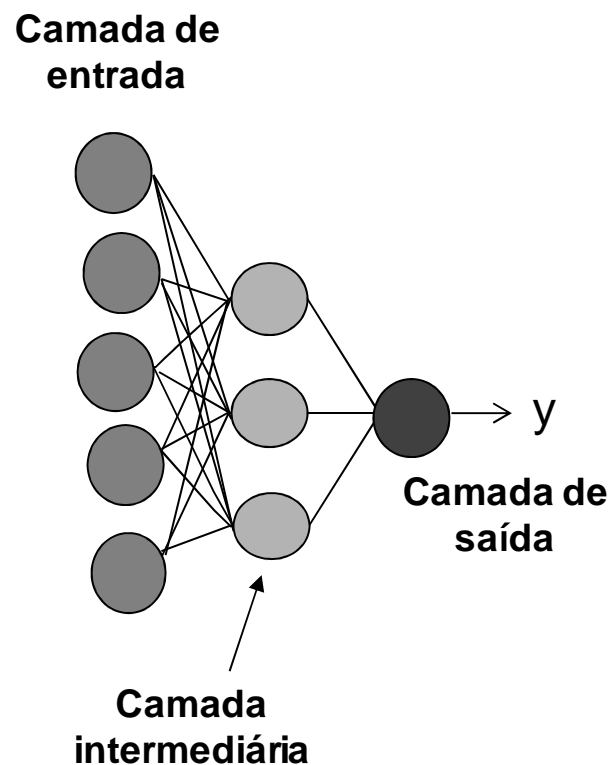


FIGURA 2.4 – Representação típica de rede neural artificial.

As redes neurais permitem estimar as relações entre uma ou mais variáveis de entrada e saída. As variáveis de entrada estão relacionadas às

medidas instrumentais e as variáveis de saída às propriedades de interesse. A informação na rede neural é distribuída entre os neurônios e suas conexões (pesos). Os pesos são correspondentes às sinapses da rede neural biológica que atuam como barreiras modeladoras dos sinais transmitidos de um neurônio pré-sináptico a um neurônio pós-sináptico. Desta maneira, podem ser considerados como modeladores para um melhor ajuste dos sinais. Esse ajuste corresponde a uma melhor relação entre os sinais de entrada e os valores de saída da rede.

O sinal de entrada no processamento de um neurônio é chamado de Net. O valor do net é calculado pela multiplicação do sinal que chega ao neurônio como peso da sinapse, como mostrado pela seguinte equação:

$$\text{Net} = \Sigma \text{ sinal de entrada} \times \text{peso}$$

De forma generalizada, para n entradas e considerando os sinais de entrada de  $x_i$  e  $w_{ij}$  o peso correspondente, o valor do net será dado por:

$$\text{Net} = \sum_{i=1}^n x_i w_{ij}$$

A saída de um neurônio é obtida em função do sinal de entrada, isto é, a saída será função do net:

$$\text{saida} = f(\text{net})$$

A função de transferência é responsável pela transformação do sinal de entrada em sinal de saída e vai depender da complexidade do sistema, podendo ser linear ou não linear. Usualmente, utiliza-se uma função de transferência não linear nos neurônios das camadas intermediárias e função de transferência linear nos neurônios da camada de saída. A função de transferência mais utilizada é a função sigmoideal que é a que mais se aproxima da saída de um neurônio biológico, e consiste da variação dos pesos até os valores de saída para que cada valor amostra seja o mais próximo possível do valor alvo. Pode-se escrever a função sigmoideal da seguinte maneira <sup>92</sup>:

$$\text{saida} = f(\text{net}) = \frac{1}{1 + e^{-(\text{net})}}$$

No final do processo, a magnitude do erro entre as respostas experimentais e previstas pelo modelo é calculada e usada para ajustar todos os pesos da rede, num processo de retropropagação dos erros (*backpropagation*) no sentido da camada de saída para a camada de entrada. Esses dois processos constituem uma iteração ou época. Em seguida, um novo processo *forward* é executado com as amostras de treinamento e os parâmetros otimizados da rede na iteração anterior. O procedimento inteiro é repetido até que a convergência seja alcançada. Isto significa que um baixo nível de erro pré-especificado ou aceitável seja alcançado, ou seja, que ocorra a minimização da função erro dada pela Equação 3<sup>93,94</sup>.

$$E = \sum_{m=1}^p \sum_{k=1}^n (y_{m,k} - \hat{y}_{m,k})^2 \quad \text{Equação 3}$$

onde  $y$  é o valor alvo ou verdadeiro;  $\hat{y}$  é o valor previsto,  $n$  é o número de experimentos do conjunto de treinamento, e  $p$  é o número de variáveis dependentes.

O treinamento da rede neural consiste em um problema de otimização, onde se procura um mínimo da superfície de resposta da função erro, em um espaço multidimensional definido pelos parâmetros ajustados da rede. É aceitável que a rede não convirja para o mínimo global, mas que convirja para um local de mínimo relativamente próximo ao mínimo absoluto e aceitável para o problema considerado.

O modelamento da rede é avaliado através do seu poder de previsão, com a apresentação de novos sinais de entrada sem a especificação dos valores de saída, previamente conhecidos pelo usuário, e a verificação do valor do erro gerado por esse conjunto de previsão.

A abordagem Bayesiana<sup>75,94,95</sup> foi proposta neste trabalho para encontrar os parâmetros da rede constituindo a rede neural artificial com regularização Bayesiana (Bayesian Regularized Artificial Neural Network - BRANN)<sup>96</sup>. Os métodos Bayesianos são complementares às redes neurais

artificiais, pois adquirem a tendência de uma rede mais flexível para obter modelos com dados complexos, além de possuírem boas propriedades de generalização quando usadas no processo de treinamento de redes neurais artificiais. São também indicadas e aplicadas em situações com número reduzido de amostras<sup>96,97</sup>.

O modelamento de rede neural artificial utilizando a abordagem Bayesiana considera todos os possíveis valores dos parâmetros da rede ponderados pela probabilidade de ocorrência de cada conjunto de pesos e somente uma resposta é obtida para o problema<sup>96</sup>.

Uma vez que as redes neurais são usadas somente para modelar o sistema, faz-se necessária a utilização de outro algoritmo para se determinar as condições experimentais ótimas. O algoritmo genético pode ser utilizado devido à sua maneira de exploração de todas as regiões do espaço experimental, implementada pela utilização dos operadores genéticos.

Os algoritmos genéticos (do inglês genetic algorithms - GA) são métodos de busca estabelecidos sobre os princípios da evolução natural formulada por Charles Darwin. São considerados algoritmos de otimização globais cuja meta é a otimização de uma dada função de resposta.

O GA é estruturado de modo que a informação relativa para um dado sistema seja codificada analogamente como um cromossomo biológico. Desta maneira, compreende um conjunto de elementos individuais, os cromossomos, que são organizados em séries de genes, onde cada gene representa uma variável a ser otimizada<sup>98,99</sup>. Os genes são codificados na forma de código binário (0,1), de acordo com o algoritmo matemático para otimização de sistemas complexos propostos por Holland<sup>100,101</sup>.

O algoritmo genético pode definir as condições ideais (máximos ou mínimos) de um modelo desenvolvido pela rede neural, gerando uma abordagem híbrida denominada neuro-genética<sup>94</sup>.

## 2.2 – Parte Experimental

### 2.2.1 - Instrumentação

Utilizou-se um sistema LIBS desenvolvido no próprio laboratório, com laser Q-Switched Nd:YAG (Brilliant, Quantel, França) operando no comprimento de onda fundamental (1064 nm), energia máxima de  $365 \pm 3$  mJ, 5 ns de duração (*full width at half maximum* – FWHM), taxa de repetição de 10 Hz e espectrômetro modelo ESA3000 (LLA Instruments, Berlin, Alemanha) com óptica Echelle e detector ICCD. O espectrômetro possibilita a aquisição de sinais do espectro de emissão na região entre 200 e 780 nm, com poder de resolução ( $\lambda/\Delta\lambda$ ) entre 10000 e 20000. A dispersão linear por pixel varia de 5 pm a 200 nm e 19 pm a 780 nm.

Os pulsos do laser foram focalizados na superfície da amostra por uma lente convergente plano-convexa de sílica fundida (2,54 cm de diâmetro e distância focal de 20 cm). A emissão do plasma foi focalizada na entrada da fibra óptica (1,5 m, 600  $\mu$ m) do espectrômetro ESA3000 utilizando-se um sistema óptico composto por lentes plano-convexas convergentes de sílica fundida com distância focal de 50 e 80 mm.

Os sinais de imagem foram digitalizados em sistema de 16 bits e processados por computador. A corrente de fundo do detector foi automaticamente subtraída. A energia dos pulsos do laser foi monitorada com um detector de energia equipado com sensor piroelétrico (FieldMax II-P Coherent, USA). A calibração dos comprimentos de onda foi feita com as linhas Hg I 253,652 nm e Zn I 213,855 nm emitidas por lâmpadas de descarga sem eletrodo (EDL II System, Perkin Elmer, Alemanha).

O esquema experimental e a foto do sistema LIBS utilizado são mostrados nas FIGURAS 2.5 e 2.6.

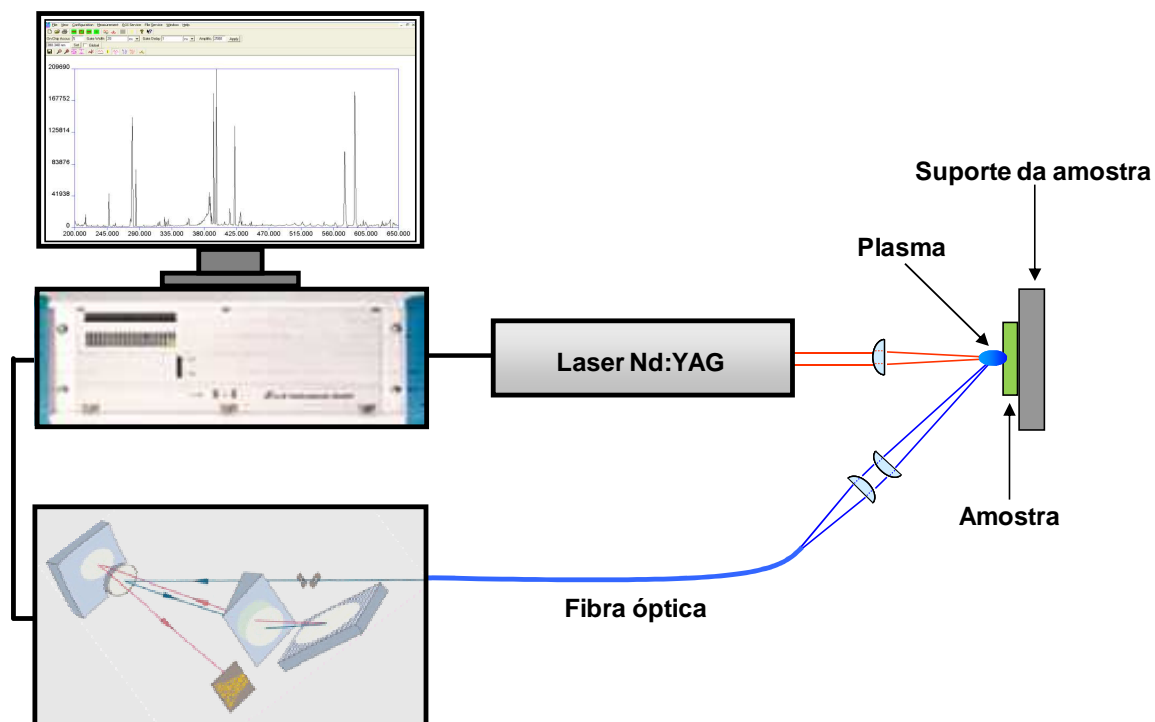


FIGURA 2.5 - Arranjo experimental utilizado.

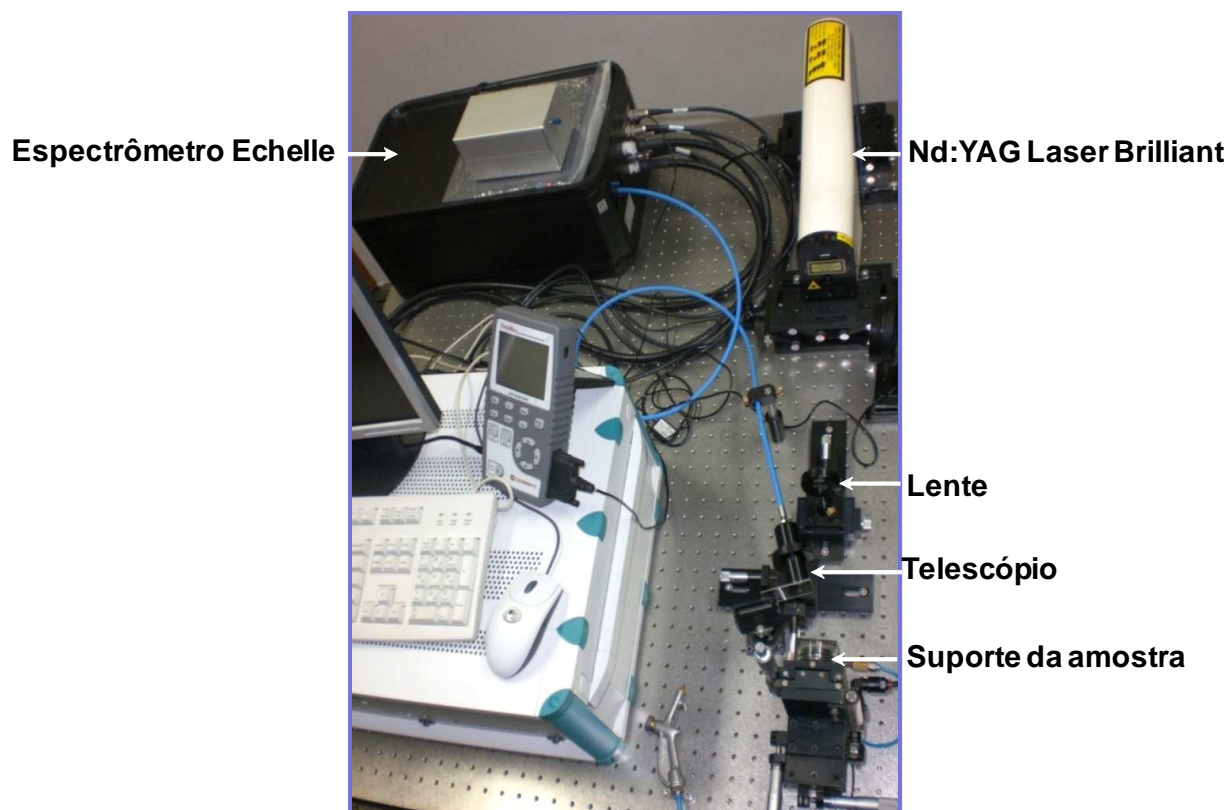


FIGURA 2.6 - Foto do sistema LIBS usado nos experimentos.



## 2.2.2 - Sinais de emissão em LIBS

O espectro obtido no sistema LIBS na região entre 200 e 780 nm é mostrado na FIGURA 2.7a em uma amostra de folhas de espinafre. Os sinais de emissão dos elementos podem ser identificados de acordo com as bases de dados do NIST<sup>102</sup> e do software do espectrômetro. Para o mesmo elemento, pode-se observar mais de um sinal de emissão (FIGURA 2.7b).

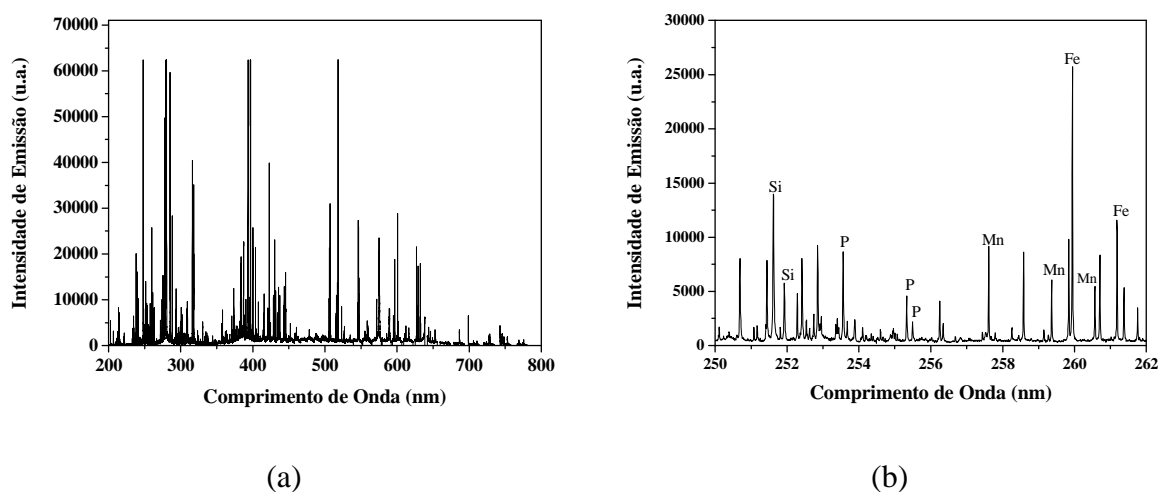


FIGURA 2.7 - Detalhes de um espectro de emissão de pastilha de folhas de espinafre (NIST 1570a), mostrando (a) o espectro no intervalo operacional do espectrômetro utilizado (200 a 780 nm) e (b) um fragmento deste espectro na região entre 250 e 262 nm.

A correção dos valores de intensidade de emissão e área de pico com relação à variação do sinal de fundo foi feita a partir da estimativa da intensidade média do sinal de fundo em duas regiões espectrais nas vizinhanças do sinal de emissão, sendo uma antes (R1) e outra depois (R2) de cada linha de emissão de interesse (FIGURA 2.8). Os valores das intensidades corrigidas das linhas de emissão correspondem à diferença entre o máximo de emissão de cada linha e o sinal do fundo correspondente, a área de pico foi obtida pelo método de integração por trapézios.

Obtiveram-se os valores de intensidade de emissão corrigida, área de pico, razão sinal/fundo (SBR) e razão sinal/ruído (SNR) de uma linha de interesse pelo programa desenvolvido em ambiente Matlab<sup>®</sup>. Com este programa, a análise de 100 espectros é feita em cerca de 1 min.

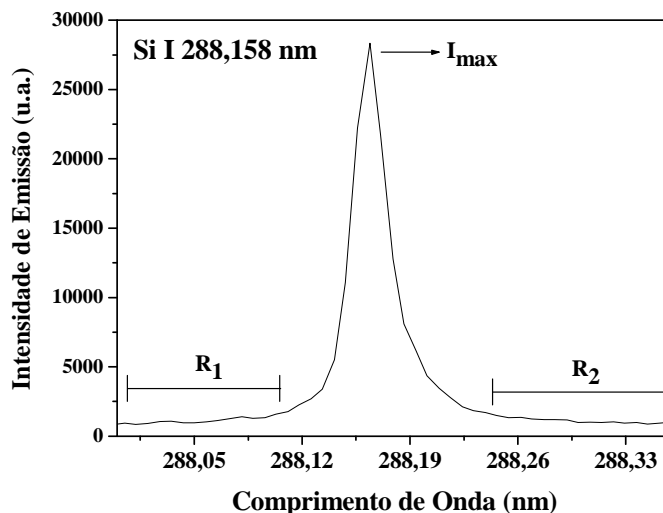


FIGURA 2.8 - Fragmento do espectro de emissão de folhas de espinafre (NIST 1570a) mostrando uma linha espectral (Si I 288,158 nm) e regiões nas vizinhanças desta linha (R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>) para a correção da emissão de fundo e para o cálculo do limite de detecção.

### 2.2.3 – Preparo das amostras

Para os procedimentos de otimização das condições experimentais do preparo das pastilhas, assim como do tipo de amostragem com o amostrador parado ou em movimento circular, utilizaram-se pastilhas de folhas de espinafre (NIST 1570a). Esse material foi escolhido por apresentar melhor distribuição de tamanho de partículas dentre os materiais disponíveis: 100% das partículas são menores que 42  $\mu\text{m}$ , com diâmetro médio de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ .

As pastilhas foram preparadas em prensa (Spex modelo 3624B X-Press) transferindo-se 0,5 g do material para recipiente apropriado e aplicando-se 8,0 ton  $\text{cm}^{-2}$  durante 5 min. Uma ilustração da sequência analítica para o preparo de pastilhas é mostrada na FIGURA 2.9.

As pastilhas, de aproximadamente 15 mm de diâmetro, foram fixadas em um porta-amostra e acoplados a um amostrador com controle manual x-y-z desenvolvido no laboratório como mostrado na FIGURA 2.10.

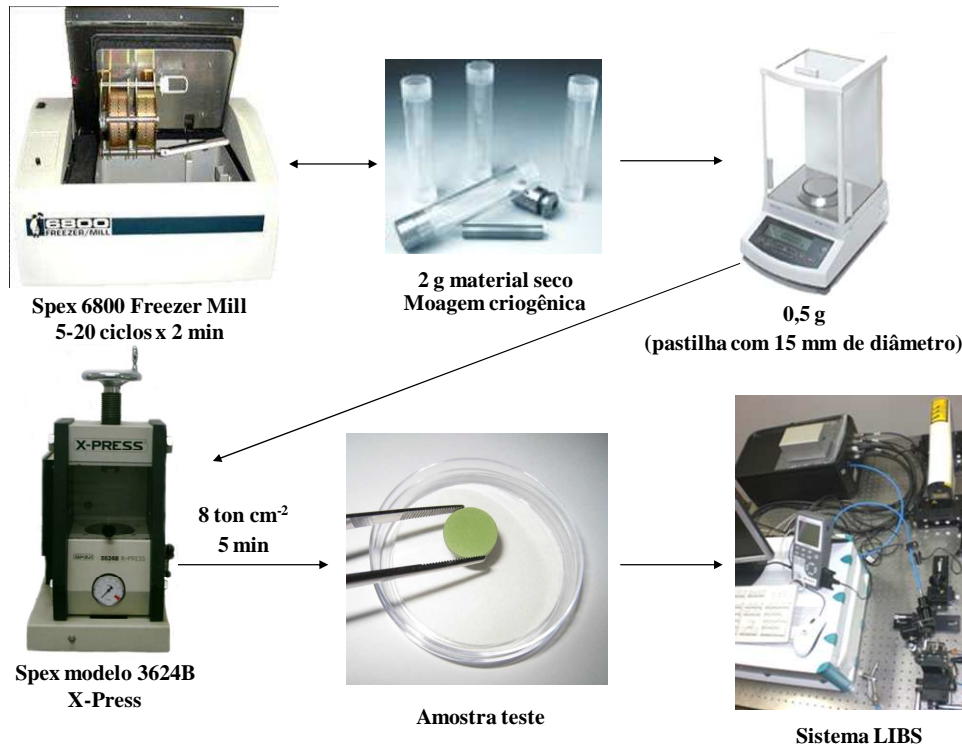


FIGURA 2.9 - Ilustração da sequência analítica para o preparo de pastilhas e análises em sistema LIBS.

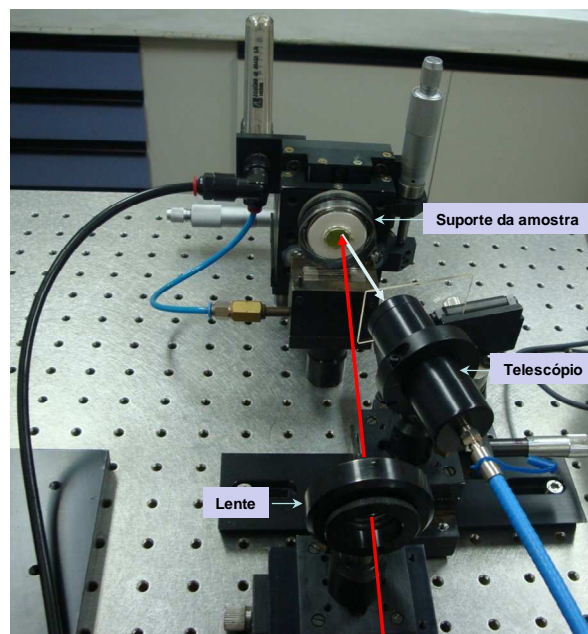


FIGURA 2.10 - Vista do sistema óptico (lente de focalização do laser, da câmara de ablação com amostra e do telescópio) do sistema LIBS.

## 2.2.4 - Otimização das condições experimentais para aquisição dos espectros LIBS.

Realizou-se um procedimento de otimização com métodos de planejamento quimiométricos, modelagem e otimização dos resultados; as variáveis selecionadas para a otimização foram:

- energia por pulso do laser ( $e_l$ )
- distância lente-amostra (LTSD)
- número de pulsos acumulados ( $n_p$ )
- tempo de atraso ( $t_{\text{atraso}}$ )
- tempo de integração do sinal ( $t_i$ )

A resposta otimizada foi a área de pico. Para o cálculo da área descontou-se o valor do sinal de emissão de fundo calculado nos lados adjacentes ao pico. Vale ressaltar que uma tentativa de otimização com a razão sinal/ruído foi avaliada, porém os dados não se ajustaram aos modelos de otimização.

Para minimizar as variações entre as medidas experimentais decorrentes da micro-heterogeneidade do analito na amostra, trabalhou-se com espectros médios. Cada espectro médio foi resultante da média de 10 espectros individuais, e cada espectro individual foi obtido em função do número de pulsos acumulados. Assim, para uma situação com 30 pulsos acumulados, cada espectro médio correspondeu à média de 10 espectros de emissão, ou seja, cada espectro médio foi resultante de 300 pulsos. Foram obtidos 3 espectros médios em cada condição experimental do planejamento fatorial completo e 1 espectro médio em cada condição do Doehlert.

Inicialmente, fez-se um planejamento fatorial completo ( $2^5$ ) explorando dois níveis, sendo um máximo (+) e um mínimo (-) de cada variável,

com o objetivo de verificar se todas as variáveis apresentavam efeitos significativos e de interação e a relevância de cada variável sobre a resposta. De acordo com o planejamento fatorial  $2^5$  foram realizados 32 ensaios experimentais. Os níveis adotados para cada ensaio experimental são mostrados na TABELA 2.4. Esses níveis foram escolhidos baseados em testes univariados. Os experimentos foram realizados de forma aleatória.

Após a definição das variáveis significativas e da ordem de relevância de cada uma sobre a resposta, realizou-se um planejamento Doehlert, com o objetivo de ajustar uma superfície de resposta que indicasse a melhor condição experimental.

Os níveis adotados pelo planejamento Doehlert para cada ensaio experimental e os respectivos valores decodificados para as variáveis experimentais são mostrados na TABELA 2.5. Os níveis codificados estão representados por  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$  e  $X_5$ . As repetições foram realizadas em torno do ponto central (ensaio experimental 31) num total de cinco repetições.

As faixas decodificadas abrangeram distâncias entre a lente e a amostra de 16 a 18,5 cm (5 níveis), número de pulsos acumulados de 10 a 30 (7 níveis), energias do laser de 50 a 130 mJ (7 níveis), tempos de atraso de 2 a 4  $\mu$ s (7 níveis) e tempos de integração de 3 a 8  $\mu$ s (3 níveis). As variáveis consideradas mais significativas ou que se desejava obter maiores informações acerca de suas variações no espaço experimental estudado foram avaliadas em um número maior de níveis. Calcularam-se os efeitos para cada elemento e construíram-se os modelos de regressão linear múltipla (Multiple Linear Regression - MLR) individuais, ao nível de 95% de probabilidade, com o programa Statistic 7.0.

Para a aquisição e tratamento dos dados utilizaram-se software ESAWIN, banco de dados NIST e algoritmo desenvolvido em ambiente MATLAB<sup>®</sup> versão 7.0 (MathWorks, Inc., Natick, E.U.A.).

TABELA 2.4 - Planejamento fatorial completo para cinco variáveis estudadas no sistema LIBS com laser de Nd:YAG@1064 nm e espectrômetro LLA para determinação de Al, B, Ca, Cu, Fe, K, P, Mn, Mg, Si e Zn em pastilhas de tecido vegetal.

Exp.	Tempo de atraso ( $\mu\text{s}$ )	Tempo de integração ( $\mu\text{s}$ )	Energia do laser (mJ)	Número de pulsos	LTSD (cm)	
	1	2	3	4	5	
1	-1	-1	-1	-1	-1	
2	1	-1	-1	-1	-1	
3	-1	1	-1	-1	-1	
4	1	1	-1	-1	-1	
5	-1	-1	1	-1	-1	
6	1	-1	1	-1	-1	
7	-1	1	1	-1	-1	
8	1	1	1	-1	-1	
9	-1	-1	-1	1	-1	
10	1	-1	-1	1	-1	
11	-1	1	-1	1	-1	
12	1	1	-1	1	-1	
13	-1	-1	1	1	-1	
14	1	-1	1	1	-1	
15	-1	1	1	1	-1	
16	1	1	1	1	-1	
17	-1	-1	-1	-1	1	
18	1	-1	-1	-1	1	
19	-1	1	-1	-1	1	
20	1	1	-1	-1	1	
21	-1	-1	1	-1	1	
22	1	-1	1	-1	1	
23	-1	1	1	-1	1	
24	1	1	1	-1	1	
25	-1	-1	-1	1	1	
26	1	-1	-1	1	1	
27	-1	1	-1	1	1	
28	1	1	-1	1	1	
29	-1	-1	1	1	1	
30	1	-1	1	1	1	
31	-1	1	1	1	1	
32	1	1	1	1	1	
Legenda	(- 1)	2	3	100	10	16,5
	(1)	4	7	250	30	18

TABELA 2.5 - Matriz Doehlert para cinco variáveis estudadas no sistema LIBS com laser de Nd:YAG@1064 nm e espectrômetro LLA para determinação de Al, B, Ca, Cu, Fe, K, P, Mn, Mg, Si e Zn em pastilhas de tecido vegetal.

Exp.	Matriz Doehlert					Planejamento Experimental				
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	LTSD (cm)	n <sub>p</sub>	e <sub>l</sub> (mJ)	t <sub>delay</sub> (μs)	t <sub>int</sub> (μs)
1	1	0	0	0	0	18,5	20	90	3	5,5
2	0,5	0,866	0	0	0	17,9	30	90	3	5,5
3	0,5	0,289	0,817	0	0	17,9	23	130	3	5,5
4	0,5	0,289	0,204	0,791	0	17,9	23	100	4	5,5
5	0,5	0,289	0,204	0,158	0,775	17,9	23	100	3,2	8
6	-1	0	0	0	0	16	20	90	3	5,5
7	-0,5	-0,866	0	0	0	16,6	10	90	3	5,5
8	-0,5	-0,289	-0,817	0	0	16,6	17	50	3	5,5
9	-0,5	-0,289	-0,204	-0,791	0	16,6	17	80	2	5,5
10	-0,5	-0,866	-0,204	-0,158	-0,775	16,6	10	80	2,8	3
11	0,5	-0,289	0	0	0	17,9	17	90	3	5,5
12	0,5	-0,289	-0,817	0	0	17,9	17	50	3	5,5
13	0,5	-0,289	-0,204	-0,791	0	17,9	17	80	2	5,5
14	0,5	-0,289	-0,204	-0,158	-0,775	17,9	17	80	2,8	3
15	-0,5	0,866	0	0	0	16,6	30	90	3	5,5
16	0	0,577	-0,817	0	0	17,3	27	50	3	5,5
17	0	0,577	-0,204	-0,791	0	17,3	27	80	2	5,5
18	0	0,577	-0,204	-0,158	-0,775	17,3	27	80	2,8	3
19	-0,5	0,289	0,817	0	0	16,6	23	130	3	5,5
20	0	-0,577	0,817	0	0	17,3	13	130	3	5,5
21	0	0	0,613	-0,791	0	17,3	20	120	2	5,5
22	0	0	0,613	-0,158	-0,775	17,3	20	120	2,8	3
23	-0,5	0,289	0,204	0,791	0	16,6	23	100	4	5,5
24	0	-0,577	0,204	0,791	0	17,3	13	100	4	5,5
25	0	0	-0,613	0,791	0	17,3	20	60	4	5,5
26	0	0	0	0,633	-0,775	17,3	20	90	3,8	3
27	-0,5	0,289	0,204	0,158	0,775	16,6	23	100	3,2	8
28	0	-0,577	0,204	0,158	0,775	17,3	13	100	3,2	8
29	0	0	-0,613	0,158	0,775	17,3	20	60	3,2	8
30	0	0	0	-0,633	0,775	17,3	20	90	2,2	8
31*	0	0	0	0	0	17,3	20	90	3	5,5

\* Ponto central com cinco replicatas.

A fim de explorar a possibilidade de obtenção de um modelo que determinasse simultaneamente os valores de área de todos os elementos, utilizaram-se redes neurais artificiais com multicamadas de percéptrons e regularização Bayesiana (BRANN)<sup>96,103</sup>. A rede BRANN foi aplicada com função de transferência tangente-sigmoidal na camada intermediária e função linear na camada de saída, utilizando-se cinco neurônios na camada de entrada (correspondentes às cinco variáveis) e onze neurônios na camada de saída (equivalentes aos onze elementos), como ilustrado na FIGURA 2.11.

Os cálculos foram executados no software Matlab 6.5 (The MathWorks, Natick, MA), utilizando a rotina de redes neurais do Neural Network Toolbox 4.0 (The MathWorks)<sup>103</sup>.

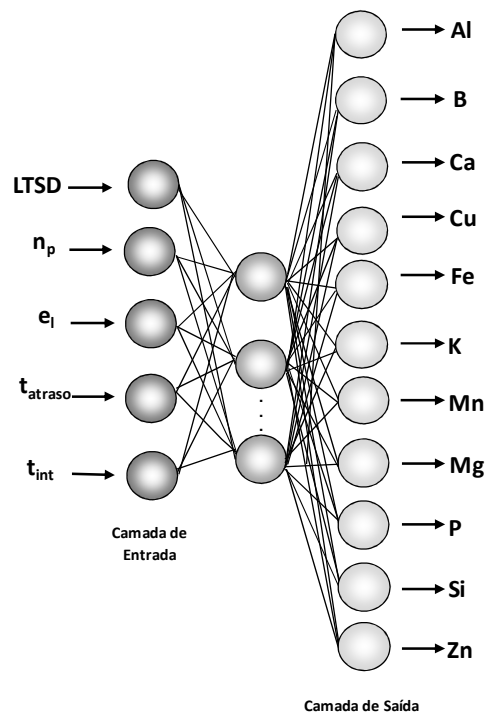


FIGURA 2.11 - Estrutura da rede neural artificial com cinco neurônios na camada de entrada e 11 neurônios na camada de saída.



Realizou-se a otimização da arquitetura da rede Bayesiana variando-se o número de neurônios na camada intermediária de 1 a 15, com cinco replicatas para cada arquitetura de rede gerada.

Após a modelagem dos dados com a rede neural Bayesiana, utilizou-se uma rotina com o algoritmo genético de HOUCK et al.<sup>104</sup>. O modelamento também foi executado no software Matlab 6.5, a fim de otimizar os parâmetros operacionais dos sistemas LIBS, pelo procedimento neuro-genético. Neste estudo, a rotina do algoritmo genético demanda uma função a ser otimizada pelo algoritmo. Assim, foi aplicada uma função de minimização de perda ( $\varphi$ )<sup>75,94,105</sup>, calculada pela soma dos desvios relativos ponderados, como apresentado na Equação 4.

$$\varphi = \sum_{i=1}^m w_i \left[ \frac{Q(x_1, x_2, \dots, x_n) - Q^*}{Q^*} \right]^2 \quad \text{Equação 4}$$

onde

$m$  é o número de objetivos, ou seja, o número de elementos;

$w_i$  é o fator peso, com  $i = 1, 2, \dots, m$ ;

$Q(x_1, x_2, \dots, x_n)$  é a função objetivo;

$n$  indica o número de variáveis independentes, ou seja, as variáveis experimentais,

$Q^*$  é o valor ótimo individual da função objetivo, definido como a área máxima de pico possível para cada elemento no sistema estudado.

O algoritmo genético busca os valores ótimos das condições experimentais através da minimização da função de perda ( $\varphi$ ). Com este método, buscou-se um procedimento de otimização simultânea para alcançar uma condição experimental na qual se observasse o máximo dos sinais de intensidade de emissão para todos os elementos, concomitantemente.

No algoritmo, as variáveis operacionais (LTSD,  $n_p$ ,  $e_l$ ,  $t_{atraso}$ ,  $t_{int}$ ) foram codificadas a fim de que cada uma delas fosse apresentada como um gene em um número binário (16 bits de resolução) como mostrado na FIGURA 2.12.

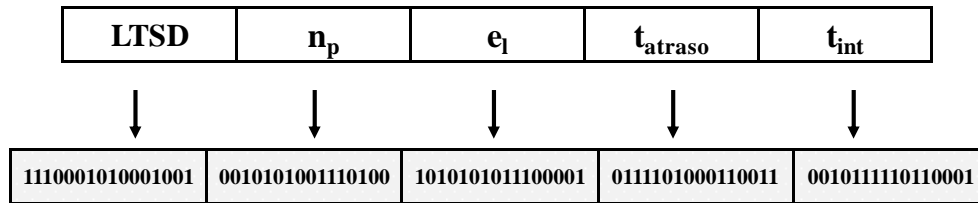


FIGURA 2.12 - Codificação hipotética de cada variável experimental no algoritmo genético.

A população no algoritmo genético foi de 100 indivíduos. Para a evolução, a probabilidade de dois cromossomos realizarem cruzamento inteiramente casualizado foi de 90 % e a probabilidade de mutação foi 1%. A evolução foi feita até que  $\varphi \leq 10^{-3}$  ou alcançasse 100 gerações. Após a codificação dos parâmetros de entrada e definição dos parâmetros de controle, o algoritmo genético foi repetido 10 vezes com diferentes populações iniciais, escolhendo-se, então, as variáveis do cromossomo que geraram o menor valor da função de minimização de perda  $\varphi$ .

### 2.2.5 - Otimização das condições para o preparo das pastilhas.

Para as análises no sistema LIBS, as amostras de folhas de tecidos vegetais devem ser previamente moídas criogenicamente, visando ao controle da homogeneização e da distribuição do tamanho das partículas e, posteriormente, à utilização deste material moído para a confecção de pastilhas (amostras-teste). O preparo adequado das pastilhas minimiza variações significativas na densidade, porosidade e rugosidade das mesmas.

Nesta etapa do trabalho, utilizou-se como amostra o material certificado NIST 1570a. As seguintes variáveis foram selecionadas:

- a pressão sobre a pastilha
- tempo de pressão e
- o tipo de amostragem (amostrador parado e em movimento circular)

As duas primeiras variáveis estão relacionadas ao preparo das pastilhas. Desenvolveu-se um procedimento de otimização com planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) explorando um nível máximo e mínimo para cada variável, sendo realizados 8 ensaios experimentais. Os níveis adotados para cada ensaio experimental são mostrados na TABELA 2.6.

Obtiveram-se 3 espectros médios em cada condição experimental. Cada espectro médio foi resultante da média de 10 espectros individuais, e cada espectro individual foi obtido com 25 pulsos acumulados (a acumulação de pulsos é feita automaticamente durante a aquisição dos sinais).

A condição experimental utilizada para obtenção dos espectros foi estabelecida de acordo com o procedimento de otimização neuro-genético para determinar macronutrientes (P, K, Ca e Mg), micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn), além de Al e Si nas pastilhas de tecidos vegetais. A seguinte condição otimizada foi obtida: 110 mJ/pulso; 17,5 cm de distância lente-amostra; 25 pulsos acumulados, 2,0  $\mu$ s de atraso e 4,5  $\mu$ s de integração.

Realizou-se a otimização das condições para preparo da pastilha e para aquisição dos espectros LIBS em tecidos vegetais com o objetivo de obter o máximo valor de área para cada elemento e, também, para todos os elementos simultaneamente usando a função multiresposta (MR).

A MR foi calculada pela seguinte expressão:

$$(MR) = S_{Al}/34893 + S_B/14425 + S_{Ca}/24980 + S_{Cu}/3369 + S_{Fe}/86868 + S_K/11523 + S_{Mg}/191880 + S_{Mn}/48887 + S_P/39183 + S_{Si}/105020 + S_{Zn}/8851$$

onde  $S_{Al}$ ,  $S_B$ ,  $S_{Ca}$ ,  $S_{Cu}$ ,  $S_{Fe}$ ,  $S_K$ ,  $S_{Mg}$ ,  $S_{Mn}$ ,  $S_P$ ,  $S_{Si}$ , e  $S_{Zn}$  são sinais analíticos de cada elemento e os denominadores 34893, 14425, 24980, 3369, 86868, 11523, 191880, 48887, 39183, 105020, e 8851 são os valores máximos de áreas obtidas para Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Si e Zn, respectivamente. Avaliou-se o efeito para cada elemento e para os dados normalizados.

TABELA 2.6 - Matriz do planejamento fatorial para otimização das condições para preparo das pastilhas de tecidos vegetais e para análises por LIBS com laser de Nd:YAG (1064 nm) e espectrômetro com óptica Echelle acoplado com ICCD (LLA).

Experimento	Pressão (ton/cm <sup>2</sup> )	Tempo de Pressão (min.)	Amostragem
	1	2	3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
Legenda	(-1)	8	Parada
	(1)	15	Rodando

## 2.3 - Resultados e Discussão

### 2.3.1 - Planejamento fatorial completo

No planejamento fatorial utilizou-se uma linha de emissão para cada elemento. Para a seleção da linha de emissão, considerou-se a maior área de pico e o menor coeficiente de variação em cada ensaio experimental do planejamento fatorial (FIGURAS 2.13 a 2.18).

Observou-se saturação do sinal para a maioria das linhas de Ca e Mg nos espectros de emissão em alguns pontos do planejamento fatorial. Por exemplo, a linha de Ca 422,673 nm saturou nos experimentos 13, 15, 21, 29 e 31, enquanto a linha de Mg 277,983 nm apresentou saturação nos experimentos 13, 29 e 31. Essa restrição possibilitou a utilização de apenas uma linha para Al, Ca e Mg.

Os comprimentos de onda selecionados para a etapa de otimização para cada elemento foram: P I 214,914 nm; K I 404,414 nm, Ca I 527,02 nm; Mg I 277,669 nm; Mn II 257,610 nm; Fe II 259,940 nm; Cu I 324,755; Zn I 213,855 nm; B II 249,772 nm; Al I 309,271 nm e Si I 288,161 nm.

Avaliaram-se os efeitos de cada variável a partir do planejamento fatorial. Os valores em módulo dos efeitos principais e secundários podem ser visualizados nos gráficos de Pareto (FIGURAS 2.19 e 2.20). A partir desses resultados selecionaram-se as variáveis estatisticamente significativas, ao nível de 95% de confiança, definido pela linha vertical tracejada.

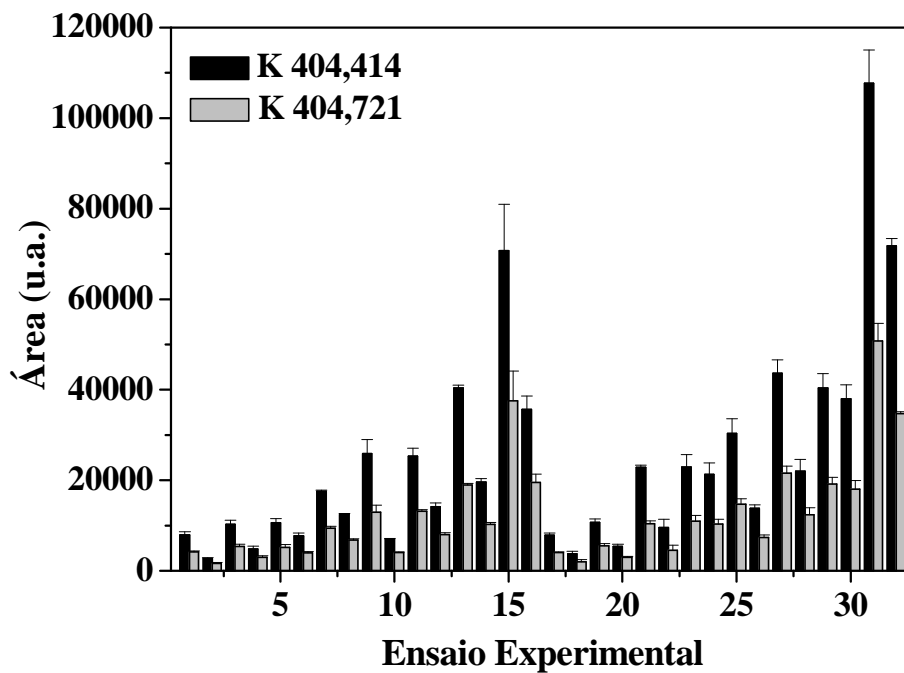
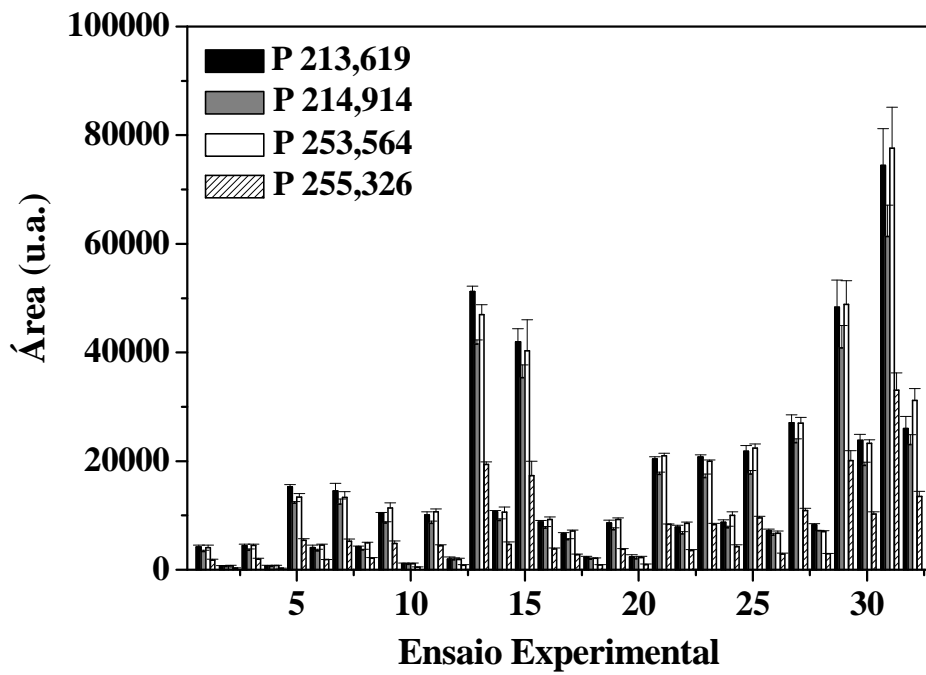


FIGURA 2.13 - Intensidades das áreas dos picos de emissão obtidos nas condições do planejamento fatorial para P e K em diferentes comprimentos de onda.

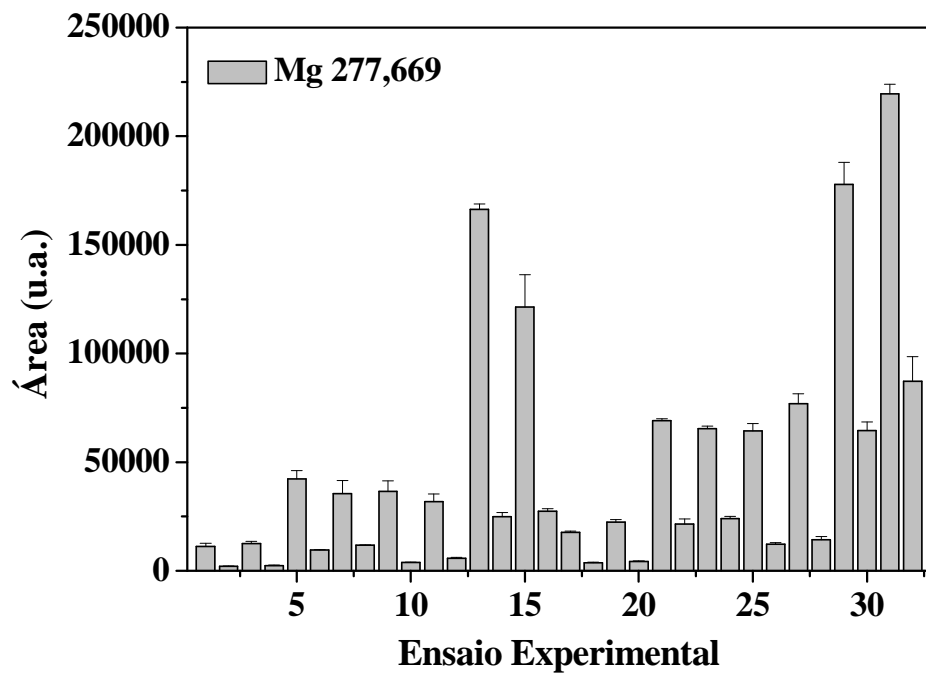
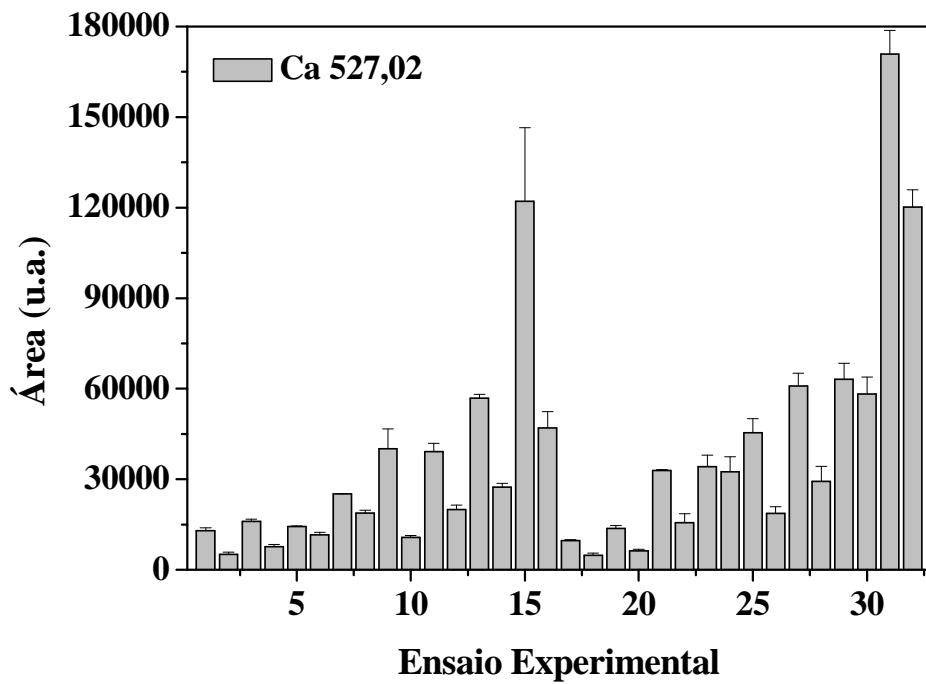


FIGURA 2.14 - Intensidades das áreas dos picos de emissão obtidos nas condições do planejamento fatorial para Ca e Mg em diferentes comprimentos de onda.

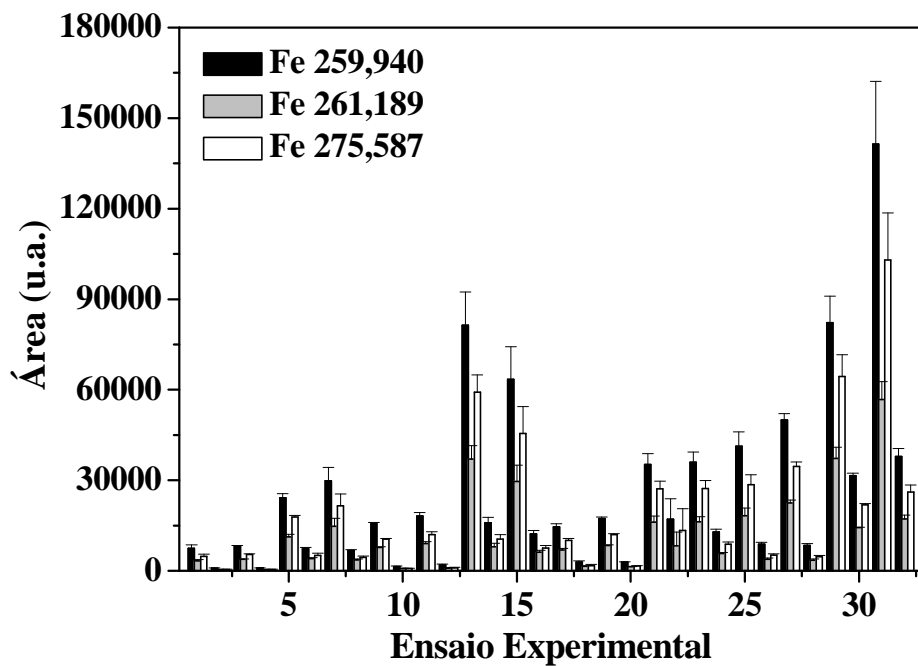
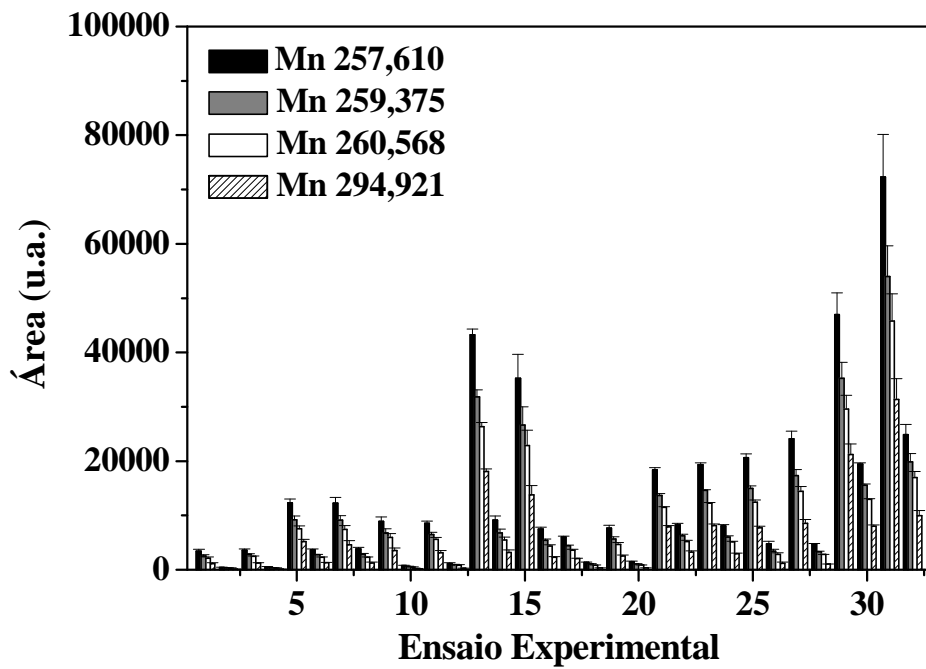


FIGURA 2.15 - Intensidades das áreas dos picos de emissão obtidos nas condições do planejamento fatorial para Mn e Fe em diferentes comprimentos de onda.



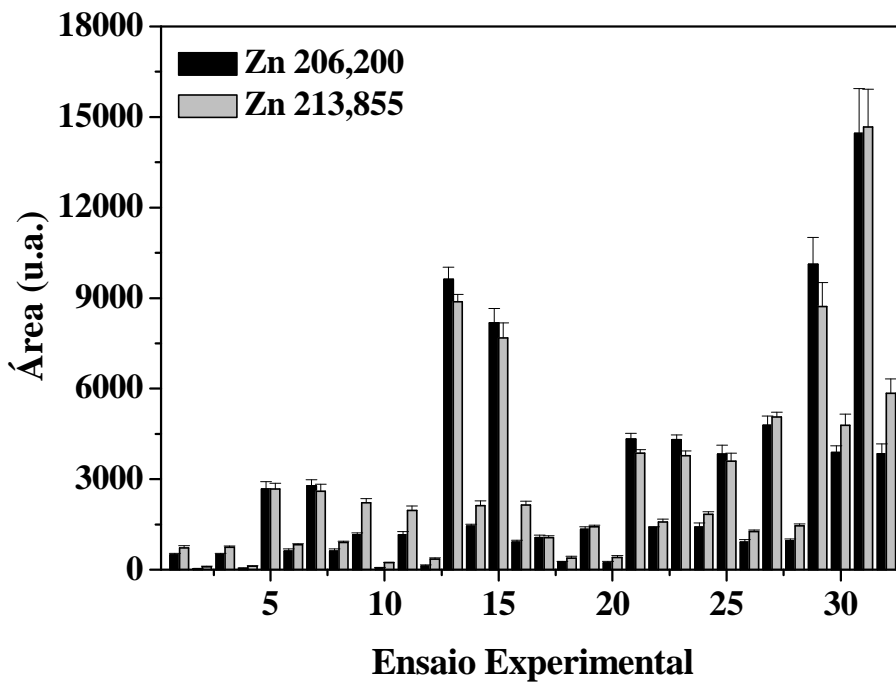
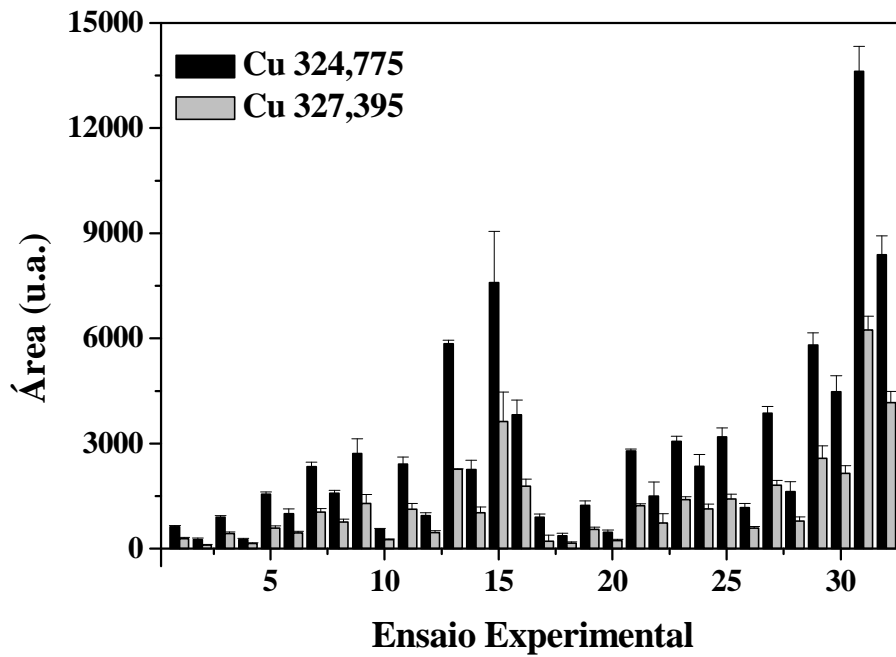


FIGURA 2.16 - Intensidades das áreas dos picos de emissão obtidos nas condições do planejamento fatorial para Cu e Zn em diferentes comprimentos de onda.

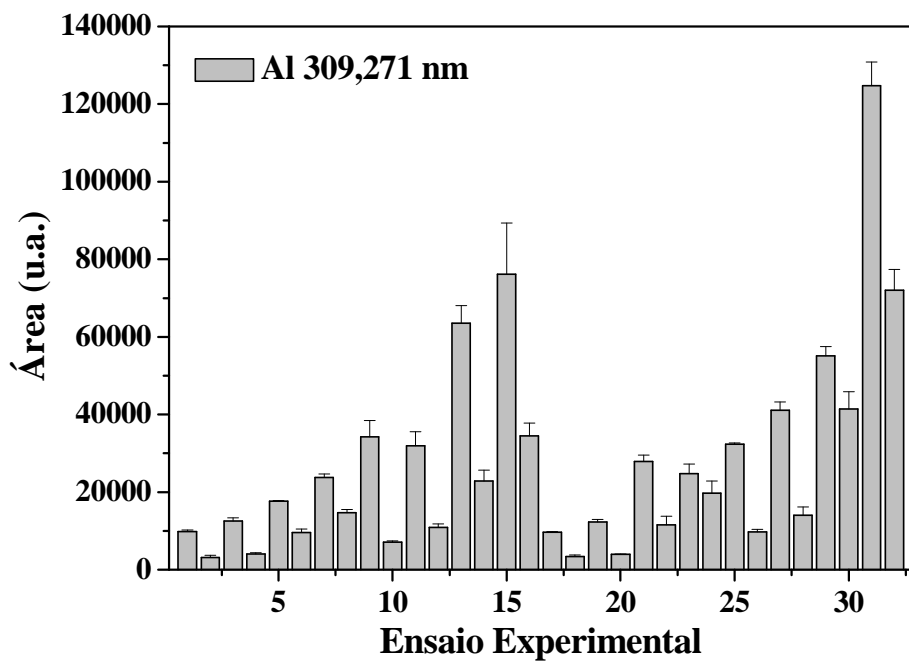
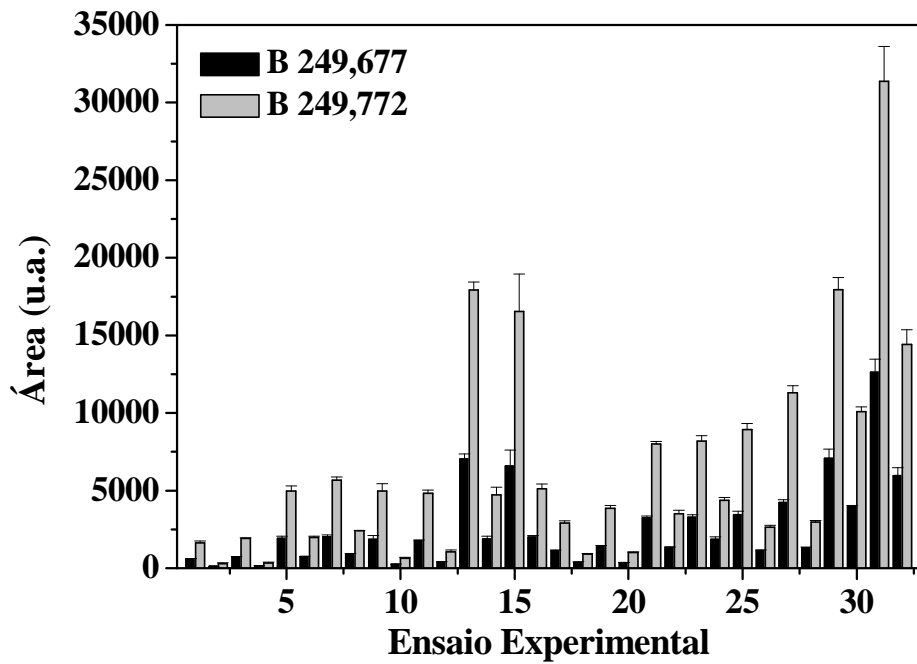


FIGURA 2.17 - Intensidades das áreas dos picos de emissão obtidos nas condições do planejamento fatorial para B e Al em diferentes comprimentos de onda.

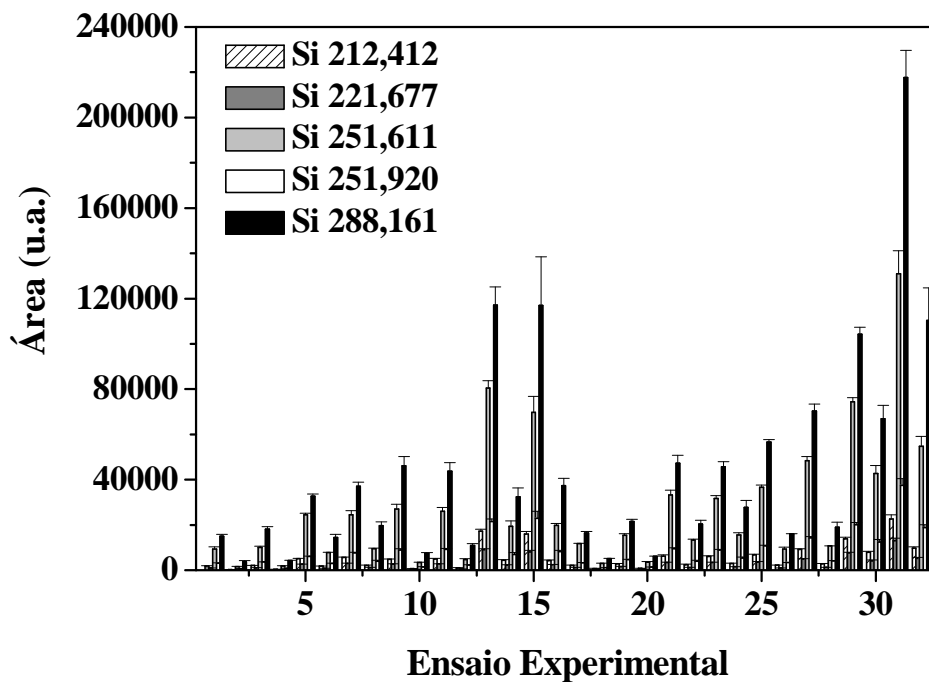


FIGURA 2.18 - Intensidades das áreas dos picos de emissão obtidos nas condições do planejamento fatorial para Si em diferentes comprimentos de onda.

Pelos resultados apresentados nos gráficos de Pareto, pode-se verificar que, de maneira geral, as variáveis número de pulsos, energia do laser e tempo de atraso apresentaram efeitos mais significativos, seguidas pelas variáveis distância lente-amostra e tempo de integração. Para todos os elementos, o tempo de atraso apresentou efeito negativo, o que indica que para menores valores desta variável a resposta é maior.

Tempos de atraso menores que  $1 \mu\text{s}$  poderiam ser utilizados, entretanto, quanto menor o tempo de atraso maior a contribuição do contínuo de emissão. Com o compromisso de obter maior sinal de emissão e menor contínuo de emissão, testes preliminares indicaram que os espectros deveriam ser adquiridos a partir de  $1 \mu\text{s}$  de tempo de atraso.

Pode-se observar, também, efeitos de interação significativos, o que é uma indicação de que resultados de uma otimização univariada não seriam tão

efetivos, justificando a necessidade da utilização de planejamentos experimentais que avaliem todas as variáveis simultaneamente. Desta maneira, as cinco variáveis foram consideradas no processo de otimização empregando a matriz Doehlert.

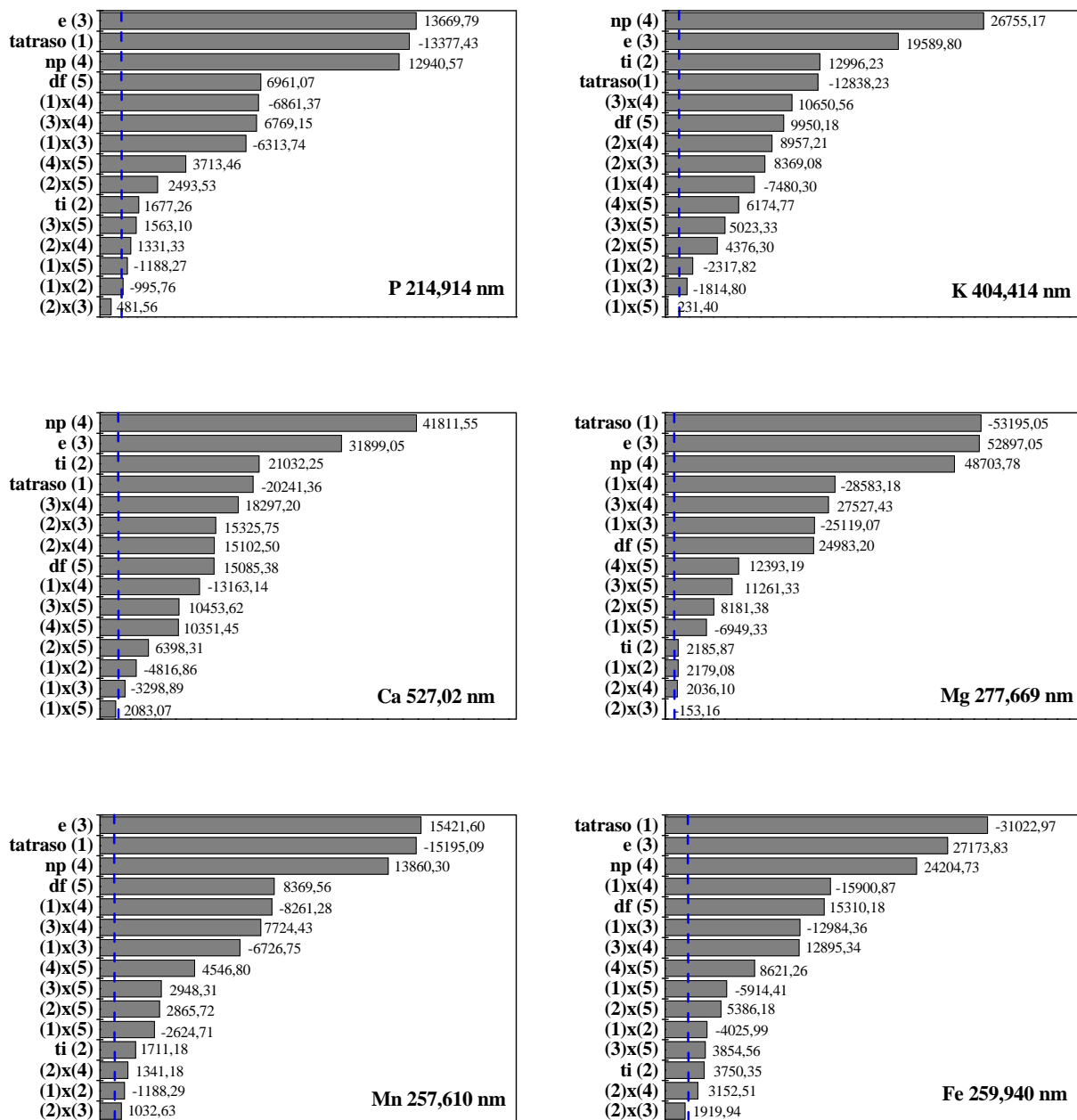


FIGURA 2.19 - Gráficos de Pareto do planejamento fatorial completo para P, K, Ca, Mg, Mn e Fe. Variáveis: [1] Tempo de atraso ( $\mu$ s), [2] Tempo de integração ( $\mu$ s), [3] Energia (mJ), [4] Número de pulsos e [5] LTSD.

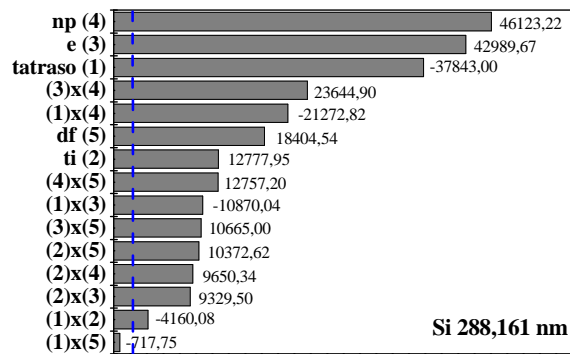
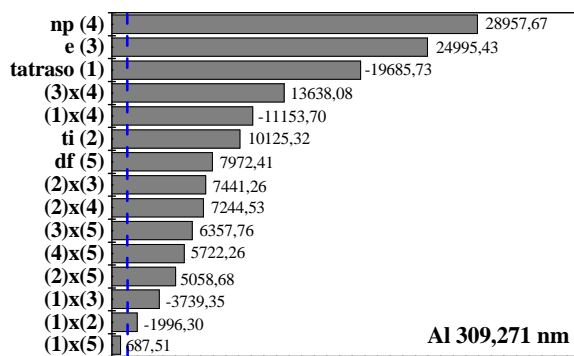
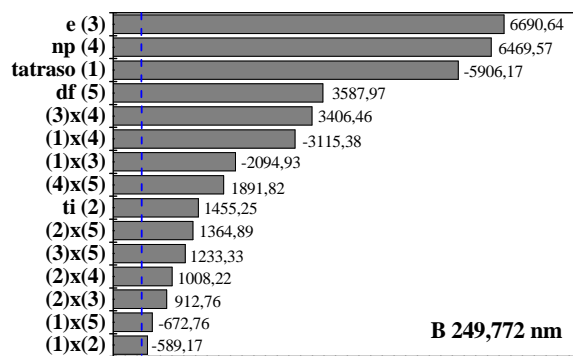
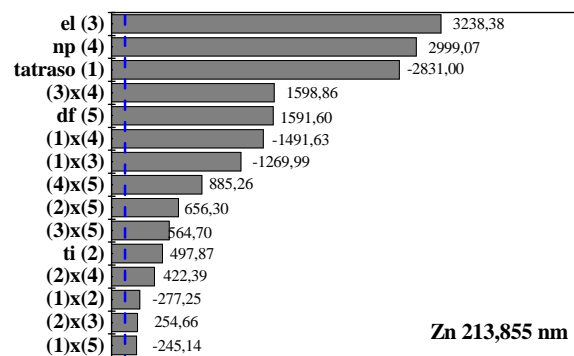
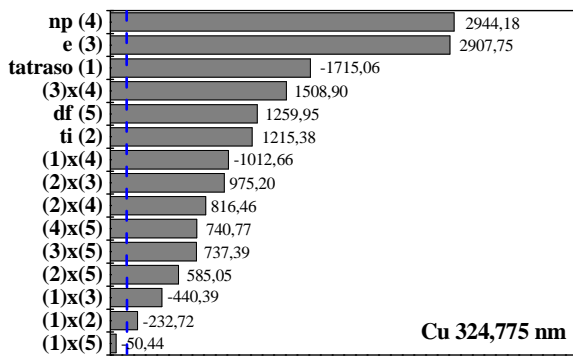


FIGURA 2.20 - Gráficos de Pareto do planejamento fatorial completo para Cu, Zn, B, Al e Si. Variáveis: [1] Tempo de atraso ( $\mu\text{s}$ ), [2] Tempo de integração ( $\mu\text{s}$ ), [3] Energia (mJ), [4] Número de pulsos e [5] LTSD.

### 2.3.2 - Planejamento Doehlert

Uma característica do planejamento Doehlert é que o número de níveis não é o mesmo para todas as variáveis. Esta propriedade permite a escolha de quais serão avaliadas em um número maior ou menor de níveis.

Selecionaram-se os níveis de cada variável a partir dos resultados apresentados no planejamento fatorial completo. A variável distância lente amostra foi estudada em 5 níveis, número de pulsos, energia do pulso do laser e tempo de atraso em 7 níveis e tempo de integração em 3 níveis (TABELA 2.5).

Os resultados do planejamento fatorial indicaram que o número de pulsos, a energia do laser, o tempo de integração e a distância lente-amostra deveriam ser aumentados e o tempo de atraso deveria ser diminuído. Para tentar minimizar os efeitos de saturação observados nas linhas de emissão de Ca e Mg em algumas condições experimentais, mantiveram-se os intervalos estudados para o tempo de atraso (2 a 4  $\mu$ s) e para o número de pulsos (10 a 30) e diminuiu-se o intervalo da energia do laser (50 a 130 mJ/pulso). Essa estratégia possibilitou avaliar linhas de emissão alternativas (Ca I 315,887 nm e Mg II 277,983), que apresentam melhor sensibilidade quando comparadas às linhas estudadas no planejamento fatorial.

As áreas de pico obtidas para os elementos em cada ponto experimental Doehlert são mostradas nas FIGURAS 2.21 e 2.22. Os ensaios experimentais de 31 a 35 representam as repetições no ponto central, pode-se observar uma razoável repetibilidade (coeficientes de variação de 5 a 20%) com os valores obtidos.

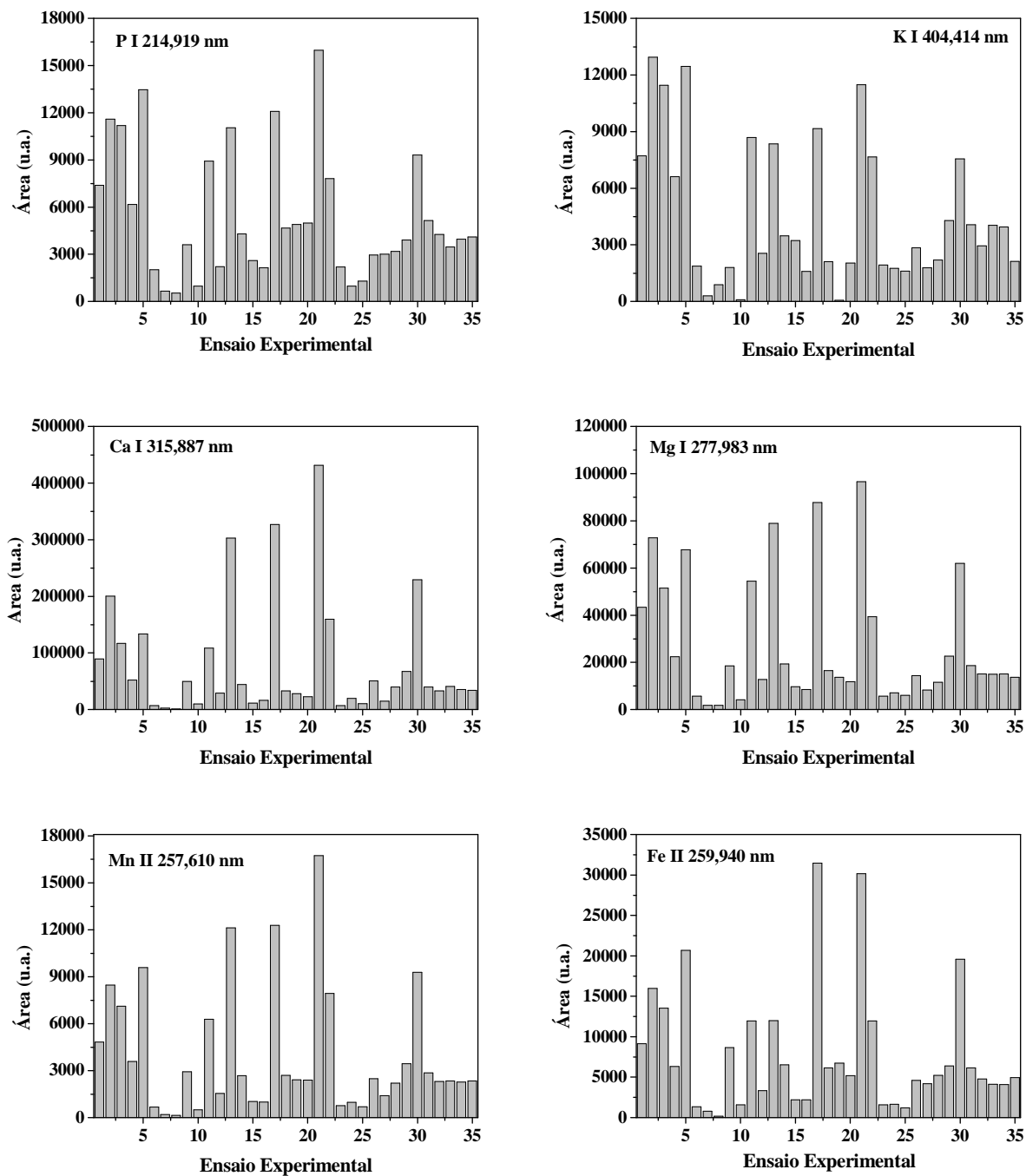


FIGURA 2.21 - Intensidades das áreas dos picos de emissão de Al, B, Ca, Cu, Fe e K em cada ensaio experimental do planejamento Doehlert

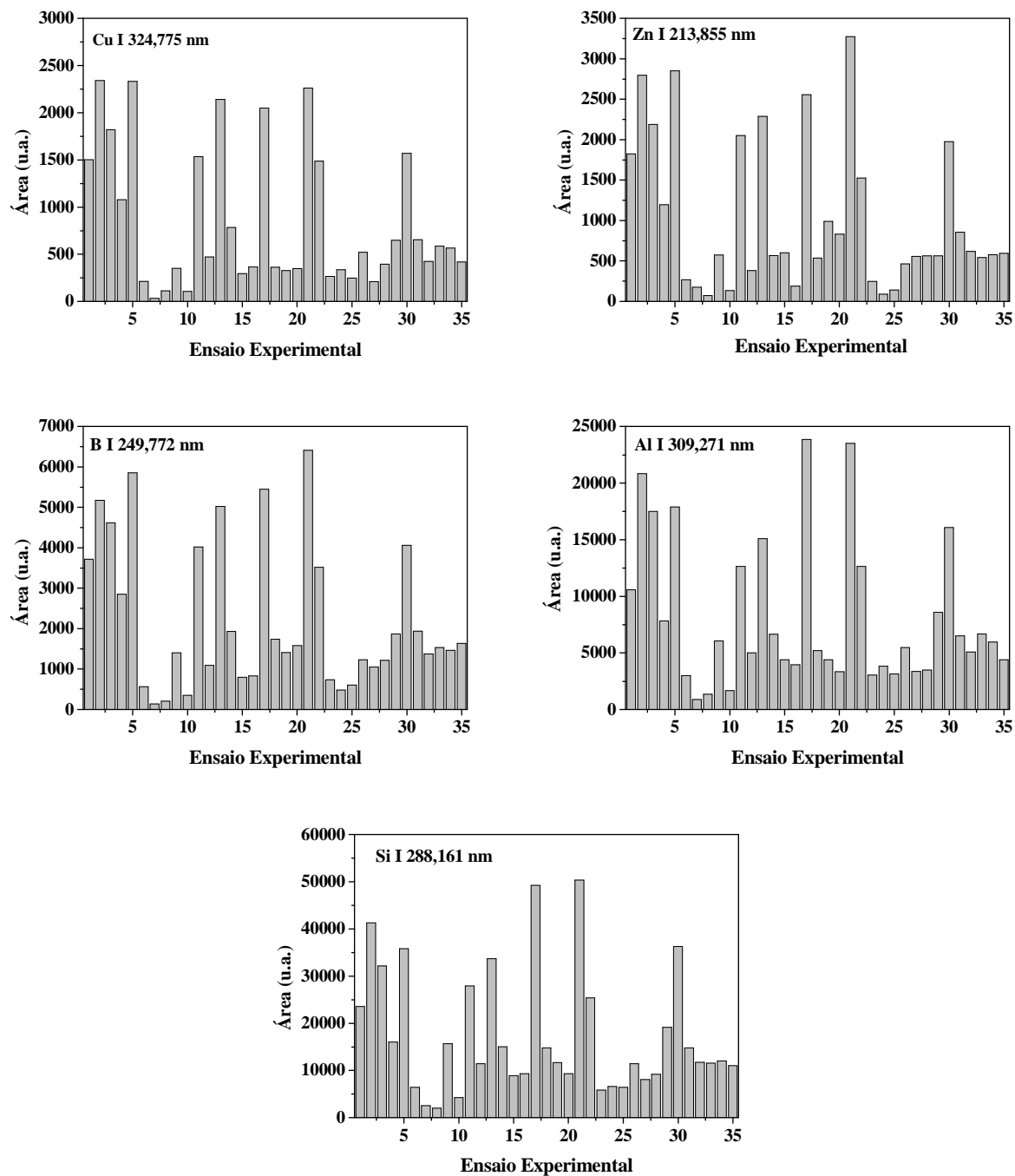


FIGURA 2.22 - Intensidades das áreas dos picos de emissão de Mg, Mn, P, Si e Zn em cada ensaio experimental do planejamento Doehlert.



A matriz Doehlert é um tipo de planejamento que permite a obtenção de um modelo quadrático. Para cada elemento foi estabelecido um modelo de regressão linear múltipla (MLR). De forma genérica, o modelo de regressão pode ser representado pela Equação 5:

$$z = b_0 + b_1d + b_2n_p + b_3e_1 + b_4t_{\text{delay}} + b_5t_{\text{int}} + b_{11}d^2 + b_{22}n_p^2 + b_{33}e_1^2 + b_{44}t_{\text{delay}}^2 + b_{55}t_{\text{int}}^2 + b_{12}dn_p + b_{13}de_1 + b_{14}dt_{\text{delay}} + b_{15}dt_{\text{int}} + b_{23}n_p e_1 + b_{24}n_p t_{\text{delay}} + b_{25}n_p t_{\text{int}} + b_{34}e_1 t_{\text{delay}} + b_{35}e_1 t_{\text{int}} + b_{45}t_{\text{delay}} t_{\text{int}} \quad \text{Equação 5}$$

onde  $z$  é a resposta (área de pico) e  $b$  corresponde aos coeficientes de regressão. Para a obtenção do valor de área para cada elemento, devem ser considerados apenas os efeitos significativos.

Estimou-se a qualidade dos modelos individuais pela ANOVA. Os coeficientes polinomiais das superfícies de resposta para cada elemento, ao nível de 95% de confiança, definidos de acordo com o modelo quadrático, variaram em relação aos elementos estudados (TABELA 2.7).

Pode-se observar que muitos coeficientes de segunda ordem, por exemplo  $b_{11}$ , são significativamente diferentes de zero bem como a maioria apresenta interação entre as variáveis. Esta é uma indicação de que a relação entre a resposta e os parâmetros operacionais não é linear e o efeito destes parâmetros sobre a resposta é interdependente. Por esta razão, estratégias de otimização univariada não são adequadas para este tipo de otimização uma vez que pode conduzir à seleção de condições operacionais distantes do ótimo. Na TABELA 2.7, valores de  $p$  menores que 0,5 indicam falta de ajuste do modelo. A ANOVA confirma a complexidade entre os valores de área e as variáveis estudadas.

A dependência não linear entre a área de pico e as condições experimentais de LIBS pode ser avaliada considerando os aspectos da técnica. Geralmente, os efeitos individuais do tempo de atraso, tempo de integração e número de pulsos acumulados podem ser previstos.

O tempo de atraso é definido como o tempo a partir do pulso do laser até a medida; o tempo de abertura da janela durante a aquisição do sinal é

definido como o tempo de integração. Imediatamente após o pulso do laser, uma intensa contribuição do contínuo para a emissão é esperada<sup>17</sup>, quando o tempo de atraso é menor que 0,1  $\mu$ s. Esse efeito é devido basicamente a dois processos: ao efeito *Bremsstrahlung* que é provocado por colisões de elétrons com íons e átomos e à recombinação de elétrons com íons. Essa recombinação ocorre quando um elétron livre é capturado em um nível energético atômico ou iônico, liberando energia cinética na forma de um fóton<sup>106</sup>. No entanto, 0,1 a 0,5  $\mu$ s após o pulso do laser, as linhas atômicas e iônicas se destacam no contínuo.

O tempo de atraso deve ser selecionado de forma a discriminar o sinal de emissão da radiação do contínuo com o compromisso de aumentar a razão sinal/fundo e razão sinal/ruído. Para maiores tempos de atraso, o sinal de emissão tende a diminuir, uma vez que o plasma em LIBS é um evento de curta duração. Em geral, exploram-se menos que 100  $\mu$ s após o pulso do laser, tipicamente 10  $\mu$ s com pulsos de ns.

O tempo de integração é também selecionado de forma a SBR ser mais apropriada. Geralmente, valores de SNR e SBR seguem o mesmo comportamento em função do tempo de atraso.

Em LIBS, os sinais de emissão tendem a aumentar com o aumento do número de pulsos acumulados, mas há um limite a partir do qual este aumento diminui mais que proporcionalmente, podendo, inclusive, atingir um valor constante. Para os tecidos vegetais, e nas condições experimentais empregadas nesta tese, quando a ablação foi feita na mesma posição da amostra, houve um aumento proporcional do sinal de emissão até 50 pulsos para todas as linhas de emissão. Acima de 50 pulsos o sinal não aumentou proporcionalmente, o que, provavelmente, foi causado por alterações na geometria da superfície da amostra. A abordagem considerada mais apropriada para a análise das pastilhas dos tecidos vegetais foi a de realizar vários disparos do laser sobre a superfície da amostra para se obter uma composição média dos elementos com a menor variância possível.

Os melhores valores de tempo de atraso, tempo de integração e número de pulsos acumulados, energia do laser e da distância lente-amostra são dependentes das propriedades da amostra, da concentração do analito e das linhas de emissão selecionadas. Considerando-se este número de variáveis, procedimentos matemáticos e computacionais são recomendados para a obtenção de modelos de otimização mais adequados. No presente caso, os modelos baseados a matriz Doehlert e o algoritmo genético com redes neurais artificiais foram apropriados para a otimização simultânea destas variáveis, visando à determinação dos analitos de interesse (P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, B, Al e Si) por LIBS.

No caso da otimização com a matriz Doehlert, os modelos não se ajustaram perfeitamente aos dados (FIGURAS 2.23 e 2.24), o que tornou necessário uma estratégia alternativa. Não obstante, os dados das áreas dos picos de emissão obtidos no planejamento Doehlert, puderam ser utilizados com sucesso no desenvolvimento do modelo BRANN, como será visto no item 2.3.3.

Pelo planejamento Doehlert, não foi possível observar uma condição ótima comum a todos os elementos e apresentou falta de ajuste para a maioria dos modelos. A necessidade de uma condição que maximiza simultaneamente as respostas de todos os elementos estimulou a tentativa de modelagem das respostas pela abordagem de otimização simultânea.

TABELA 2.7 - Coeficientes da matriz Doehlert para valores de área de pico.

Coeficientes	Al	B	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	P	Si	Zn
b0	6554	1850	43533	634,5	5877	3957,77	19548	2871	4765	13975	790
b1	7323	2408	82975	1077	5859	5517	31470	3940	4690	14725	1137
b2	6129	1425	50985	572	6196	3255	18635	2345	3380	11595	724
b3	3870	1367	52309	464	5215	2580	14867	2838	3794	7467	840
b4	7604	2035	-152797	730	10785	-2784	-35854	5668	4777	-17348	1035
b5	2306	640	25962	254	2970	1598	10349	1172	1415	4696	435
b11	(*)	554	10768	335	(*)	(*)	8962	(*)	(*)	(*)	409
b22	(*)	(*)	14966	(*)	-2649	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)
b33	(*)	(*)	-18141	(*)	(*)	(*)	-7195	-610	(*)	(*)	(*)
b44	6813	1672	168769	696	9732	2156	32404	5576	3271	14450	729
b55	(*)	535	26085	(*)	3868	(*)	5294	1534	(*)	4400	(*)
b12	7444	1586	90583	744	7551	(*)	22928	2850	3437	14038	740
b13	(*)	860	(*)	430	(*)	4984	8341	1019	(*)	(*)	(*)
b14	-6207	-1755	-165647	-1001	(*)	-3485	-38170	-5321	-3864	-10543	-829
b15	(*)	1829	44340	698	6514	(*)	24530	3962	4455	8067	964
b23	4454	(*)	35460	(*)	(*)	(*)	11564	1256		6057	472
b24	-10034	-1167	-110380	-547	-15438	(*)	-28746	-3252		-17426	-573
b25	4136	755	27570	415	4767	(*)	12016	1155		5655	404
b34	-6125	-1555	-162445	-521	-8048	-3930	-29170	-5338	-4130	-13104	-1076
b35	-6400	-898	-93666	-686	(*)	-4372	-16605	-3026	(*)	-11228	(*)
b45	(*)	(*)	-26203	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)
p	0,0200	0,0090	0,00005	0,0130	0,0037	0,0550	0,0009	0,0005	0,0220	0,0090	0,0104

(\*) Efeitos não significativos

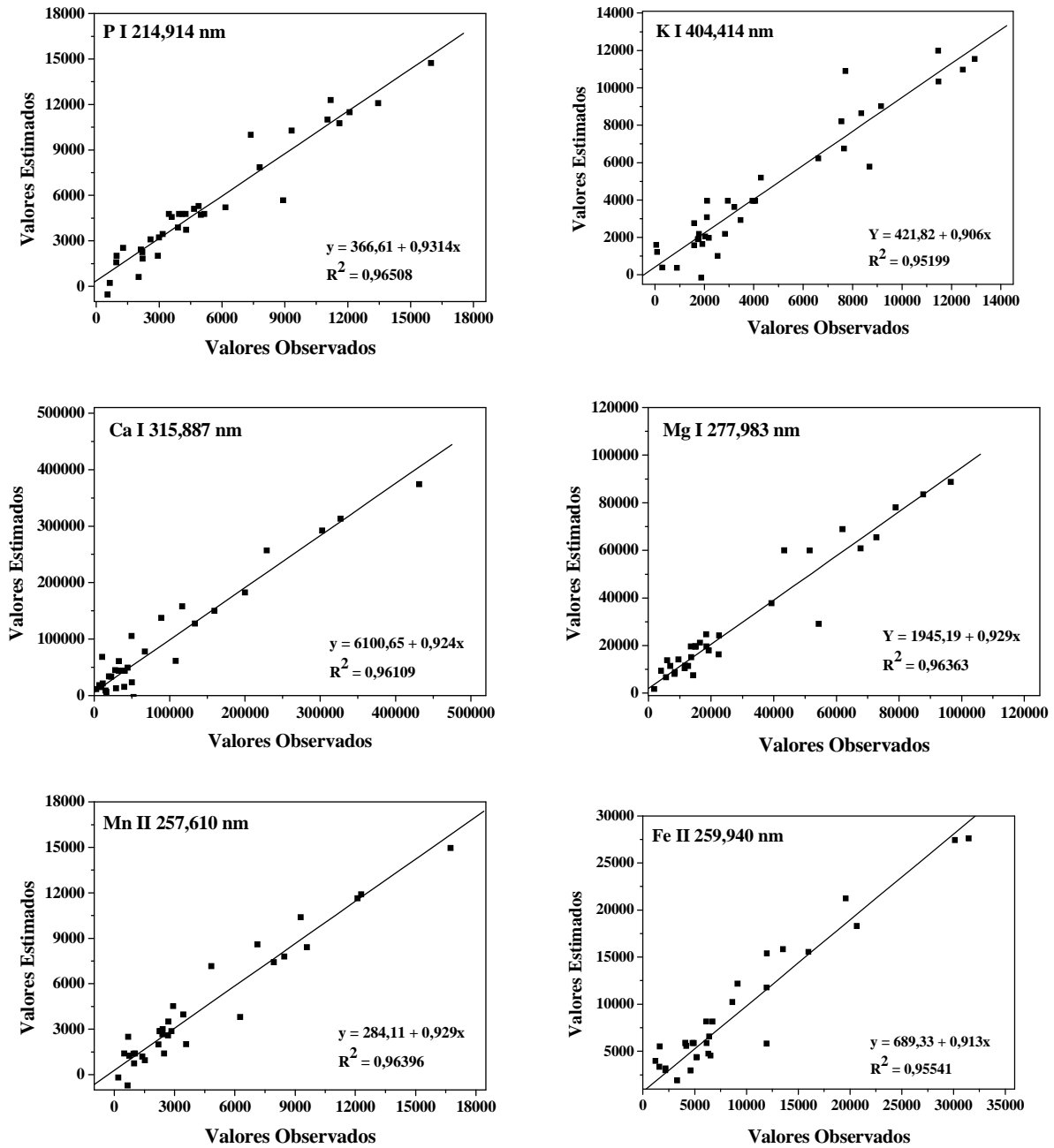


FIGURA 2.23 - Correlação entre valores de intensidade de áreas dos picos de emissão medidos e valores estimados pelos modelos obtidos do planejamento Doehlert para P, K, Ca, Mg, Mn e Fe ao nível de 95% de significância.

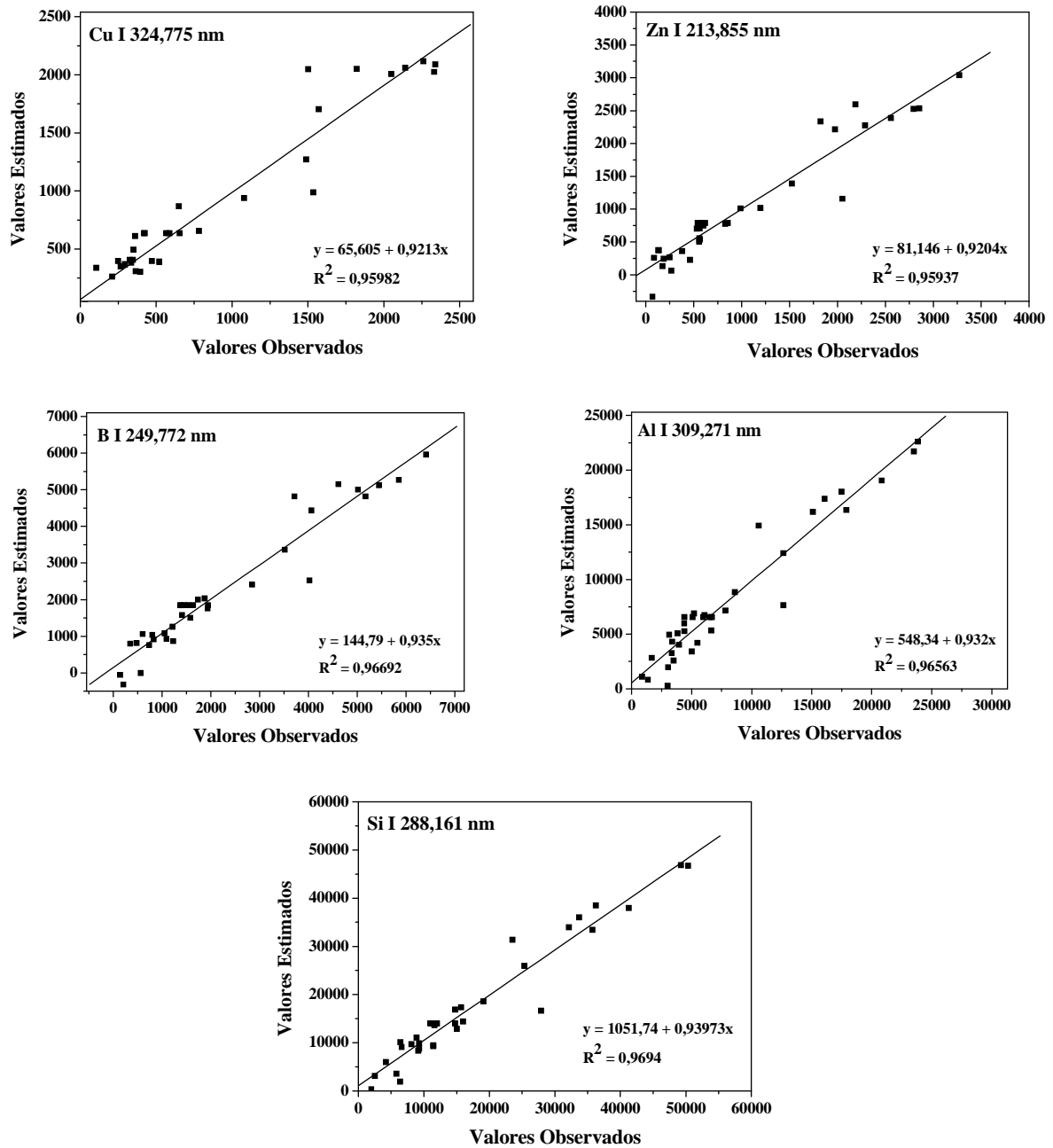


FIGURA 2.24 - Correlação entre valores de intensidade de áreas dos picos de emissão medidos e valores estimados pelos modelos obtidos do planejamento Doehlert para P, K, Ca, Mg, Mn e Fe ao nível de 95% de significância.

### 2.3.3 - Aplicação das redes neurais artificiais e algoritmo genético

A soma do erro quadrático médio (RMSE) é um indicativo da robustez do modelo avaliado. Os valores de RMSE para os tratamentos com a BRANN são mostrados na FIGURA 2.25. A melhor arquitetura da rede constou de 15 neurônios na camada intermediária. Os menores valores de RMSE, para a maioria dos elementos, foram resultantes do quarto treinamento, dentro das 5 replicatas para cada arquitetura.

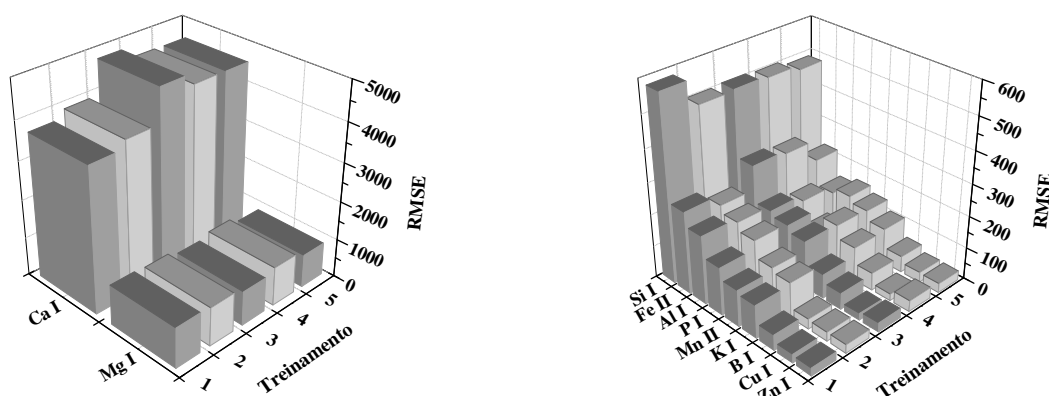


FIGURA 2.25 - Representação tridimensional dos valores de RMSE para P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, B, Si e Al com o modelo BRANN em 5 treinamentos da rede.

Os resíduos obtidos pelos modelos BRANN são mostrados nas FIGURAS 2.26 e 2.27. Pode-se observar uma distribuição aleatória dos resíduos, o que é uma evidência adicional de que os dados foram bem modelados pela rede neural.

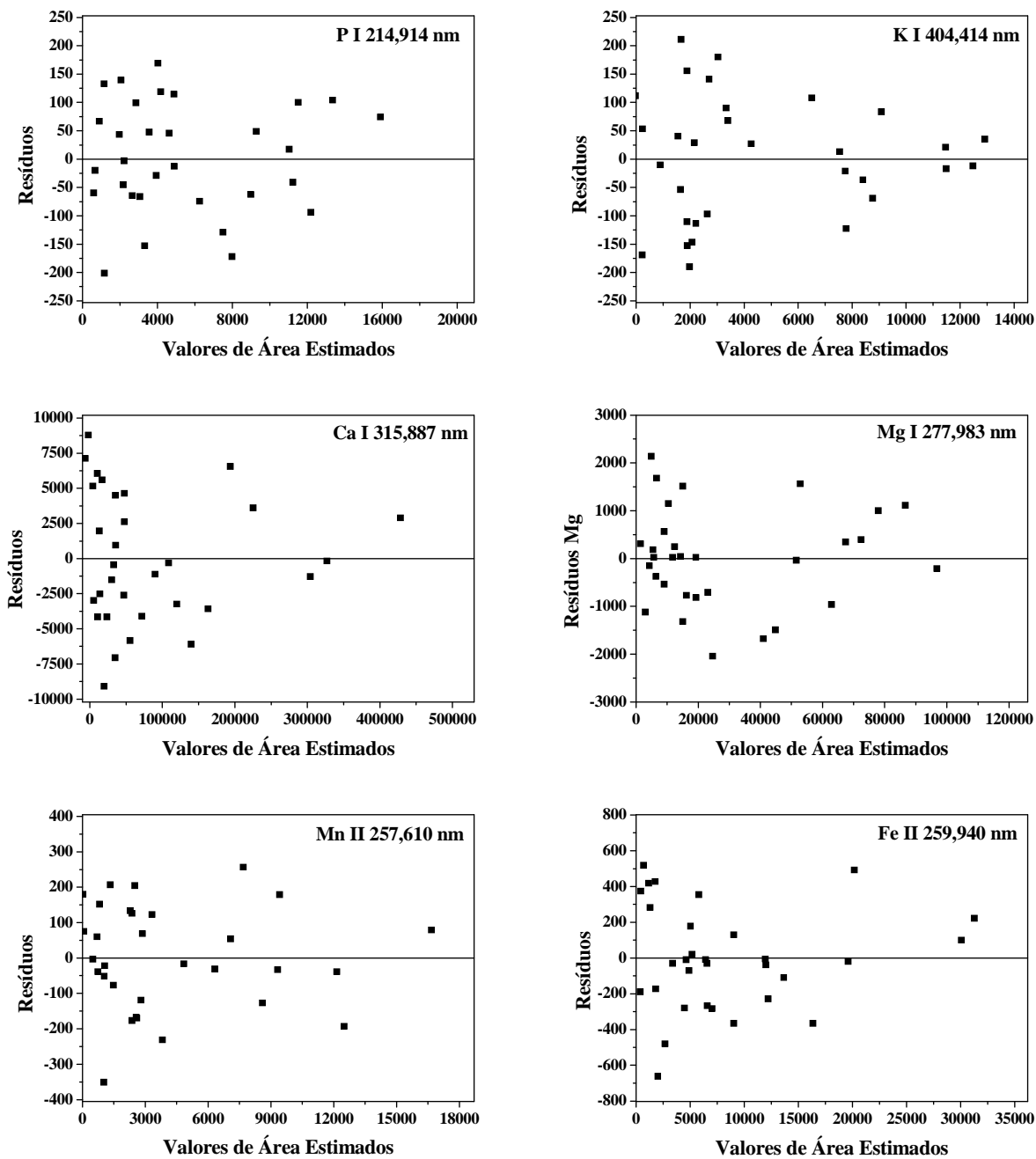


FIGURA 2.26 - Resíduos para P, K, Ca, Mg, Mn e Fe obtidos do modelo BRANN.



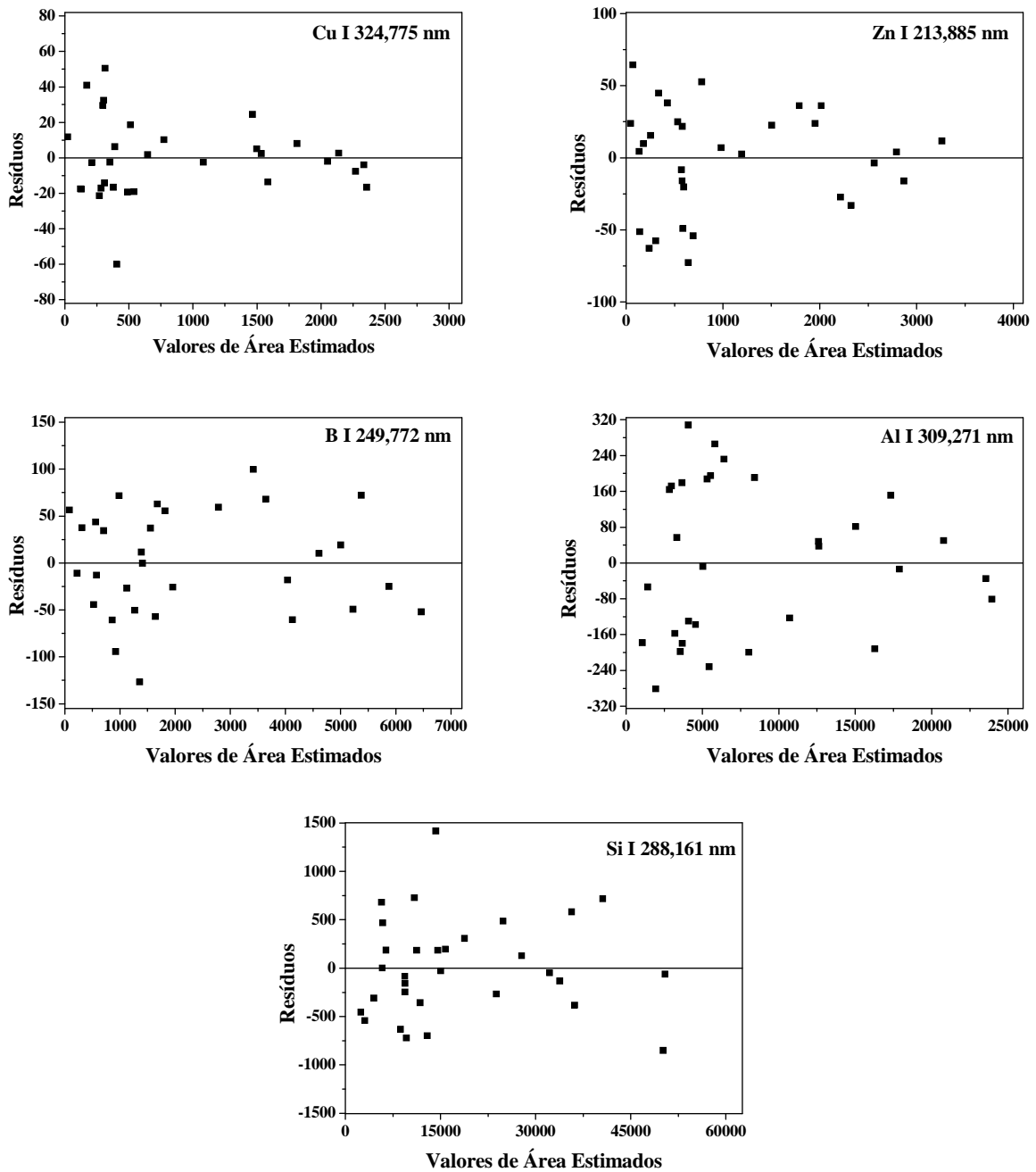


FIGURA 2.27 - Resíduos para Cu, Zn, B, Al e Si obtidos do modelo BRANN.

Com a rede treinada, utilizou-se uma rotina de algoritmo genético para a otimização dos parâmetros experimentais a fim de se obter as melhores condições para determinação simultânea de macro e micronutrientes, além de Al e Si em tecidos vegetais.

O algoritmo genético processou uma função matemática de minimização de perda (Equação 4), que foi construída utilizando a rede otimizada. A saída da rede constituiu a entrada do algoritmo genético, resultando no procedimento neuro-genético.

As melhores condições experimentais fornecidas pelo algoritmo genético que maximizaram as respostas dos 11 elementos simultaneamente foram:

- 110 mJ/pulso
- distância lente-amostra de 17,5 cm
- 25 pulsos acumulados
- tempo de atraso de 2,0  $\mu$ s
- tempo de integração de 4,5  $\mu$ s

A fluência é a quantidade de energia por unidade de área irradiada pelo laser <sup>17</sup>, expressa em  $\text{J cm}^{-2}$ . Desta forma, o ajuste da fluência considera o diâmetro de focalização do laser sobre a superfície da amostra e a energia por pulso. Na condição otimizada o diâmetro de focalização do laser foi de 600  $\mu$ m. Neste caso, calculou-se uma fluência de, aproximadamente, 25  $\text{J cm}^{-2}$ .

Os incrementos dos picos obtidos na condição otimizada pela abordagem neuro-genética foram comparados com o melhor ponto experimental do planejamento Doehlert para a maioria dos elementos (experimento 21) e são mostrados nas FIGURAS 2.28 e 2.29.

Os valores de área dos picos de emissão para cada elemento, obtidos na condição otimizada pela abordagem neuro-genética e no melhor ponto experimental do planejamento Doehlert, são mostrados na FIGURA 2.30.

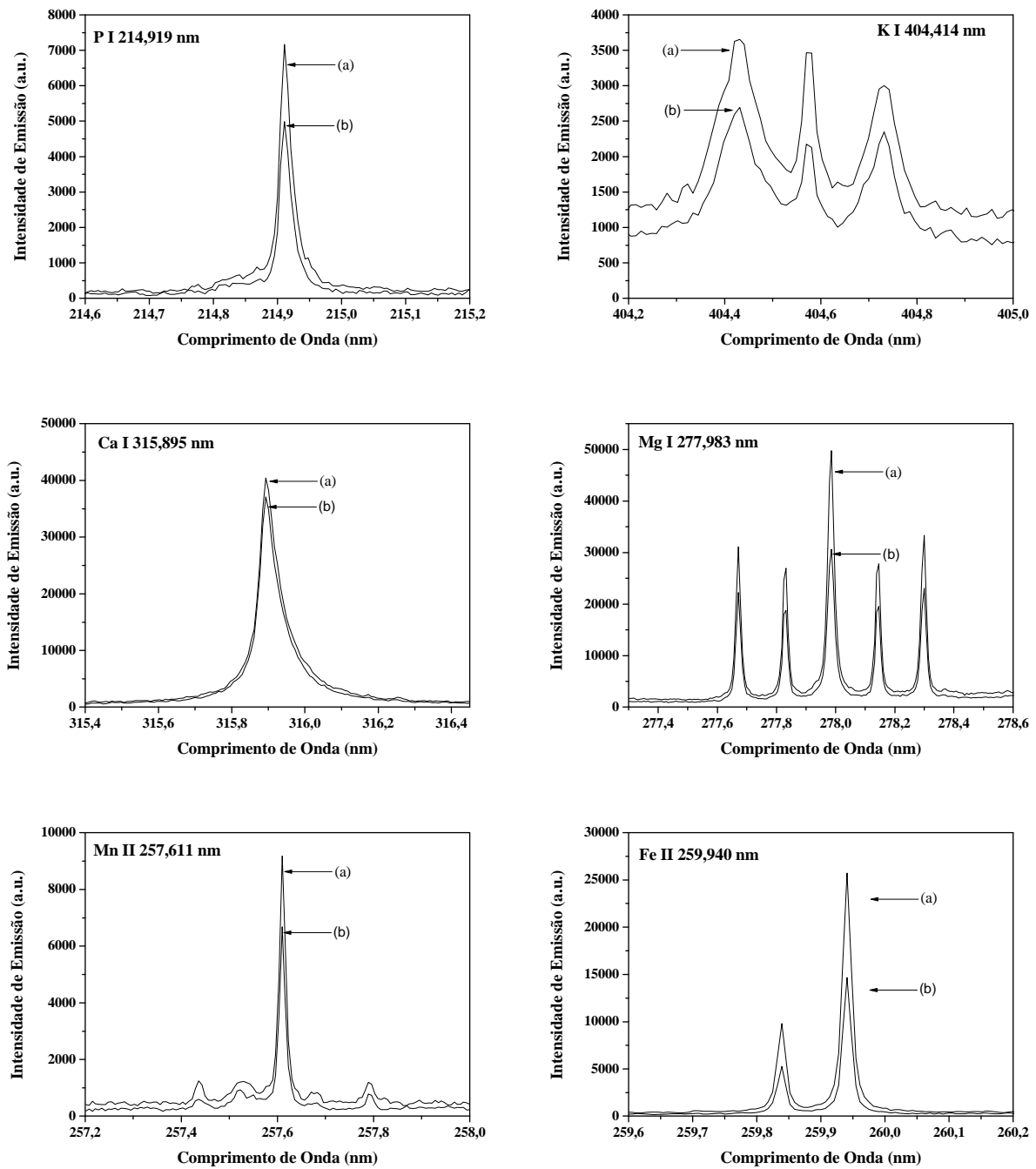


FIGURA 2.28 - Regiões espectrais selecionadas para determinação de P, K, Ca, Mg, Mn e Fe em tecidos vegetais. (a) Espectros com tratamento neuro-genético: 110 mJ/pulso, 17,5 cm de distância lente-amostra, 25 pulsos acumulados, 2,0  $\mu$ s de atraso e 4,5  $\mu$ s de integração; (b) Melhor ponto do planejamento Doehlert: 120 mJ/pulso, 17,3 cm de distância lente-amostra, 20 pulsos acumulados, 2,0  $\mu$ s de atraso e 5,5  $\mu$ s de integração.

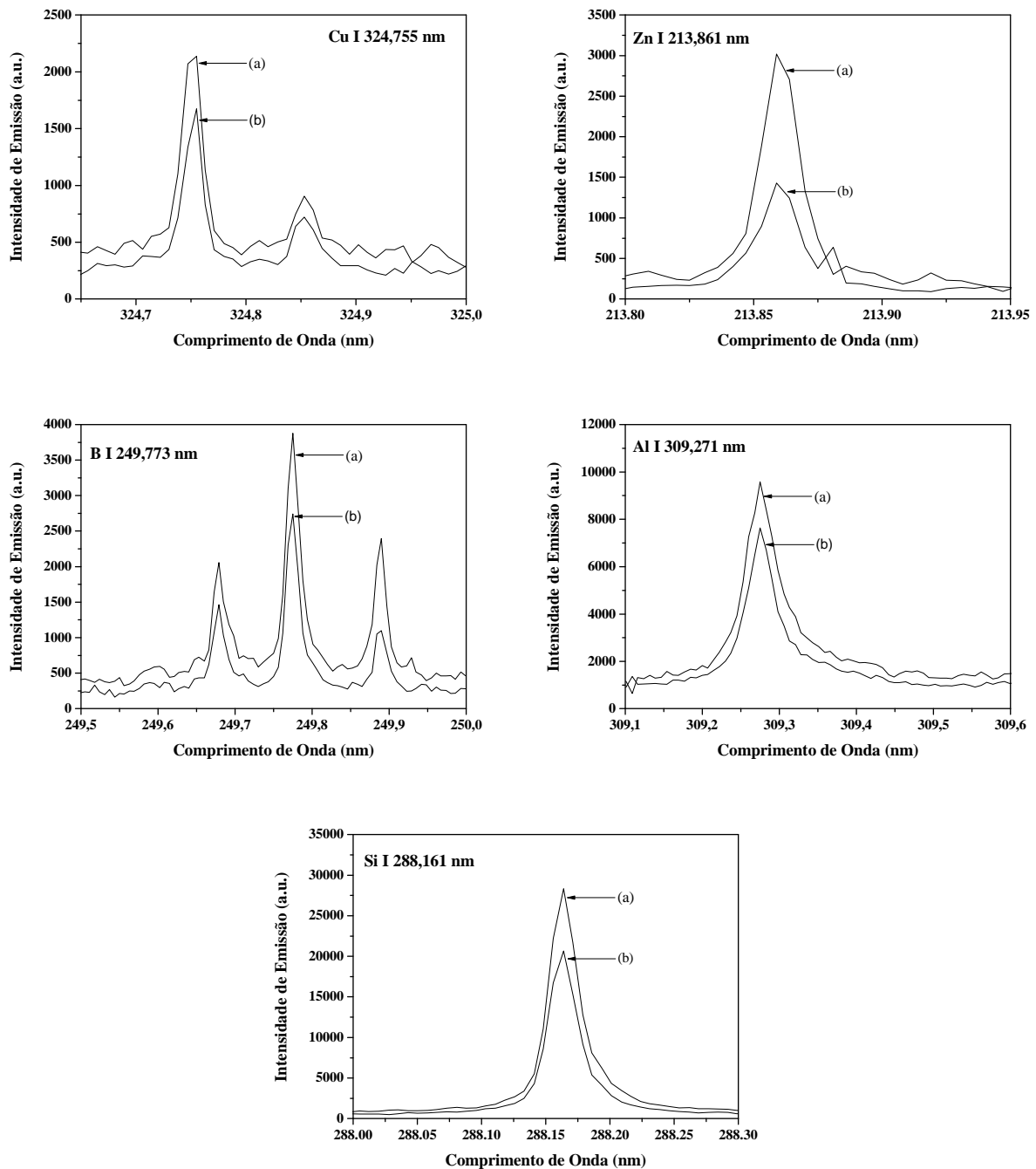


FIGURA 2.29 - Regiões espectrais selecionadas para determinação de Cu, Zn, B, Al e Si em tecidos vegetais. (a) Espectros com tratamento neuro-genético: 110 mJ/pulso, 17,5 cm de distância lente-amostra, 25 pulsos acumulados, 2,0  $\mu$ s de atraso e 4,5  $\mu$ s de integração; (b) Melhor ponto do planejamento Doehlert: 120 mJ/pulso, 17,3 cm de distância lente-amostra, 20 pulsos acumulados, 2,0  $\mu$ s de atraso e 5,5  $\mu$ s de integração.

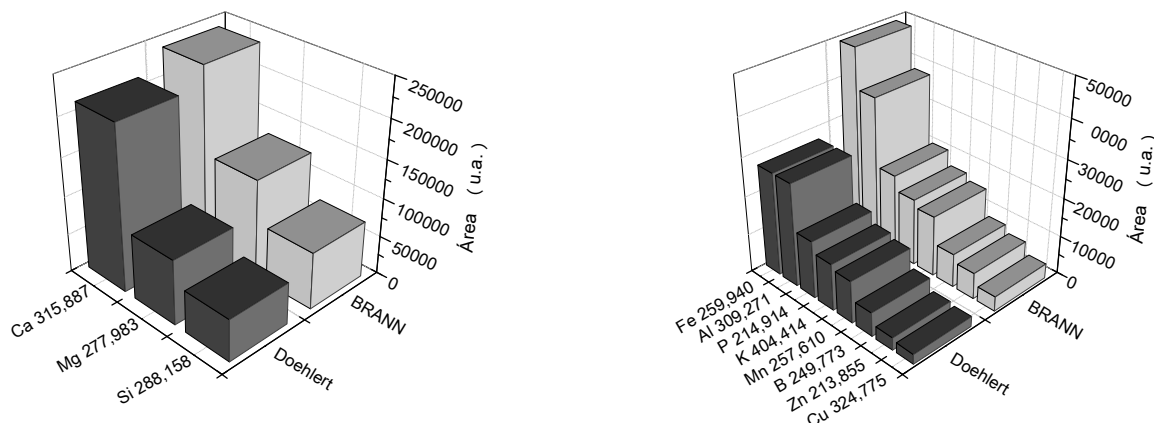


FIGURA 2.30 - Valores de intensidade das áreas dos picos de emissão de P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, B e Al em tecidos vegetais obtidos com tratamento neuro-genético (110 mJ/pulso, 17,5 cm de distância lente-amostra, 25 pulsos acumulados, 2,0  $\mu$ s de atraso e 4,5  $\mu$ s de integração) e melhor ponto experimental do planejamento Doehlert (120 mJ/pulso, 17,3 cm de distância lente-amostra, 20 pulsos acumulados, 2,0  $\mu$ s de atraso e 5,5  $\mu$ s de integração).

### 2.3.4 - Avaliação das condições experimentais para diferentes culturas

Realizou-se o processo de otimização com material de referência certificado NIST 1570a, uma vez que este apresenta melhor distribuição de tamanho de partículas dentre os materiais disponíveis.

Para avaliar se a condição ótima obtida para NIST 1570a poderia ser aplicada para amostras de diferentes culturas, avaliaram-se três condições experimentais e cinco amostras: folhas de oliveira (BCR 62), de soja, de milho, de cana-de-açúcar e de cafeeiro.

Selecionaram-se duas condições do planejamento Doehlert: ponto central (90 mJ/pulso, 17,5 cm de distância lente amostra, 20 pulsos acumulados, 3,0  $\mu$ s de atraso, 5,5  $\mu$ s de integração) e o experimento 21 que foi considerado o

melhor ponto experimental, para a maioria dos elementos (120 mJ/pulso, 17,3 cm de distância lente-amostra, 20 pulsos acumulados, 2,0  $\mu$ s de atraso e 5,5  $\mu$ s de integração) e a condição otimizada obtida com o tratamento neuro-genético (110 mJ/pulso, 17,5 cm de distância lente-amostra, 25 pulsos acumulados, 2,0  $\mu$ s de atraso e 4,5  $\mu$ s de integração).

Pelos resultados apresentados nas FIGURAS 2.31 a 2.35 observa-se que as amostras de diferentes culturas apresentaram comportamento semelhante ao obtido para NIST 1570a, ou seja, menores valores de área de pico no ponto central seguidas pelo experimento 21 e maiores valores de área de pico na condição otimizada pelo procedimento neuro-genético. A partir desses resultados, as análises das demais folhas foram realizadas na condição otimizada pelo procedimento neuro-genético.

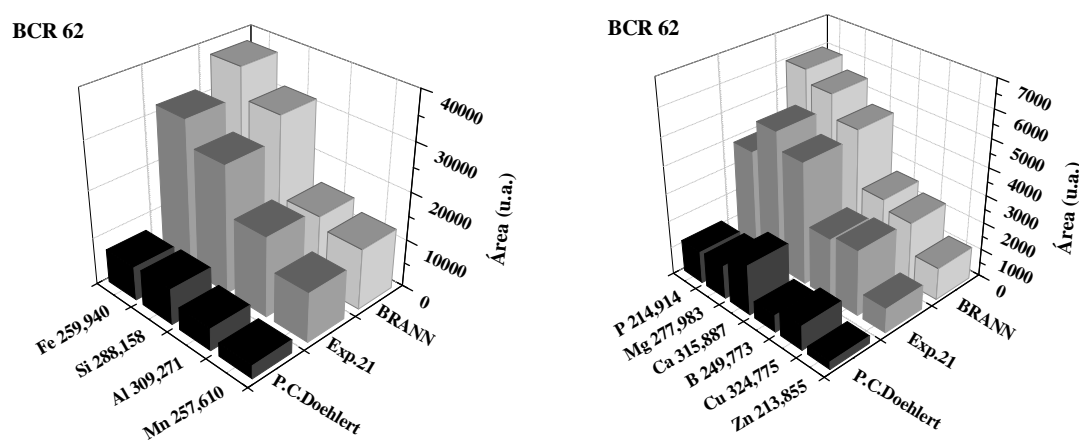


FIGURA 2.31 - Valores de área de pico de P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, B, Al e Si em pastilhas de BCR 62 nas condições do ponto central do planejamento Doehlert, melhor ponto experimental do planejamento Doehlert (Exp. 21) e com tratamento neuro-genético (BRANN).

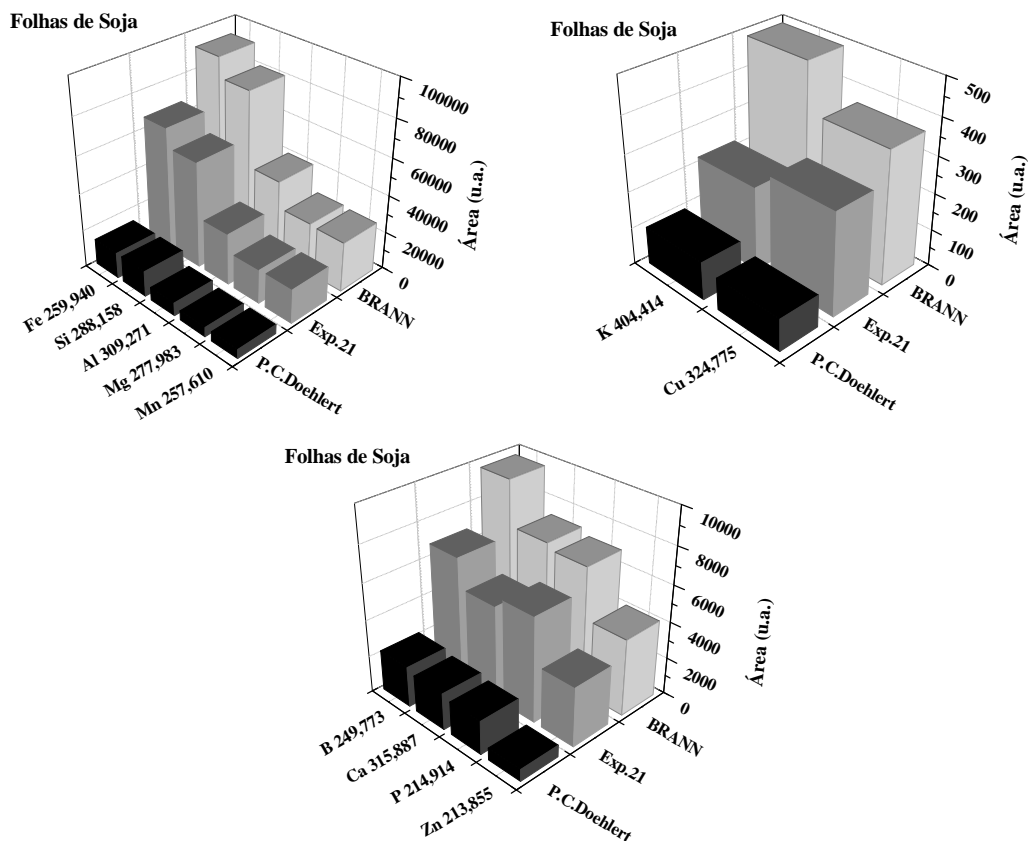


FIGURA 2.32.- Valores de área de pico de P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, B, Al e Si em pastilhas de folhas de soja nas condições do ponto central do planejamento Doehlert, melhor ponto experimental do planejamento Doehlert (Exp. 21) e com tratamento neuro-genético (BRANN).

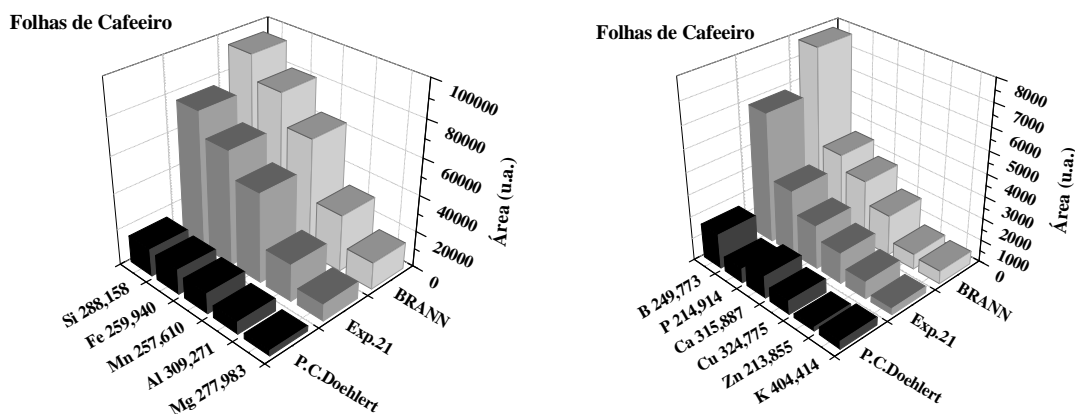


FIGURA 2.33 - Valores de área de pico de P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, B, Al e Si em pastilhas de folhas de cafeeiro nas condições do ponto central do planejamento Doehlert, melhor ponto experimental do planejamento Doehlert (Exp. 21) e com tratamento neuro-genético (BRANN).

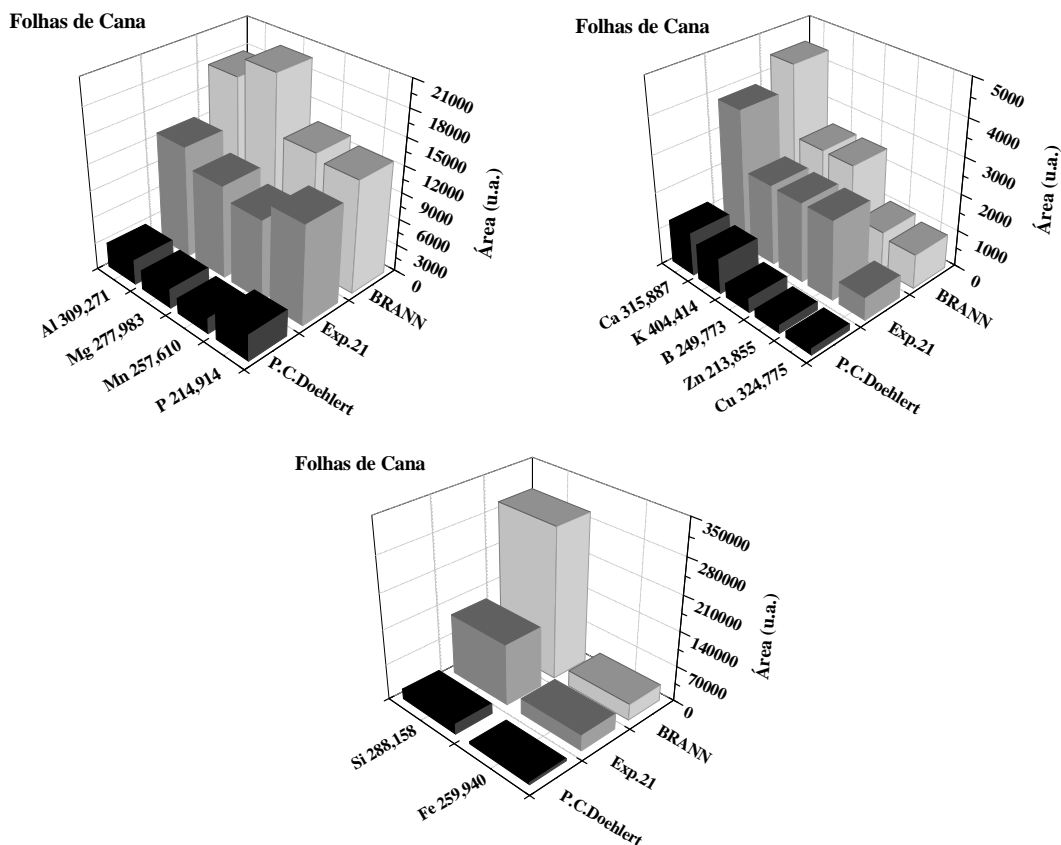


FIGURA 2.34 - Valores de área de pico de P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, B, Al e Si em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar nas condições do ponto central do planejamento Doehlert, melhor ponto experimental do planejamento Doehlert (Exp. 21) e com tratamento neuro-genético (BRANN).

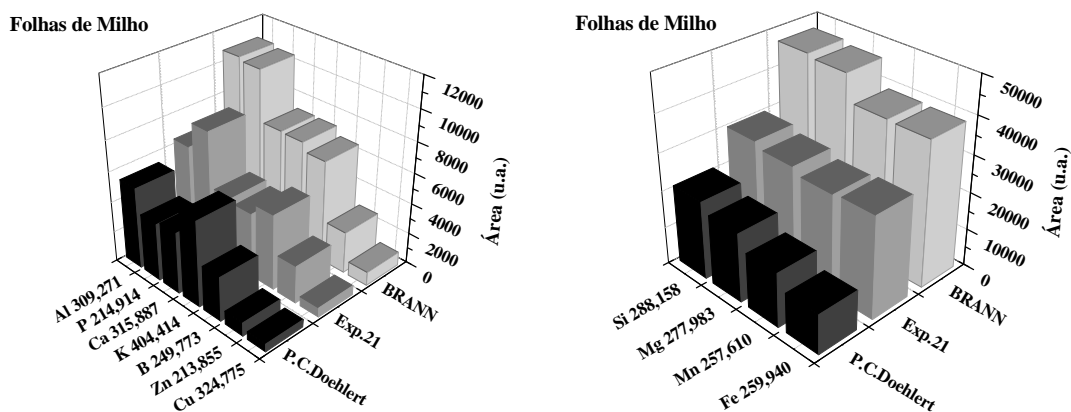


FIGURA 2.35 - Valores de área de pico de P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, B, Al e Si em pastilhas de folhas de milho nas condições do ponto central do planejamento Doehlert, melhor ponto experimental do planejamento Doehlert (Exp. 21) e com tratamento neuro-genético (BRANN).



### 2.3.5 - Otimização das condições para o preparo das pastilhas.

Os comprimentos de onda selecionados para a etapa de otimização das condições para o preparo de amostra para cada elemento foram: P I 214,914 nm; K I 404,414 nm; Ca I 527,02 nm; Mg I 277,669 nm; Mn II 257,610 nm; Fe II 259,940 nm; Cu I 324,755; Zn I 213,855 nm; B II 249,772 nm; Al I 309,271 nm e Si I 288,161 nm.

Os valores médios de área para cada elemento, a resposta normalizada e a multiresposta são mostrados nas TABELAS 2.8 e 2.9.

TABELA 2.8 - Valores de área de pico obtidos no processo de otimização do preparo das pastilhas e das análises por LIBS.

Exp.	Al	B	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	P	Si	Zn
1	31744	13977	22282	3262	83401	6304	189460	47972	37995	103107	8551
2	28043	12114	22641	2942	64801	6369	142857	40776	33237	89178	7077
3	28187	12352	22423	3000	81777	7198	131527	39520	34033	88251	7388
4	30248	13146	22520	2943	70714	6840	165523	44887	36854	94614	7576
5	33235	10112	22793	2893	61375	9766	86362	25502	26927	85861	6112
6	29422	10802	21576	2911	56765	8392	95351	27745	27866	80580	6583
7	30561	11044	20377	2751	70500	8199	99809	29482	30141	85671	6939
8	26245	9686	20418	2298	51174	8447	71914	22100	26955	68324	6153

TABELA 2.9 - Valores de área de pico normalizados e a multiresposta obtidos no processo de otimização do preparo das pastilhas e das análises por LIBS.

Exp.	Al	B	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	P	Si	Zn	RM
1	0,96	1,00	0,98	1,00	1,00	0,65	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	10,58
2	0,84	0,87	0,99	0,90	0,78	0,65	0,75	0,85	0,87	0,86	0,83	9,21
3	0,85	0,88	0,98	0,92	0,98	0,74	0,69	0,82	0,90	0,86	0,86	9,49
4	0,91	0,94	0,99	0,90	0,85	0,70	0,87	0,94	0,97	0,92	0,89	9,87
5	1,00	0,72	1,00	0,89	0,74	1,00	0,46	0,53	0,71	0,83	0,71	8,59
6	0,89	0,77	0,95	0,89	0,68	0,86	0,50	0,58	0,73	0,78	0,77	8,40
7	0,92	0,79	0,89	0,84	0,85	0,84	0,53	0,61	0,79	0,83	0,81	8,71
8	0,79	0,69	0,90	0,70	0,61	0,86	0,38	0,46	0,71	0,66	0,72	7,49

Os valores em módulo dos efeitos principais e secundários para cada elemento e para a otimização multiresposta são mostrados nos gráficos de Pareto (FIGURAS 2.36 e 2.37). A partir desses resultados, selecionaram-se as variáveis estatisticamente significativas ao nível de 95% de confiança, definidas pela linha vertical tracejada. Para a maioria dos elementos, o tipo de amostragem apresentou efeito mais significativo, seguida pela pressão no preparo da pastilha. O tempo de pressão foi significativo apenas para Mg, Fe, Cu, Al e Si. Apenas para Ca as três variáveis não apresentaram efeitos significativos, indicando que estas variáveis não são críticas para a sua determinação neste tipo de amostra.

Observam-se, também, efeitos negativos das três variáveis para a maioria dos elementos, o que indica que quanto menor o valor dessas variáveis melhores sinais LIBS são obtidos, é a melhor condição para obter maior sensibilidade. Para o tipo de amostragem, melhores resultados foram obtidos com o amostrador parado. Observaram-se, também efeitos de interação significativos, o que é uma indicação de que uma otimização univariada não seria a mais apropriada.

Assim, obteve-se uma avaliação simultânea dos resultados através do gráfico de Pareto para a multiresposta (FIGURA 2.38). Os resultados foram concordantes com os obtidos para a maioria dos elementos individuais. O tipo de amostragem e a pressão apresentaram efeitos significativos e negativos; efeitos de interação também foram observados.

O tempo de pressão não apresentou efeito significativo indicando que esta variável não é crítica para a determinação dos elementos de interesse.

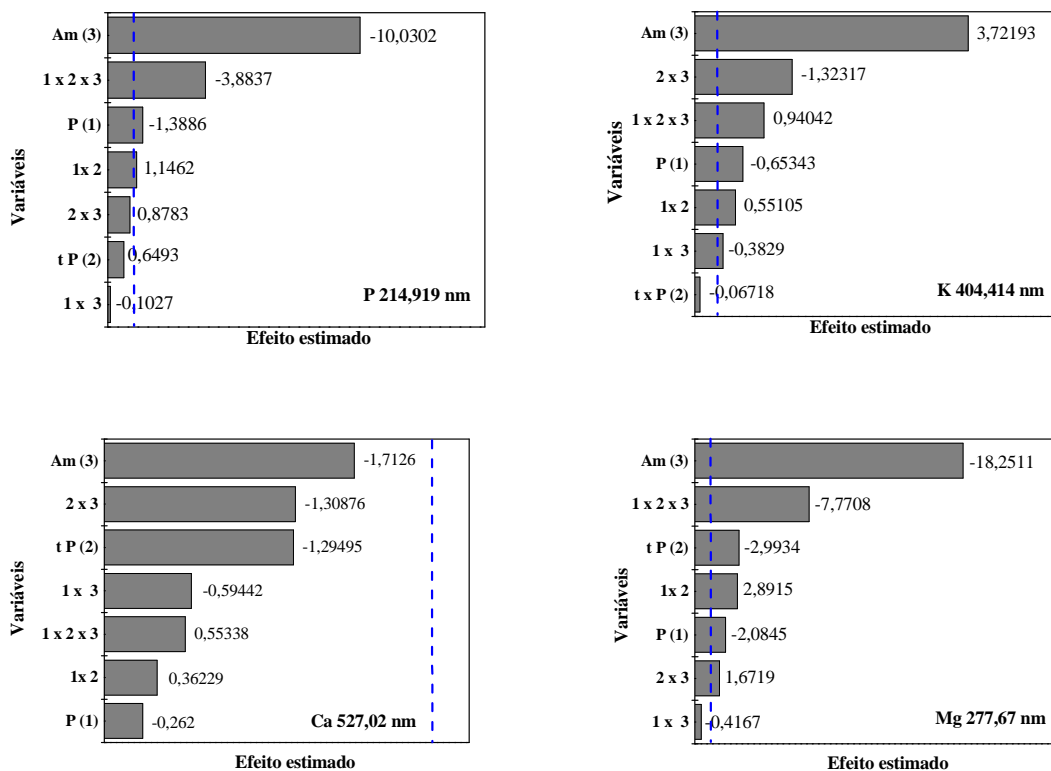


FIGURA 2.36 - Gráficos de Pareto do planejamento fatorial completo para P, K, Ca e Mg. Variáveis: [1] Pressão, [2] Tempo de pressão, [3] Amostragem.

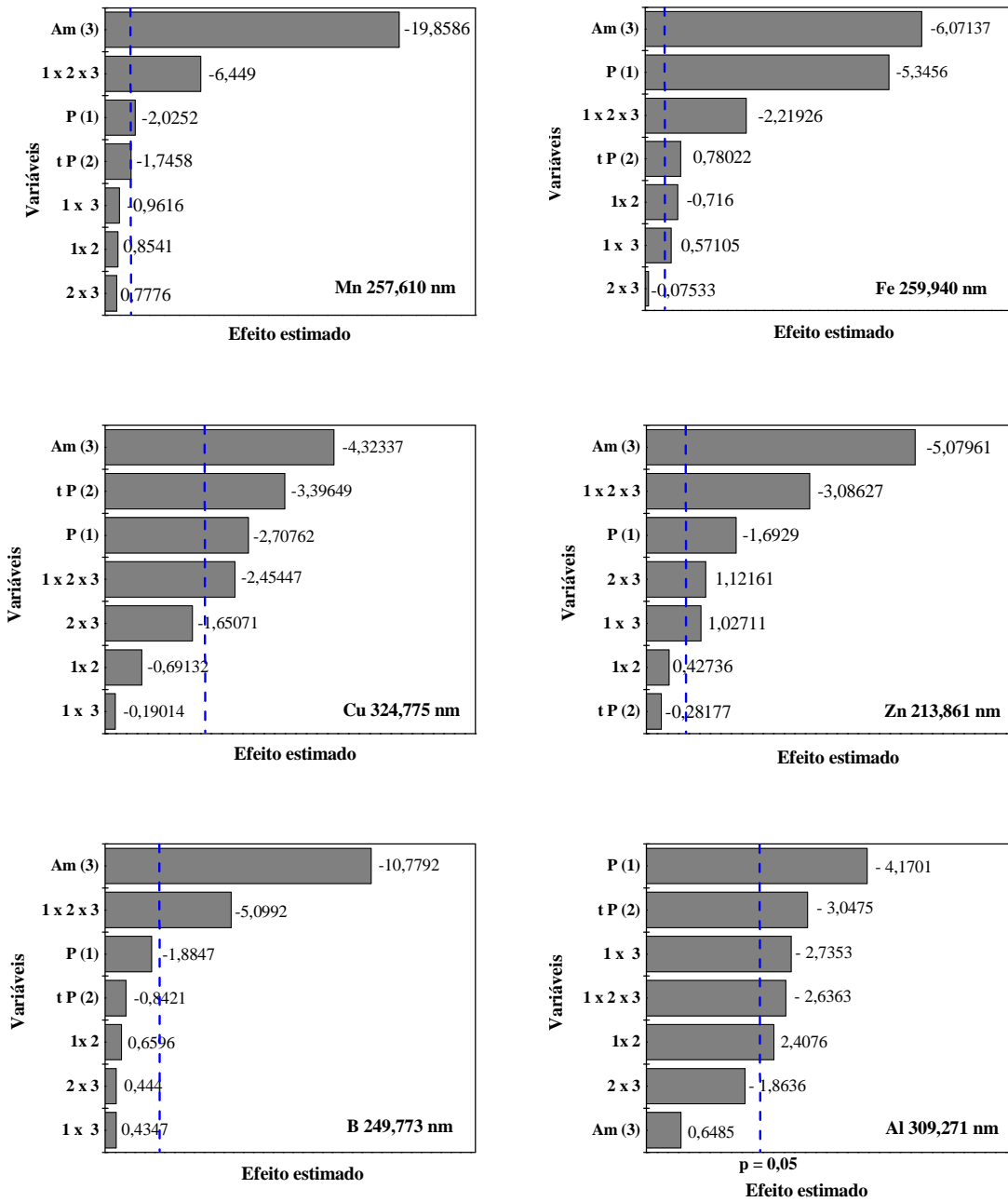


FIGURA 2.37 - Gráficos de Pareto do planejamento fatorial completo para Mn, Fe, Cu, Zn, B e Al. Variáveis: [1] Pressão, [2] Tempo de pressão, [3] Amostragem.

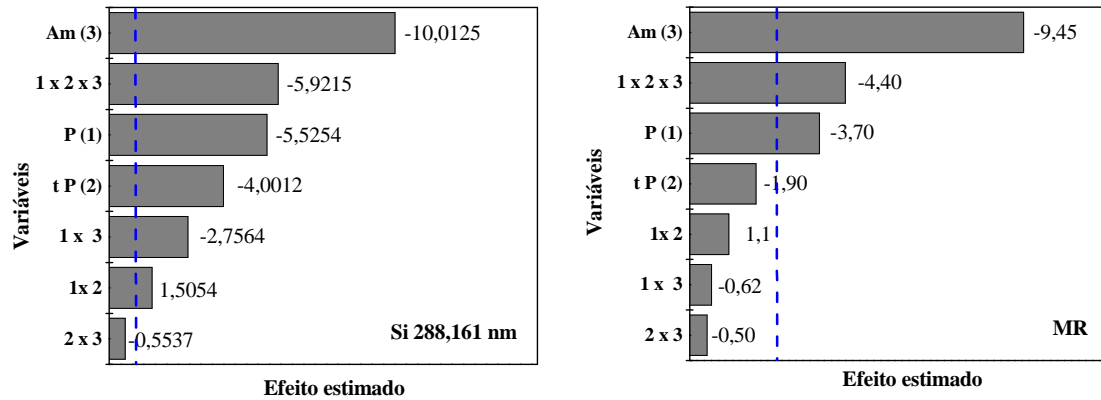


FIGURA 2.38 - Gráficos de Pareto do planejamento fatorial completo para Si e multiresposta (MR). Variáveis: [1] Pressão, [2] Tempo de pressão, [3] Amostragem.

As melhores condições para o preparo de amostra e aquisição dos espectros LIBS para determinação de macro, micro, Al e Si em pastilhas de tecidos vegetais são mostradas na TABELA 2.10.

TABELA 2.10 - Condições para o preparo de amostra e aquisição dos espectros no sistema LIBS em pastilhas de tecidos vegetais.

Variável	Condição otimizada
Pressão	8 ton/cm <sup>2</sup>
Tempo de aplicação da pressão	5 min.
Tipo de amostragem	Amostrador parado

## **CAPÍTULO 3**

### ***Calibração Multivariada***

### 3.1 - Fundamentos teóricos da calibração multivariada

#### 3.1.1 - Regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR)

A introdução de computadores em laboratórios analíticos permite aplicar poderosos algoritmos matemáticos para estudar sistemas químicos complexos que não podem ser diretamente analisados em virtude de alguns fatores como, por exemplo, interferências, flutuação instrumental, efeito de matriz e ruído <sup>107</sup>.

Em uma revisão, Smith <sup>108</sup> destacou que LIBS pode ser considerada uma importante técnica para análise qualitativa, mas ainda são necessários estudos complementares para torná-la uma técnica quantitativa confiável.

Com base nos trabalhos encontrados na literatura, observa-se que a utilização de ferramentas quimiométricas em dados obtidos por LIBS pode conduzir a uma melhora significativa nos resultados. Contudo, ainda é imprescindível o desenvolvimento de métodos analíticos, tanto de classificação como de calibração, abordando diferentes tipos de amostras, que permitam estabelecer de forma mais concreta qual a melhor ferramenta a ser utilizada, as condições de pré-processamento e a seleção de variáveis mais adequadas.

O sucesso de LIBS como uma técnica analítica para várias aplicações envolve o desenvolvimento e otimização de métodos estatísticos para análise rápida dos espectros <sup>52</sup>. Os espectros LIBS são, geralmente, complexos em questão de segundos milhares de pontos de dados podem ser obtidos. Portanto, é uma extensão natural para empregar análise multivariada.

Entre os métodos de calibração multivariada de primeira ordem, os mais utilizados têm sido a regressão linear múltipla (do inglês, Multiple Linear Regression – MLR), regressão por componentes principais (do inglês, Principal

Components Regression – PCR) e regressão por mínimos quadrados parciais (do inglês, Partial Least Square - PLS).

A regressão por PLS destaca-se entre os diferentes métodos para construção de modelos de calibração uma vez que tem sido usada em uma variedade de análises com resultados satisfatórios <sup>107</sup>.

O PLS é um método matemático baseado em uma relação entre duas matrizes de dados,  $\mathbf{X}$  (variáveis independentes) e  $\mathbf{Y}$  (variáveis dependentes). As matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  são decompostas em uma soma de variáveis latentes (novos eixos de coordenadas) e podem ser representadas pela análise de componentes principais <sup>109</sup>:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T + \mathbf{E}_x = \sum_{i=1}^F \mathbf{t}_A \mathbf{p}_A^T + \mathbf{E}_x$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U}\mathbf{Q}^T + \mathbf{E}_y = \sum \mathbf{u}_A \mathbf{q}_A^T + \mathbf{E}_y$$

onde  $\mathbf{X}$  é a matriz de respostas instrumentais,  $\mathbf{Y}$  é a matriz de respostas da propriedade de interesse,  $\mathbf{T}$  e  $\mathbf{U}$  são os *scores* de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , respectivamente,  $A$  é o número de variáveis latentes,  $\mathbf{P}$  e  $\mathbf{Q}$  são os *loadings* de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , respectivamente,  $\mathbf{E}_x$  e  $\mathbf{E}_y$  correspondem às matrizes de resíduos composta pelas variáveis latentes que contem a parte não modelada.

Uma relação linear entre os *scores* de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  pode ser estabelecida:

$$\mathbf{u}_A = \mathbf{b}_A \mathbf{t}_A$$

onde  $\mathbf{b}_A$  é o vetor de coeficientes de regressão do modelo linear para cada variável latente, obtido através de:

$$\mathbf{b}_A = \frac{\mathbf{u}_A^T \mathbf{t}_A}{\mathbf{t}_A^T \mathbf{t}_A}$$

A decomposição das matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  no produto das matrizes de *scores* e *loadings* é mostrada na FIGURA 3.1 <sup>110</sup>.



$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{c} m \\ \square \\ n \end{array} \mathbf{X} = \begin{array}{c} 1 \\ \square \\ n \end{array} \mathbf{t}_1 \begin{array}{c} 1 \\ \square \\ 1 \end{array} \mathbf{p}_1^T + \dots + \begin{array}{c} 1 \\ \square \\ n \end{array} \mathbf{t}_A \begin{array}{c} 1 \\ \square \\ 1 \end{array} \mathbf{p}_A^T + \begin{array}{c} m \\ \square \\ n \end{array} \mathbf{E} \\
 \\
 \begin{array}{c} z \\ \square \\ n \end{array} \mathbf{Y} = \begin{array}{c} 1 \\ \square \\ n \end{array} \mathbf{u}_1 \begin{array}{c} 1 \\ \square \\ 1 \end{array} \mathbf{q}_1^T + \dots + \begin{array}{c} 1 \\ \square \\ n \end{array} \mathbf{u}_A \begin{array}{c} 1 \\ \square \\ 1 \end{array} \mathbf{q}_A^T + \begin{array}{c} z \\ \square \\ n \end{array} \mathbf{F}
 \end{array}$$

FIGURA 3.1 - Representação esquemática da decomposição em variáveis latentes das matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  para o modelo PLS

### 3.1.2 - Seleção de variáveis em calibração de primeira ordem e sinal analítico líquido (NAS)

A seleção de variáveis envolve a escolha de determinadas regiões do espectro que permite minimizar os erros de previsão no modelo de calibração. As regiões de comprimento de onda que não possuem informações relevantes ou correlacionadas com a propriedade de interesse podem ser eliminadas<sup>111</sup>.

O método dos mínimos quadrados parciais por intervalos (iPLS, do inglês, interval partial least square) é uma extensão iterativa desenvolvida para o PLS, onde é feita uma regressão por mínimos quadrados parciais em cada subintervalo equidistante em toda região do espectro. As regiões espectrais que apresentam menor relevância são removidas e um novo modelo é construído a partir das variáveis selecionadas<sup>112</sup>.

Os modelos PLS para cada região do espectro subdividido são comparados com o desenvolvido para todo o espectro (modelo global) em um gráfico baseado no erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV). A

melhor seleção de variáveis será a que apresentar o menor valor de RMSECV em relação ao modelo global. A região espectral com valores de parâmetro de validação menor que o modelo global é então selecionada para a construção dos modelos PLS <sup>113</sup>.

O conceito de sinal analítico líquido (NAS, do inglês, Net Analyte Signal) é uma importante ferramenta para determinação de algumas figuras de mérito em calibrações multivariadas. Cálculos de seletividade e razão sinal/ruído requerem o cálculo do sinal analítico líquido do analito de interesse, que é a fração do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos demais compostos presentes na amostra.

Com a possibilidade de calcular um valor escalar livre de interferências, a partir de um vetor contendo contribuições de constituintes desconhecidos, é possível construir uma nova forma de calibração multivariada em que o modelo pode ser representado em uma forma pseudo-univariada.

O cálculo do NAS foi descrito por LORBER <sup>114</sup>, GOICOECHEA e OLIVIERI <sup>115</sup> e FERRE et al. <sup>116</sup> O cálculo é feito para  $i$  amostras de calibração e o coeficiente de regressão é determinado por mínimos quadrados entre o vetor **nas** e o vetor de concentrações **y**. O modelo de regressão pode ser representado por:

$$\hat{y} = \hat{b}_{nas} \hat{\mathbf{nas}} + E$$

Quando os dados são centrados na média para a construção do modelo de calibração, o vetor **nas** precisa ser corrigido para evitar um erro de sinal que é introduzido pelo uso na norma Euclidiana, antes da determinação do coeficiente de regressão  $\hat{b}_{nas}$ .

### 3.1.3 - Aplicações de calibração multivariada em LIBS

De acordo com a literatura, os métodos quimiométricos em LIBS que exploram métodos de classificação empregam análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*)<sup>29,30,52,117,118</sup>, modelagem independente por similaridade de classes (SIMCA, do inglês *Soft Independent Modeling by Class Analogy*)<sup>119-122</sup> e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais para análise discriminante (PLSDA)<sup>122-128</sup>.

Entre os trabalhos de classificação, SAMUELS et al.<sup>129</sup> utilizaram LIBS para o estudo de esporos de bactérias, mofo, polens e proteínas. A análise por PCA permitiu a separação entre os diferentes biomateriais em três grupos: polens, mofo e bactérias, sendo utilizadas linhas Ca, K, Mn, Na e Mg, C, H, O e N e espécies moleculares CN e CaO na classificação.

MUNSON et al.<sup>119</sup> classificaram agentes biológicos e químicos utilizando PCA e SIMCA, estudaram a influência da seleção de variáveis, a média de vários espectros e a relação das intensidades dos sinais. Melhores resultados foram obtidos com a média dos espectros e com as relações das intensidades dos sinais.

CORSI et al.<sup>130</sup> usaram a técnica LIBS para analisar 12 amostras arqueológicas. Ag, Al, As, Ca, Fe, Mg, Na, Pb, Sb e Si foram avaliados para determinação quantitativa e classificação, Cu não contribuiu significativamente para a classificação, uma vez que era o principal elemento da matriz. As amostras foram classificadas com base na composição elementar por PCA.

Os métodos quantitativos com calibração multivariada em LIBS empregam PLSR<sup>20-22,27,30,107,131-133</sup>, PCR<sup>27,40,132,134,135</sup> ou ANN<sup>136-138</sup>.

O trabalho inicial com calibração multivariada para análise quantitativa em LIBS foi realizado por PALANCO e LASERNA<sup>139</sup>. PLSR foi empregada para prever a composição elementar<sup>140,141</sup> e caracterizar<sup>20</sup> amostras de indústrias de jóias e para estudar efeitos de matriz em amostras de aço<sup>107,139</sup>.

SIRVEN et al.<sup>137</sup> determinaram cromo em solos por LIBS, onde os resultados por regressão univariada, PLS e ANN, diferentes tipos de normalização dos sinais e seleção de variáveis foram comparados. A influência de diversos parâmetros foi estudada em detalhe, assim como o efeito de pré-tratamento nos diferentes espectros. ANN apresentou um melhor desempenho, que é atribuído à capacidade de modelar as não linearidades dos sinais de auto-absorção.

FINK et al.<sup>27</sup> empregaram PLS, PCR e algoritmos genéticos na seleção de variáveis para determinar elementos em termoplásticos recicláveis. Segundo os autores, a utilização de PLS e o algoritmo genético melhoraram a exatidão e precisão dos resultados e resultados de testes em uma unidade de reciclagem indicaram que o método pode ser aplicado em um processo on-line para análises de rotina.

PANNE et al.<sup>142</sup> empregaram PLS nos dados obtidos com LIBS para determinar os principais constituintes do vidro. As 23 amostras disponíveis foram divididas em um conjunto de calibração (19 amostras) e validação (4 amostras). Obtiveram-se as relações de concentração de  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e  $\text{CaO}$ .

GARCIA-AYUSO et al.<sup>20</sup> analisaram ligas de jóias com Au-Ag-Cu, para obter informação qualitativa e quantitativa, com o objetivo de estabelecer um método rápido, não-destrutivo e exato. O método foi desenvolvido empregando a otimização dos fatores que poderiam influenciar o desempenho instrumental (a formação do plasma e energia do laser) e na calibração multivariada por PLS. Os resultados confirmaram a boa previsão do modelo PLS para análise de Au e Ag em peças de jóias.

LUQUE-GARCÍA et al.<sup>143</sup> determinaram Ag, Cu e Ca em amostras de minério e rocha por LIBS. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos por GFAAS (para Ag e Cu) e FAAS (para Ca) e confirmaram a boa capacidade de previsão do modelo PLS.

MARTIN et al.<sup>30</sup> utilizaram LIBS, PLS e PCA para identificar substâncias utilizadas no tratamento e conservação de madeira. Verificaram que a análise multivariada dos espectros de LIBS tem um grande potencial para identificar e medir elementos inorgânicos em tratamentos de preservação da madeira. Foi possível classificar a madeira tratada por diferentes conservantes. O modelo PLS foi construído para prever concentrações de Cu e Zn.

SIRVEN et al.<sup>137</sup> utilizaram LIBS para determinar Cr em amostras de solos. Um estudo comparativo foi realizado entre o método padrão de calibração e duas técnicas quimiométricas PLS e redes neurais. As três técnicas foram avaliadas em termos de exatidão, precisão e limite de detecção. A influência de diversos parâmetros foi estudada em detalhe, assim como o efeito de pré-tratamento nos diferentes espectros. PCA foi empregada para classificar espectros de dois solos diferentes. Melhores resultados foram obtidos com as redes neurais que apresentaram melhor exatidão e precisão.

Outras aplicações de análise multivariada em LIBS incluem amostras de aço<sup>131,144</sup>, escória<sup>145,146</sup>, solos<sup>147,148</sup> e vidro<sup>149</sup>. Neste contexto, a combinação de LIBS com métodos quimiométricos tem sido empregada com sucesso para analisar diferentes amostras.

## **3.2 - Parte experimental**

### **3.2.1 - Preparo das amostras**

A microheterogeneidade é uma característica intrínseca da maioria dos tecidos vegetais e pode representar uma dificuldade para as técnicas microanalíticas, entre as quais aquelas que se baseiam na ablação com laser, particularmente LIBS. A maneira mais usual para contornar esse tipo de problema é reduzir o tamanho das partículas das amostras utilizando

procedimentos de moagem. Neste sentido, avaliaram-se diferentes tempos de moagem em moinho criogênico (Spex model 6800) com etapa de pré-congelamento de 5 min seguida por diferentes ciclos de moagem de 2 min cada e intervalos de re-congelamento de 1 min. Para este estudo utilizaram-se folhas de cana-de-açúcar da variedade 12 CTC, sem a nervura central, e folhas de soja.

Fizeram-se análises da distribuição do tamanho de partículas e caracterização das crateras formadas na superfície das pastilhas para os diferentes tempos de moagem. A análise da distribuição do tamanho de partículas foi feita no Laboratório de Processos Químicos e Tecnologia de Partículas (LPP) do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT). As análises foram feitas a seco, com a técnica de espalhamento de laser de baixo ângulo em analisador modelo LS 13 320 Tornado Dry Powder System (Beckman Coulter). Efetuaram-se as análises com base na norma ISO 13320-1:1999(E).

As micrografias das crateras foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As análises foram feitas no Laboratório de Caracterização Tecnológica (LCT) do Departamento de Engenharia de Minas e Petróleo da Escola Politécnica da USP. As amostras foram recobertas com platina durante 80s no metalizador modelo MED 020 (Bal-Tec). As microscopias das crateras foram feitas em um microscópio eletrônico de varredura LEO, modelo Stereoscan 440, com detector de elétrons secundários.

Avaliaram-se os efeitos da distribuição do tamanho das partículas com auxílio das micrografias e dos espectros de emissão obtidos por LIBS na condição otimizada. Para tanto, folhas de cana-de-açúcar foram moídas durante 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min e folhas de soja durante 10, 20, 30, 40 e 60 min.

As pastilhas foram preparadas em prensa (Spex modelo 3624B X-Press), transferindo-se 0,5 g do material para recipiente apropriado e aplicando-se  $8,0 \text{ ton cm}^{-2}$  durante 5 min.

### 3.2.2 – Amostras de diferentes culturas e materiais de referência certificados

Para a construção e validação dos modelos de calibração para amostras de vegetais de diferentes culturas, utilizaram-se 19 amostras, constituídas por 7 materiais de referência certificados (CRMs) e 12 amostras de diferentes culturas (TABELA 3.1).

TABELA 3.1 - Materiais de referência certificados e amostras de folhas de diferentes espécies de plantas para calibração e validação dos modelos de regressão por PLS e univariado.

Materiais de Referência Certificados		Amostras	
Código*	Especificação	Nome científico	Nome popular
BCR 60	Planta aquática	<i>Brachiaria decumbens</i>	braquiária
BCR 61	Musgo aquático	<i>Musa paradisiaca</i>	bananeira
BCR 62	Folhas de oliveira	<i>Coffea arabica</i>	cafeeiro
GBW 07603	Parte aérea de arbustos	<i>Artocarpus integrifolia</i>	jaqueira
NIST 1515	Folhas de macieira	<i>Zea mays</i>	milho
NIST 1547	Folhas de pessegueiro	<i>Piper nigrum</i>	pimenta
NIST 1570a	Folhas de espinafre	<i>Glycine max</i>	soja
		<i>Psidium guaiava</i>	goiabeira
		<i>Saccharum officinarum L.</i>	cana-de-açúcar
		<i>Axonopus obtusifolius</i>	grama**
		<i>Mangifera indica</i>	mangueira

\* BCR: Community Bureau of Reference; GBW: National Research Centre for CRMs; NIST: National Institute of Standards and Technology

\*\* 2 amostras

### 3.2.3 - Amostras de folhas de cana-de-açúcar

Utilizou-se um conjunto de 67 amostras de folhas de cana-de-açúcar de diferentes variedades para a construção e validação dos modelos de calibração. As variedades das amostras são mostradas na TABELA 3.2.

TABELA 3.2 - Variedades de folhas de cana-de-açúcar utilizadas para calibração e validação dos modelos PLSR.

<b>Amostras de folhas de cana-de-açúcar</b>			
<b>Variedade</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>Variedade</b>	<b>Número de amostras</b>
RB 855536	6	CTC 5	2
RB 855035	7	CTC 6	1
RB 855036	8	CTC 7	1
RB 855113	8	CTC 8	1
RB 845486	6	CTC 9	1
RB 867515	1	CTC 10	1
RB 855453	1	CTC 11	1
SP 813250	8	CTC12	1
IAC 93-6006	1	CTC 13	1
IAC 91-1099	1	CTC14	1
IAC87-3396	1	CTC 15	1
CTC 1	1	CTC16	1
CTC 2	1	CTC 17	1
CTC 3	1	CTC 18	1
CTC 4	1		



### 3.2.4 - Modelos de regressão por mínimos quadrados parciais

Os espectros LIBS foram obtidos na condição experimental estabelecida na etapa de otimização para macro, micronutrientes, Al e Si. Cada espectro foi resultante da média de 10 espectros acumulados após 25 pulsos cada um, obtendo-se 3 espectros médios de 250 pulsos para cada amostra.

A análise de componentes principais foi empregada para separar o conjunto de amostras para calibração e validação e identificar as correlações obtidas do conjunto de dados e possíveis amostras anômalas. A PCA apresenta como características a capacidade de extrair informações relevantes de um conjunto de dados, além de auxiliar na redução da dimensão original dos dados, na seleção de variáveis importantes, na detecção de amostras anômalas (*outliers*), e na construção dos modelos de classificação e previsão <sup>150</sup>.

Como pré-processamento, os dados foram centrados na média, o que consiste em calcular a média dos dados de determinada coluna e, em seguida, subtraí-la de cada dado original. Neste caso, as médias das variáveis são igualadas a zero. Dados centrados na média são comumente recomendados para o tratamento de dados espectrais <sup>151</sup>.

Os modelos de regressão por mínimos quadrados parciais para amostras de diferentes culturas foram construídos com as regiões espectrais selecionadas para cada elemento, que apresentavam as linhas mais intensas dos elementos, catalogadas na base de dados do NIST <sup>102</sup>.

Para as amostras de folhas de cana-de-açúcar utilizaram-se PLSR e iPLS para construir os modelos de calibração. Utilizou-se iPLS para selecionar as regiões espectrais, testando-se entre 10 e 50 intervalos espectrais para cada elemento.

Para determinar o número de variáveis latentes (VLs), utilizou-se a validação cruzada “*leave one out*”. Selecionou-se o número de variáveis latentes

com base nos menores valores da raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada, determinado como:

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad \text{Equação 6}$$

onde  $n$  é o número de amostras de calibração,  $y$  são os valores de referência e  $\hat{y}_i$  são os valores estimados.

Utilizou-se o teste de “leverage” para identificar amostras anômalas, isto é, amostras que apresentavam, no seu espectro de emissão, ao menos uma característica diferente, comparativamente ao restante do conjunto dos espectros. A presença de amostras anômalas no conjunto de calibração pode conduzir a modelos com baixa capacidade de previsão <sup>110</sup>. O termo “leverage” pode ser descrito como a distância entre a amostra e a média do conjunto de dados no espaço dos componentes principais <sup>110,152</sup>.

Os limites de detecção (LOD) foram estimados como 3,3 vezes a estimativa do ruído ( $s_x$ ) presente nas proximidades da linha ou região do analito dividida pela sensibilidade (SEN) ( $\text{LOD}=3,3s_x/\text{SEN}$ ) <sup>153</sup>.

Realizaram-se os cálculos para a construção dos modelos, a partir do pacote PLS -Toolbox para uso em ambiente Matlab® utilizando-se o procedimento de validação cruzada revezando uma amostra por vez (*leave one out*) por blocos contínuos. O programa para os cálculos do PLS por intervalos foi desenvolvido e concedido por NØRGAARD et al. <sup>112</sup>.

Materiais de referência certificados (CRMs) foram usados para validação do procedimento de decomposição ácida e determinação por ICP OES. Os CRMs utilizados são mostrados na TABELA 3.3.

TABELA 3.3 -. Materiais de referência certificados utilizados na validação do procedimento de decomposição.

<b>Código*</b>	<b>Especificação</b>
NIST 1515	Folhas de macieira
NIST 1547	Folhas de pessegueiro
NIST 1570a	Folhas de espinafre
NIST 1575a	Acículas de pinus
NIST 1573	Folhas de tomateiro

\*NIST: National Institute of Standards and Technology

### 3.2.5 - Preparo das amostras para o método comparativo

Para comparar os resultados obtidos por LIBS com aqueles obtidos por ICP OES, as amostras moídas durante 40 min em moinho criogênico foram digeridas em triplicada em forno de micro-ondas modelo ETHOS 1600 (Milestone, Itália), transferindo-se 250 mg de cada amostra para frascos de digestão (TFM<sup>®</sup>) e adicionando-se 6,0 ml de HNO<sub>3</sub> 20% v/v e 2,0 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m/m em cada frasco. Os frascos de TFM foram acondicionados individualmente em cilindros de proteção de PEEK, fechados e fixados em rotor apropriado para 10 amostras. O rotor foi devidamente instalado na cavidade do forno de micro-ondas e um programa para digestão das amostras foi utilizado (TABELA 3.4).

Após o resfriamento, a solução da amostra digerida foi transferida para tubos tipo Falcon<sup>®</sup>, completando-se o volume para 25 ml com água purificada em sistema Milli-Q. Os digeridos foram analisados em espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (Varian, Vista RL), cujos parâmetros operacionais são mostrados na TABELA 3.5.

TABELA 3.4 - Programa utilizado para digestão das amostras

Etapa	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Potência (W)
1	3	120	1000
2	2	120	0
3	4	160	1000
4	5	220	1000
5	15	220	1000

TABELA 3.5 - Parâmetros operacionais utilizados nas análises por ICP OES.

Parâmetros Operacionais		
Potência aplicada (kW)		1,3
Vazão do gás do plasma (l min <sup>-1</sup> )		15,0
Vazão do gás auxiliar (l min <sup>-1</sup> )		0,5
Vazão do gás de nebulização (l min <sup>-1</sup> )		0,7
Vazão da amostra (ml min <sup>-1</sup> )		1,0
Altura de observação (mm)		15
Diâmetro interno do canal central da tocha (mm)		2,0
Tempo de integração (s)		1 - 5
Número de replicatas		3
Linhas de emissão (nm)	P I 214,914	Fe II 259,940
	K I 766,491	Cu I 327,396
	Ca II 393,366	Zn I 213,855
	Mg II 280,270	B II 249,772
	Mn II 257,610	Al I 309,271

### 3.3 - Resultados e Discussão

#### 3.3.1 – Efeito do tempo de moagem das amostras para o preparo das pastilhas.

O tempo de moagem é um parâmetro importante para obtenção de partículas com tamanhos apropriados para as análises por LIBS. De acordo com ZEISLER<sup>154</sup>, a distribuição do tamanho das partículas é o fator mais importante para se caracterizar a homogeneidade dos materiais e contribui para a determinação da massa mínima que deverá ser amostrada. Os tempos de moagem e a respectiva caracterização do tamanho das partículas para folhas de cana-de-açúcar são mostrados na TABELA 3.6. Como esperado, observa-se variação na distribuição do tamanho das partículas em função dos tempos de moagem.

A partir de 30 min de moagem obtiveram-se partículas com tamanhos médios  $<20 \mu\text{m}$  e 95% das partículas menores que  $60 \mu\text{m}$ . Desta maneira, há uma indicação de que 30 min de moagem são suficientes para análise de folhas de cana-de-açúcar por LIBS.

Em analogia com a recomendação de ROSSBACH e ZEILLER<sup>155</sup> para o preparo de materiais de referência adequados para técnicas microanalíticas, as partículas dos materiais moídos devem exibir um tamanho máximo  $\leq 50 \mu\text{m}$  e distribuição de tamanho relativamente estreita. Assim, da mesma forma que a distribuição de tamanho de partículas pode ser crítica para a produção de materiais de referência, as mesmas precauções podem, em princípio, ser recomendadas para os materiais foliares moídos visando às análises por LIBS.

A distribuição do tamanho das partículas pode afetar diretamente a qualidade das pastilhas produzidas e a eficiência de vaporização/excitação do material ablado. Em trabalho sobre ablação com laser e ICP-MS, observou-se

que amostras de solos e sedimentos com menores tamanhos de partículas apresentaram pastilhas mais uniformes e compactas, resultando em um processo de ablação por laser mais efetivo e reprodutível <sup>156</sup>.

O tamanho das partículas é um fator físico que afeta as análises de amostras sólidas por LIBS. Como esperado, crateras mais uniformes foram observadas nas pastilhas produzidas com amostras moídas que apresentaram menores diâmetros médios e 90% das partículas < 60  $\mu\text{m}$  (FIGURAS 3.2 e 3.3).

TABELA 3.6 - Tamanhos das partículas em função do tempo de moagem criogênica para folhas de cana-de-açúcar, variedade 12 CTC.

Tempo de moagem (min)	Tamanho médio das partículas ( $\mu\text{m}$ )	Intervalo ( $\mu\text{m}$ )
10	39	1,57 - 257
20	25	1,16 - 177
30	18	0,99 - 122
40	16,5	0,99 - 122
50	14,5	0,88 - 101
60	15	0,95 - 111

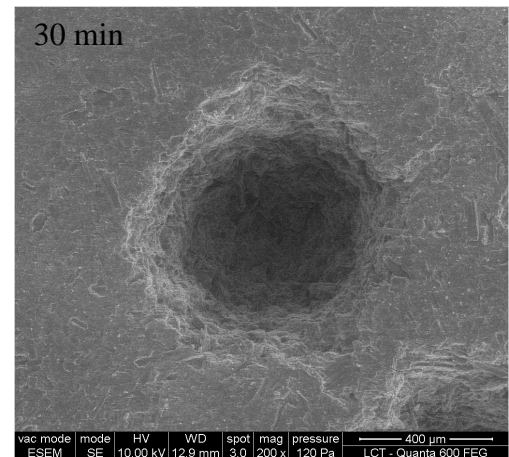
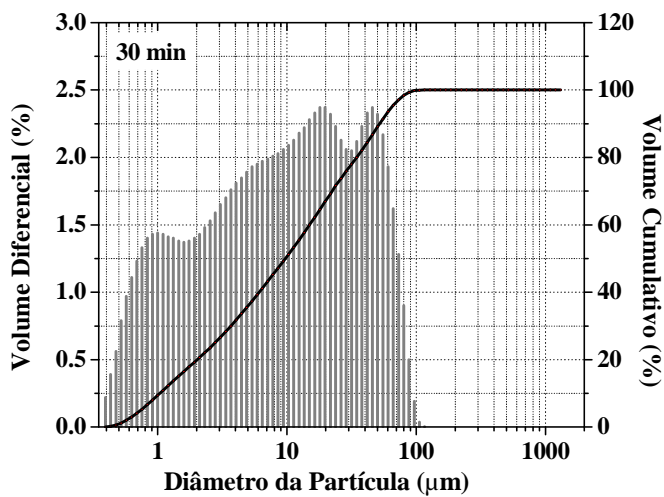
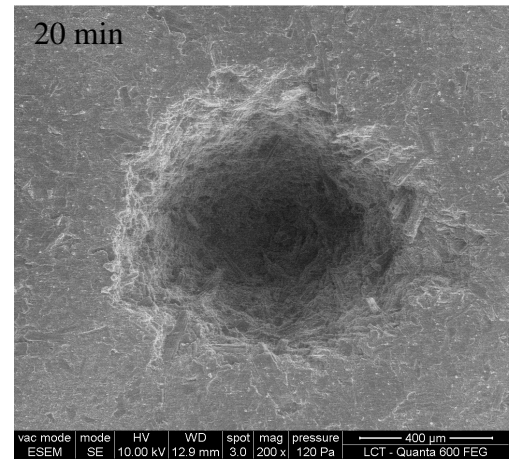
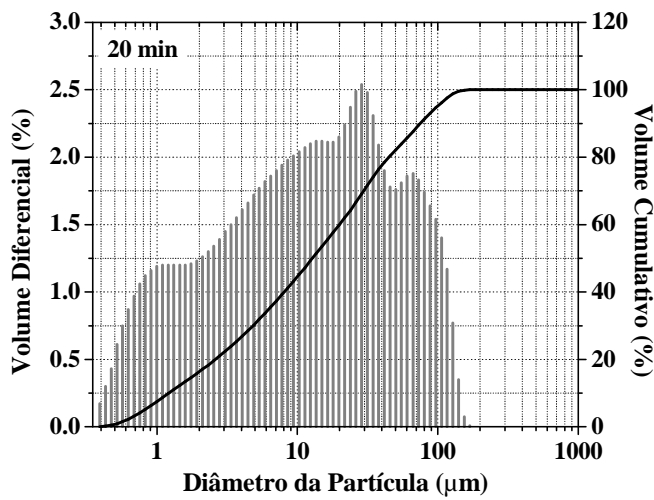
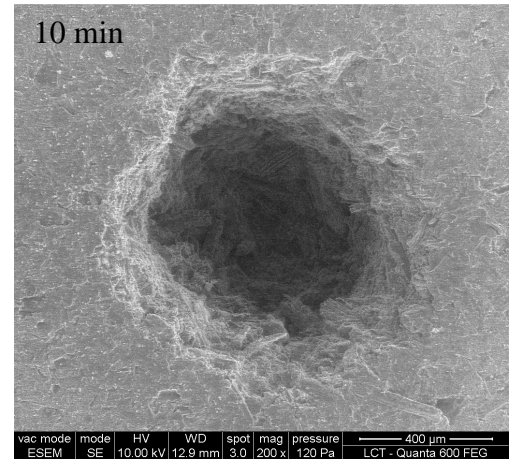
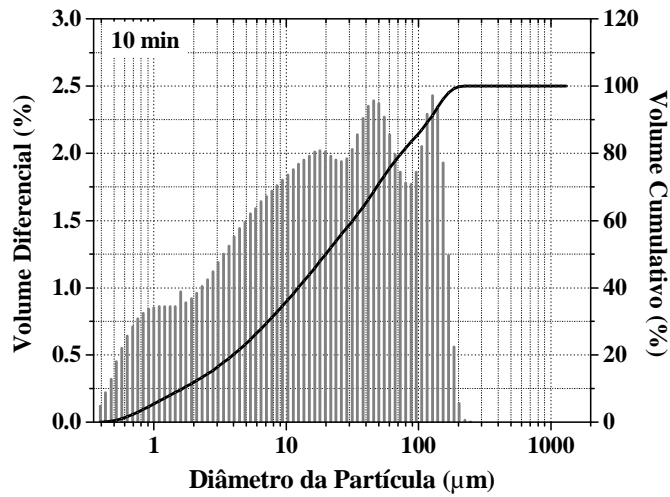


FIGURA 3.2 - Distribuição do tamanho das partículas e respectivas micrografias obtidas por MEV em folhas de cana-de-açúcar (variedade 12 CTC) após 10, 20 e 30 min de moagem criogênica.

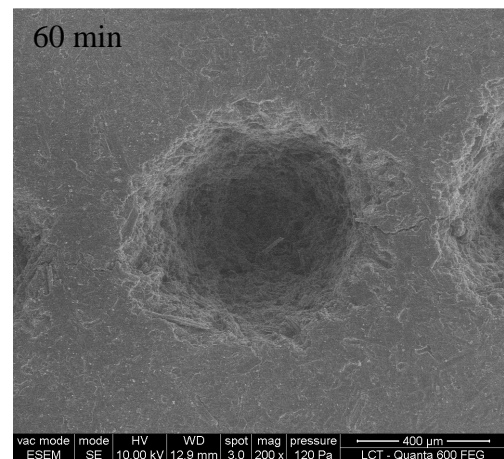
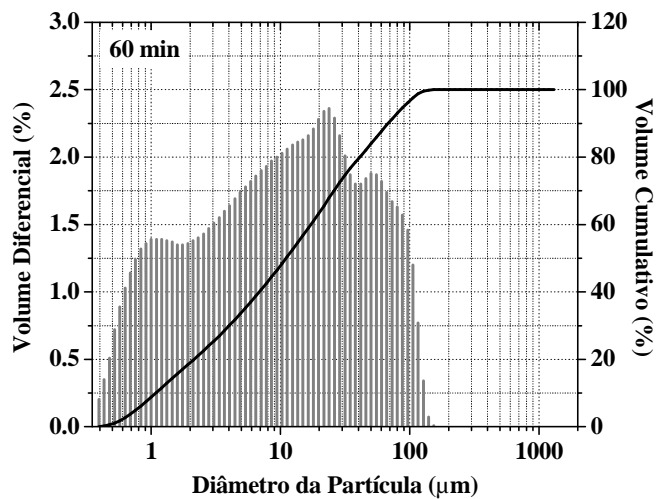
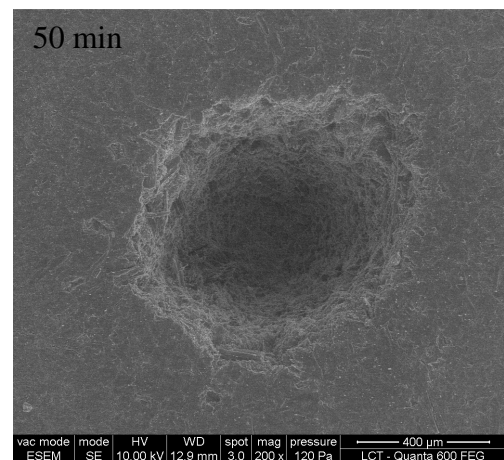
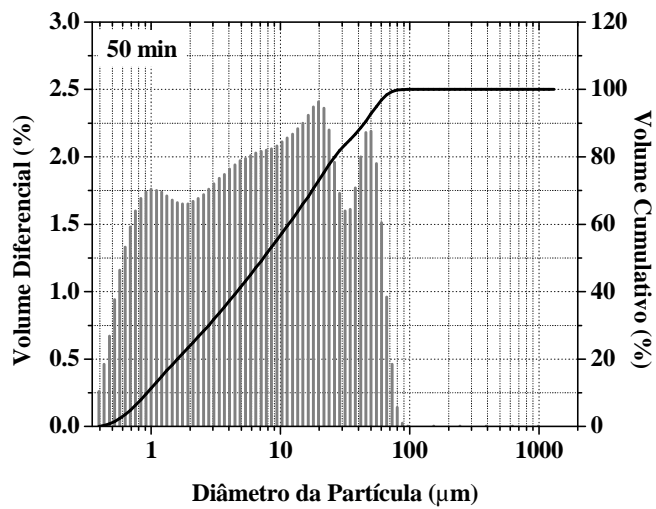
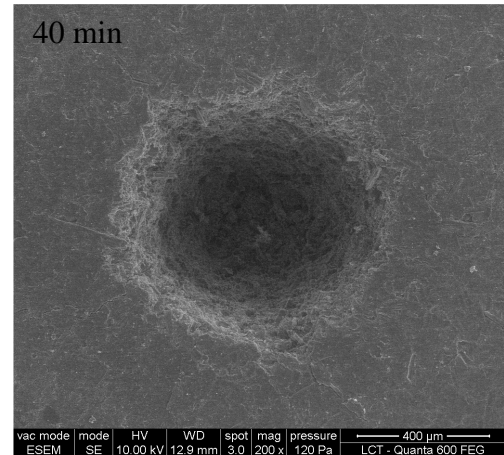
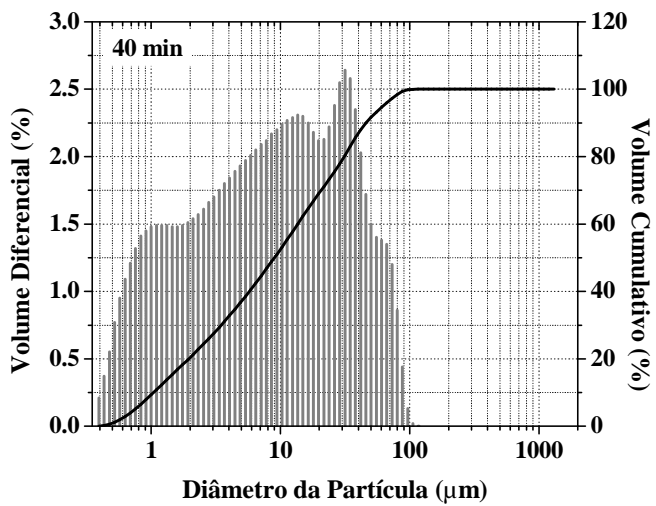


FIGURA 3.3 - Distribuição do tamanho das partículas e respectivas micrografias obtidas por MEV em folhas de cana-de-açúcar (variedade 12 CTC) após 40, 50 e 60 min de moagem criogênica.



As variações dos sinais analíticos em função do tempo de moagem são mostradas nas FIGURAS 3.4 e 3.5. Obtiveram-se coeficientes de variação menores que 10% em todos os tempos avaliados, com exceção do K que variou de 10 a 30%.

De um modo geral, maiores sinais de emissão foram obtidos com pastilhas preparadas com amostras cominuídas por, no mínimo, 30 min. Estes resultados indicam uma dependência dos sinais de emissão em função do tamanho das partículas. Em princípio, a vaporização do material deve ser favorecida pelas mudanças em algumas características das pastilhas, como a densidade e porosidade, propriedades que podem afetar a interação laser-amostra e, conseqüentemente, a sensibilidade. Como já foi mencionado, melhor homogeneidade foi obtida com, pelo menos, 30 min de moagem. Como a partir de 40 min não houve diferença significativa na distribuição do tamanho das partículas, fixou-se este tempo de moagem para a preparação das pastilhas.

Para verificar possível contaminação durante a moagem criogênica, as amostras foram digeridas em triplicata de acordo com o procedimento descrito no item 3.4.3, e os digeridos foram analisados por ICP OES. Pode-se observar (FIGURAS 3.6 e 3.7) que não houve diferença entre os valores obtidos, o que permite inferir que o processo de moagem destas amostras não contribuiu para a ocorrência de erros sistemáticos.

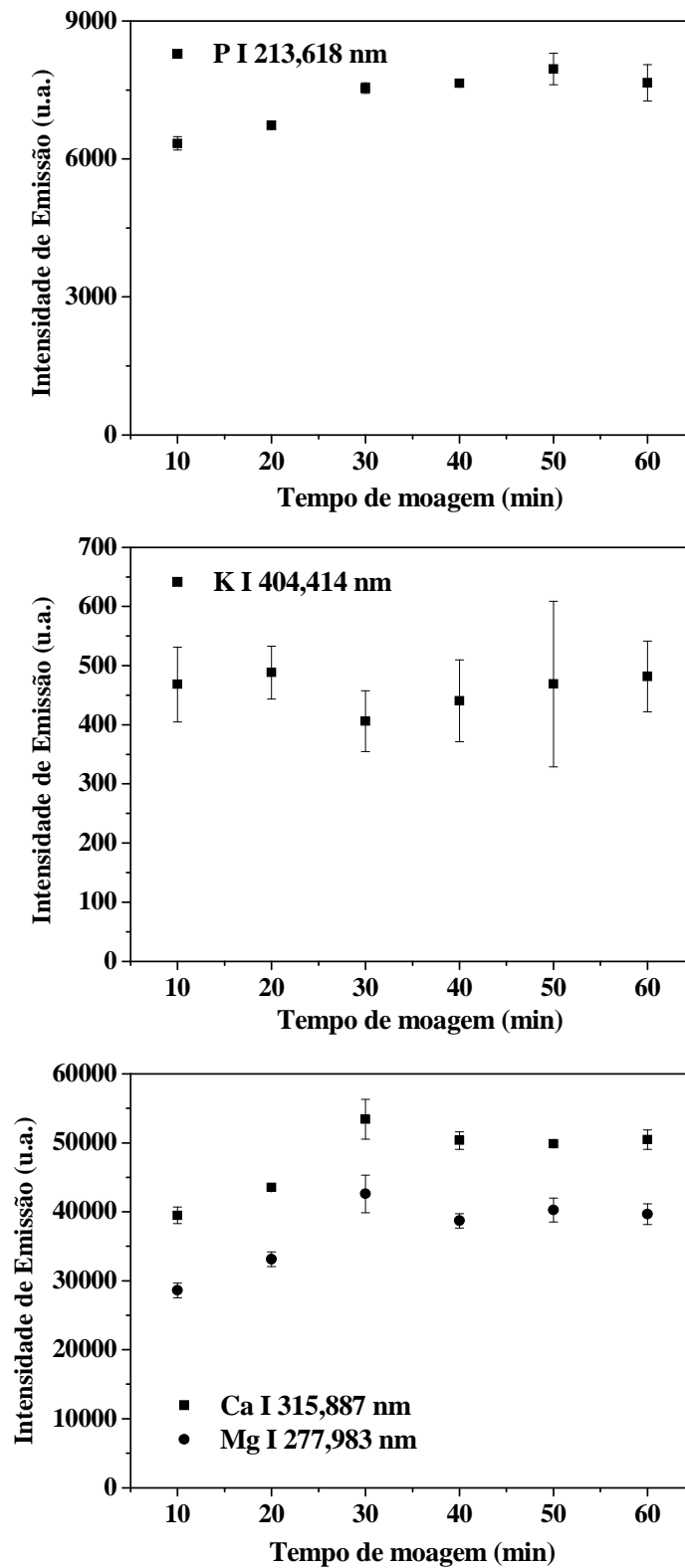


FIGURA 3.4 - Valores de intensidade de emissão de P, K, Ca e Mg em folhas de cana-de-açúcar, variedade 12 CTC, em diferentes tempos de moagem criogênica.

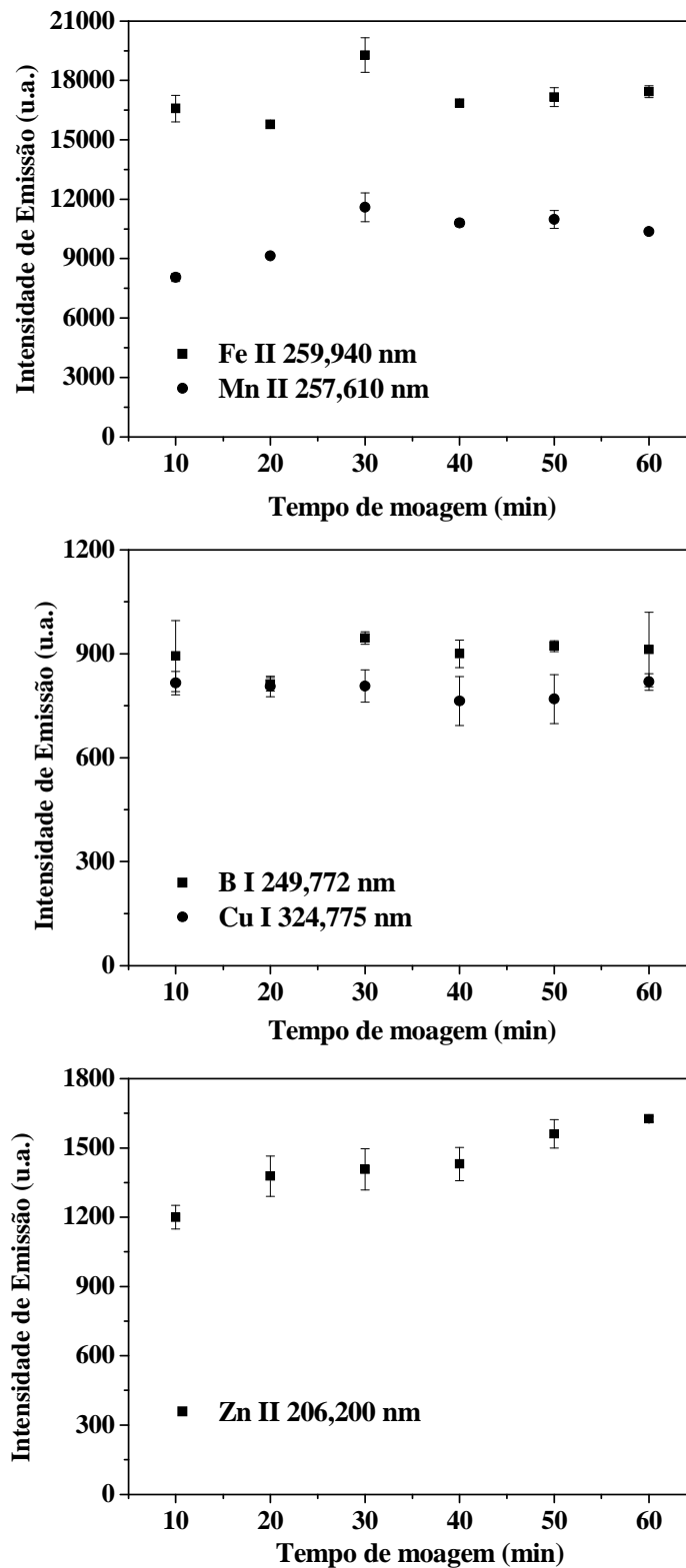


FIGURA 3.5 - Valores de intensidade de emissão de Mn, Fe, Cu, B e Zn em folhas de cana-de-açúcar, variedade 12 CTC, em diferentes tempos de moagem criogênica.

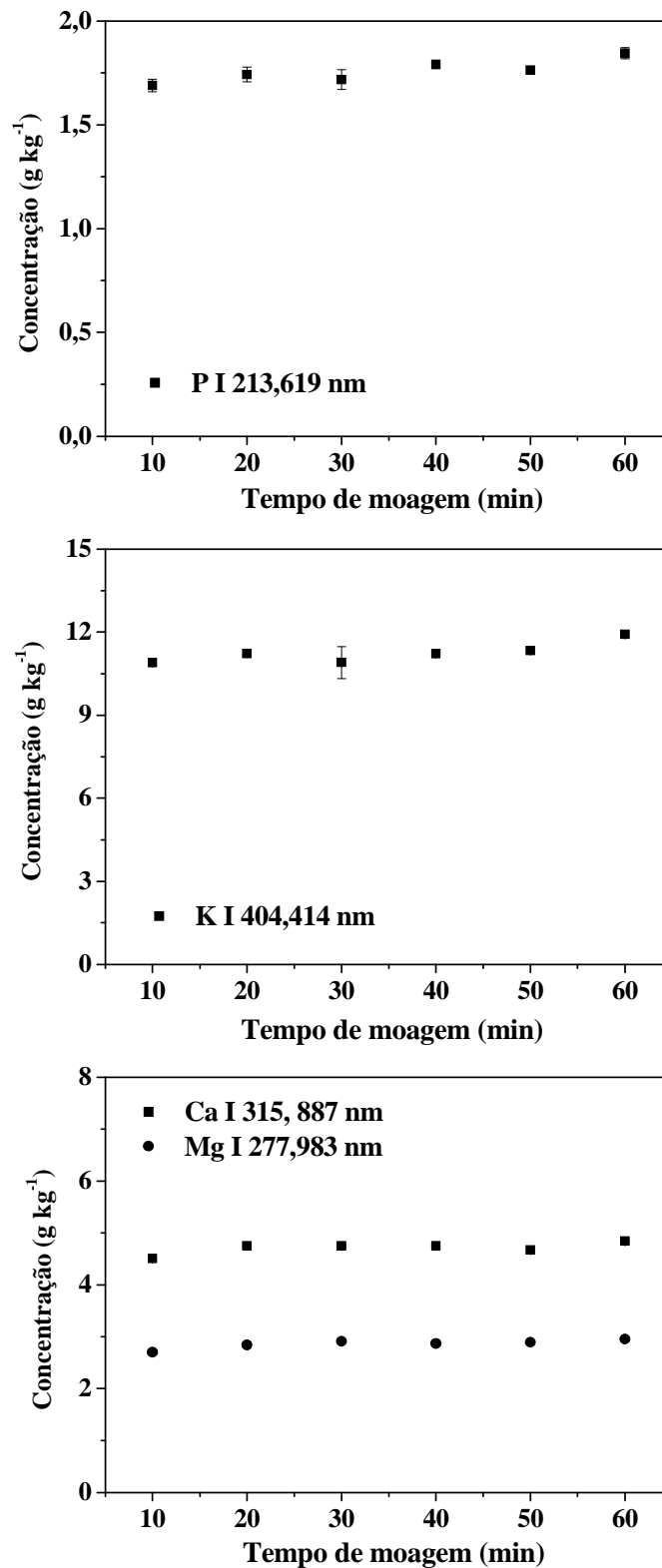


FIGURA 3.6 - Teores de P, K, Ca e Mg obtidos por ICP OES e respectivos desvios-padrão (n = 3) em folhas de cana-de-açúcar, variedade 12 CTC, em diferentes tempos de moagem criogênica.

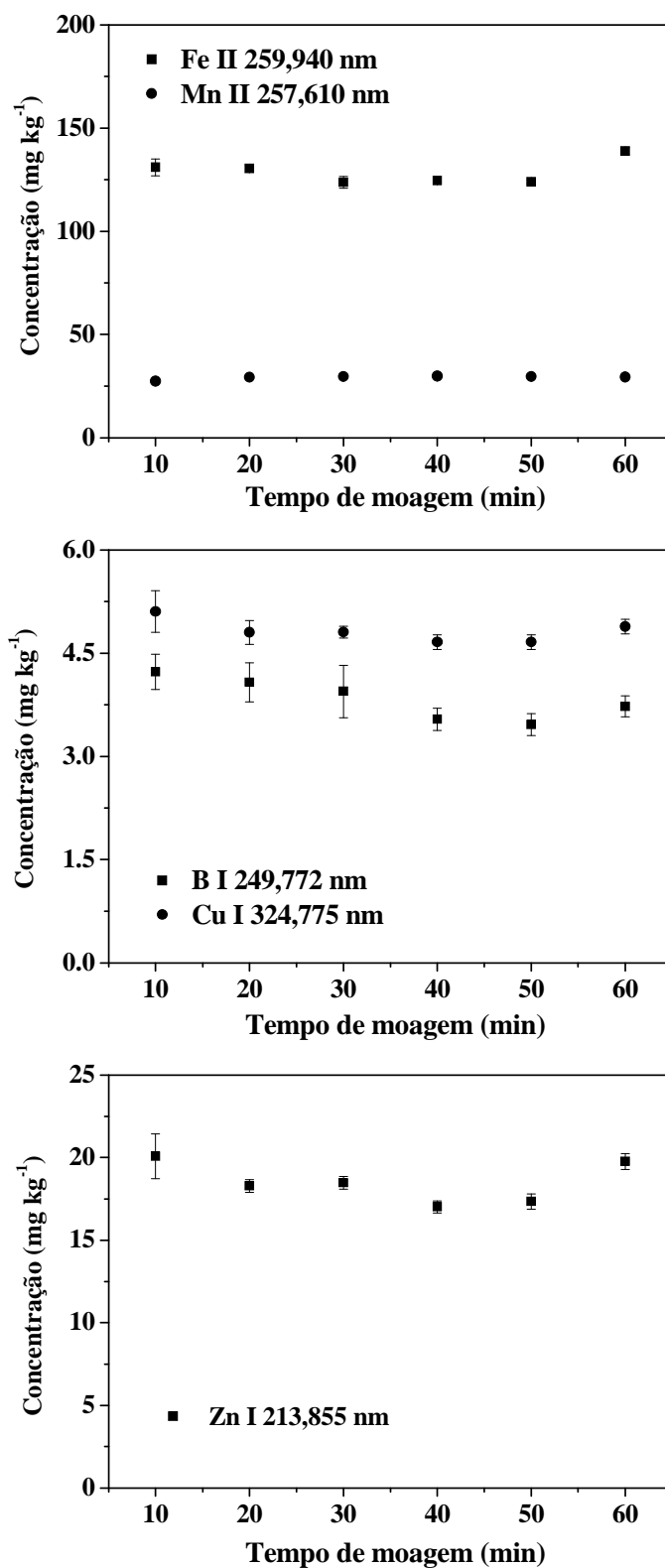


FIGURA 3.7 - Teores de Mn, Fe, Cu, B e Zn obtidos por ICP OES e respectivos desvios-padrão ( $n = 3$ ) em folhas de cana-de-açúcar, variedade 12 CTC, em diferentes tempos de moagem criogênica.

Utilizaram-se seis amostras de cana-de-açúcar (V5 IAC, V5 CTC, V10 CTC, V15 CTC, V18 CTC e RB 855453) para avaliar se a distribuição do tamanho das partículas era semelhante para as outras variedades, com 40 min de moagem. Os tamanhos médios e os intervalos das partículas são apresentados na TABELA 3.7 e os perfis da distribuição do tamanho das partículas são mostrados nas FIGURAS 3.8 e 3.9.

Observa-se pouca variação nos tamanhos médios e nos intervalos para as folhas moídas de diferentes variedades de cana-de-açúcar. Desta maneira, 40 min foram considerados suficientes para moer as folhas das variedades de cana-de-açúcar disponíveis no laboratório para análise por LIBS.

TABELA 3.7 - Tamanhos das partículas para diferentes variedades de cana-de-açúcar com 40 minutos de moagem criogênica.

Variedade	Tamanho médio das partículas ( $\mu\text{m}$ )	Intervalo ( $\mu\text{m}$ )
V5 IAC	21,3	1,18 - 177
V5 CTC	18	1,11 - 122
V10	22,3	1,00 - 161
V15	19,8	0,99 - 147
V18	21,9	1,08 - 177
RB 855453	19,45	1,16 - 134

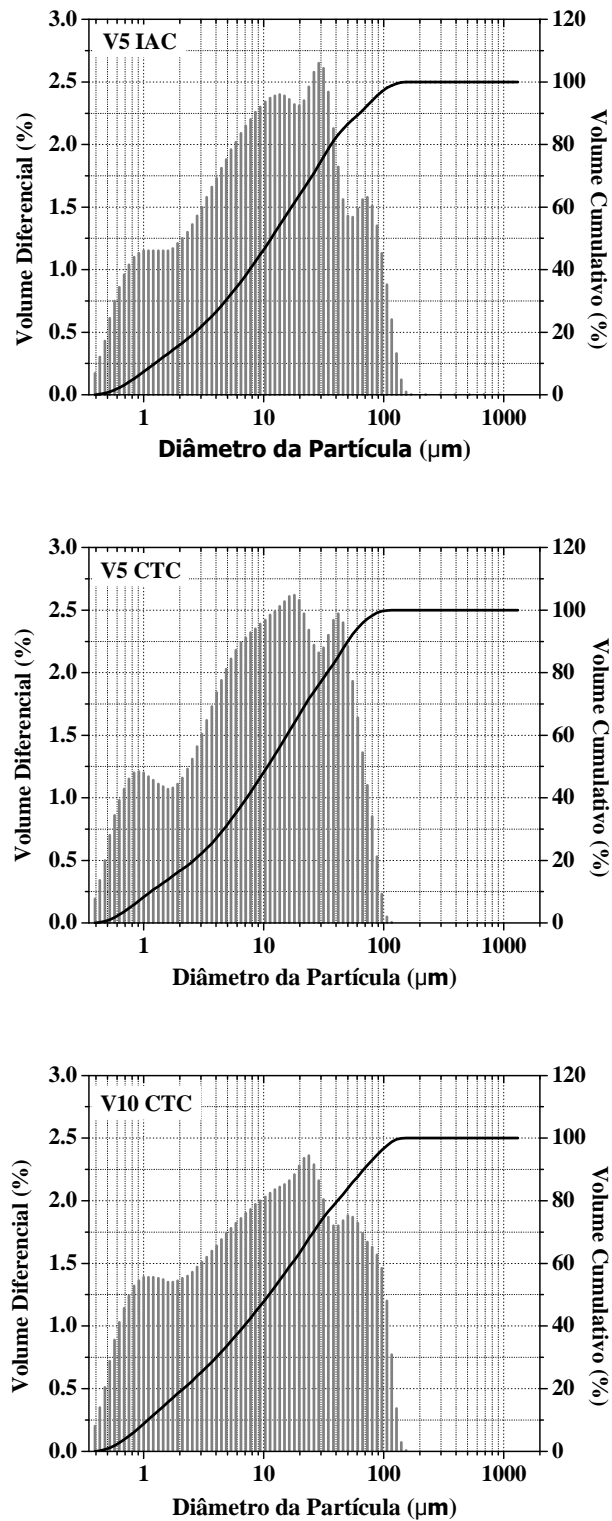


FIGURA 3.8 - Distribuição do tamanho das partículas com 40 min de moagem criogênica de folhas de cana-de-açúcar das variedades 5 IAC, 5 CTC e 10 CTC.

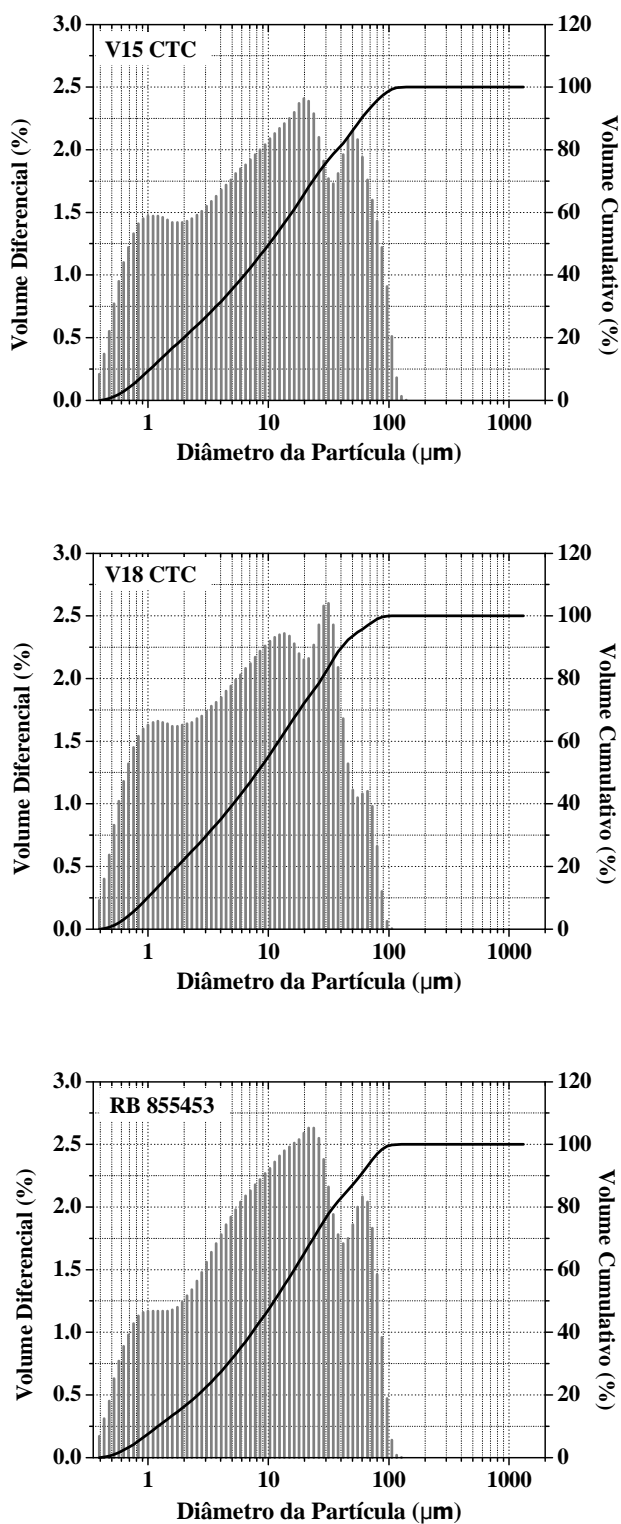


FIGURA 3.9 - Distribuição do tamanho das partículas com 40 min de moagem criogênica de folhas de cana-de-açúcar das variedades 15 CTC, 18 CTC e RB 855453.



### 3.3.2 – Análise de materiais de referência certificados

Conforme descrito no item 3.2.4, materiais de referência certificados foram usados para validação do procedimento de decomposição ácida no forno micro-ondas com cavidade e determinação por ICP OES.

Os resultados para macro e micronutrientes nas amostras de folhas de macieira (NIST 1515), pessegueiro (NIST 1547), espinafre (NIST 1570a), tomateiro (NIST 1573a) e acículas de pinus (NIST 1575a) são mostrados nas TABELAS 3.8 e 3.9.

TABELA 3.8 - Comparação entre os valores obtidos por ICP OES e os teores certificados de micronutrientes. Dados em mg/kg.

Elemento	NIST 1515		NIST 1570a		NIST 1547	
	ICP OES*	Certificado	ICP OES*	Certificado	ICP OES*	Certificado
B	27 ± 1,47	27 ± 2	39,9 ± 2,65	37,6 ± 1	28,5 ± 1	29 ± 2
Cu	5,9 ± 0,3	5,64 ± 0,24	13,0 ± 0,7	12,2 ± 0,6	3,6 ± 0,2	3,7 ± 0,4
Fe	81 ± 11	83 ± 5	266 ± 17	-	221 ± 7	218 ± 14
Mn	54 ± 5	54 ± 3	77,5 ± 3,8	75,9 ± 1,9	104 ± 3,4	98 ± 3
Zn	13,0 ± 2,7	12,5 ± 0,3	87 ± 5	82 ± 3	20 ± 1,6	17,9 ± 0,4
Al	285 ± 4	286 ± 9	290 ± 12	310 ± 11	265 ± 10	249 ± 8

Elemento	NIST 1575a		NIST 1573a	
	ICP OES*	Certificado	ICP OES*	Certificado
B	10,2 ± 2,7	9,60 ± 0,2**	32 ± 0,8	33,3 ± 0,7
Cu	3,5 ± 0,2	2,8 ± 0,2	5,0 ± 0,3	4,70 ± 0,14
Fe	51,5 ± 12	46 ± 2	358 ± 11	368 ± 7
Mn	477 ± 7	488 ± 12**	249,5 ± 4	246 ± 8
Zn	44 ± 9	38 ± 2	32 ± 1,6	30,9 ± 0,7
Al	598 ± 12	580 ± 30	574 ± 27,5	598 ± 12

- propriedade não certificada

\* n = 3 digeridos; concentração média ± 2 desvios-padrão

\*\* valor de referência

TABELA 3.9 - Comparação entre os valores obtidos por ICP OES e os teores certificados de macronutrientes. Dados em g/kg

Elemento	NIST 1515		NIST 1570a		NIST 1547	
	ICP OES*	Certificado	ICP OES*	Certificado	ICP OES*	Certificado
P	1,60 ± 0,09	1,59 ± 0,11	5,5 ± 0,30	5,18 ± 0,11	1,44 ± 0,05	1,37 ± 0,07
K	14,5 ± 1,7	16,1 ± 0,2	27,04 ± 1,9	29 ± 0,52	22,7 ± 1	24,3 ± 0,3
Ca	15,6 ± 1,0	15,26 ± 0,15	14,60 ± 0,57	15,27 ± 0,41	14,5 ± 0,4	15,6 ± 0,2
Mg	2,5 ± 0,2	2,71 ± 0,08	11,2 ± 0,6	-	4,8 ± 0,6	4,32 ± 0,08

Elemento	NIST 1575a		NIST 1573a	
	ICP OES*	Certificado	ICP OES*	Certificado
P	1,22 ± 0,23	1,07 ± 0,08	2,25 ± 0,06	2,16 ± 0,04
K	3,8 ± 0,8	4,17 ± 0,07	25,7 ± 0,5	27 ± 0,5
Ca	2,8 ± 0,6	2,5 ± 0,1	48 ± 0,21	50,5 ± 0,9
Mg	1,44 ± 0,3	1,06 ± 0,17**	13,6 ± 0,15	-

- propriedade não certificada

\* n = 3 digeridos; concentração média ± 2 desvios-padrão

\*\* valor de referência

Os resultados obtidos por ICP OES foram concordantes com os valores certificados. Para confirmar os resultados, aplicou-se o teste t, cujos resultados são mostrados na TABELA 3.10.

TABELA 3.10 - Valores de t calculado com 95% de confiança.

	NIST 1515	NIST 1570a	NIST 1547	NIST 1575	NIST 1573a
	$t_{\text{calculado}}$				
P	0,12	2,18	0,94	2,23	1,76
K	2,17	2,42	3,33	1,56	2,10
Ca	0,93	1,34	4,21	1,77	2,40
Mg	2,06	-	2,74	1,77	-
Mn	0,09	0,63	2,34	1,37	0,67
Fe	0,26	-	0,33	0,78	1,35
Cu	1,06	1,40	0,26	4,38	1,47
Zn	0,35	1,51	2,28	1,06	1,11
B	0,24	1,40	0,39	0,41	2,15
Al	0,14	2,10	2,25	0,96	1,41

Como o valor crítico para a distribuição t-Student com 95% de confiança é 2,45, encontraram-se diferenças significativas para K, Ca e Mg no NIST 1547 e Cu no NIST 1575. Desta maneira, o método para determinação dos elementos por ICP OES foi considerado válido para os estudos comparativos entre ICP OES e LIBS, e o mesmo procedimento de decomposição e determinação por ICP OES foi empregado para a análise das amostras.

### **3.3.3 - Calibração multivariada para determinação de macro e micronutrientes em amostras de diferentes culturas.**

Utilizaram-se espectros de 19 amostras compostas por materiais de referência certificados e folhas de plantas de diferentes culturas. Para separar as amostras para o conjunto de calibração e validação e identificar possíveis amostras anômalas, aplicou-se a PCA no conjunto de dados espectrais. Após a execução dos cálculos para a PCA, foram gerados gráficos de *scores* (PC1 x PC2). Para identificar a presença de amostras anômalas considerou-se um intervalo de 95% de confiança.

No gráfico de *scores* para o conjunto das 19 amostras (FIGURA 3.10), observa-se que a amostra BCR 61 apresentou-se como anômala e foi retirada do conjunto de dados. Uma nova PCA foi gerada com as 18 amostras (FIGURA 3.11), observando-se um rearranjo das amostras. A amostra BCR 60 também foi retirada do conjunto de dados e uma nova PCA foi gerada com as 17 amostras. Neste caso, nenhuma amostra apresentou-se como anômala (FIGURA 3.12) e as 17 amostras foram utilizadas.

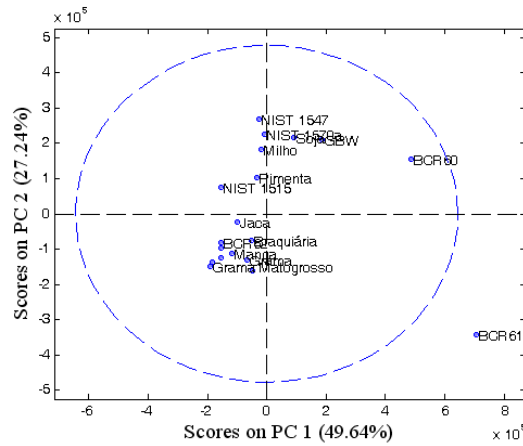


FIGURA 3.10 - Representação gráfica das duas componentes principais obtidas para 19 pastilhas de folhas de diferentes culturas.

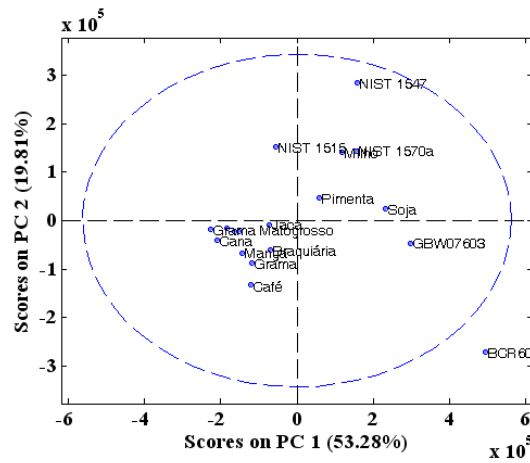


FIGURA 3.11 - Representação gráfica das duas componentes principais obtidas para 18 pastilhas de folhas de diferentes culturas.

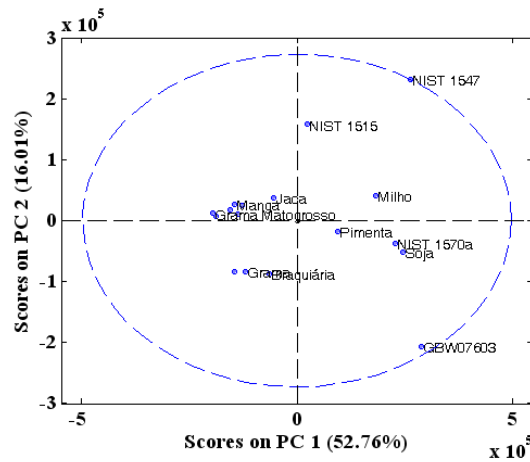


FIGURA 3.12 - Representação gráfica das duas componentes principais obtidas para 17 pastilhas de folhas de diferentes culturas.

A partir dos agrupamentos obtidos com a PCA, as amostras foram divididas em dois conjuntos: um com 13 amostras para construção dos modelos de regressão (amostras de calibração) e outro com 4 amostras para a validação (NIST 1570a, folhas de bananeira, gramínea e milho). As amostras de validação foram selecionadas entre as mais internas da dispersão. Os intervalos de concentração para macro e micronutrientes nas amostras de calibração são mostrados na TABELA 3.11.

TABELA 3.11 - Faixas de concentração de macro e micronutrientes do conjunto de amostras de calibração para folhas de diferentes culturas.

Elemento	Intervalo de concentração (g kg <sup>-1</sup> )
P	0,61 – 2,50
K	3,83 – 28,90
Ca	2,90 – 26,20
Mg	1,05 – 8,53
	Intervalo de concentração (mg kg <sup>-1</sup> )
Mn	24 – 1356
Fe	73 – 1010
Cu	3,5 – 37
Zn	9 – 80
B	3,5 – 63,5

Para a construção dos modelos de calibração multivariada por PLS com amostras de diferentes culturas, selecionaram-se as regiões espectrais para cada elemento de interesse, considerando as linhas mais intensas, de acordo com a base de dados do NIST<sup>102</sup>. As regiões selecionadas e os respectivos comprimentos de onda dos elementos são mostrados nas FIGURAS 3.13 e 3.14.

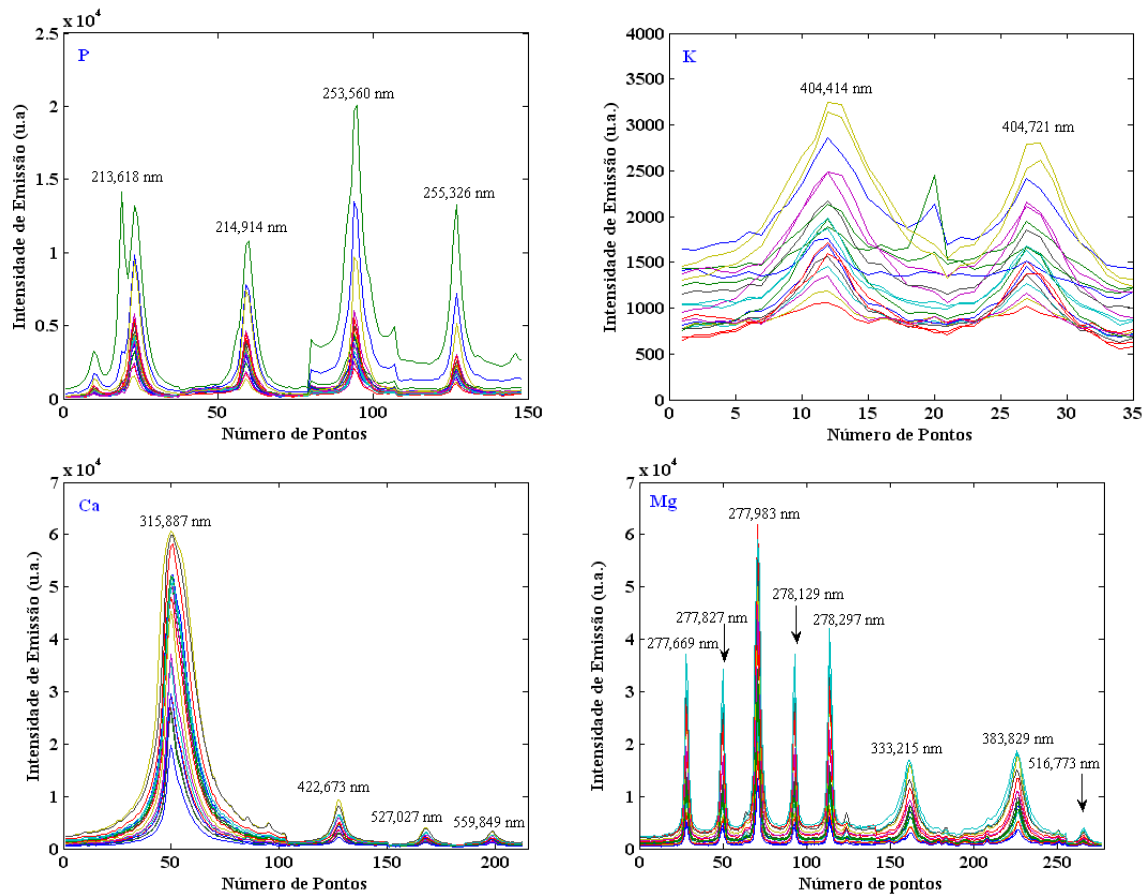


FIGURA 3.13 - Fragmentos espectrais de P, K, Ca e Mg utilizados nos modelos de regressão por PLS para amostras de diferentes culturas.

Os modelos de calibração univariada foram construídos de maneira convencional, com valores das áreas dos picos de emissão característicos dos elementos de interesse. Os comprimentos de onda utilizados para a construção das regressões foram selecionados entre os que apresentaram melhores resultados em termos de erros na estimativa da concentração das amostras de validação.

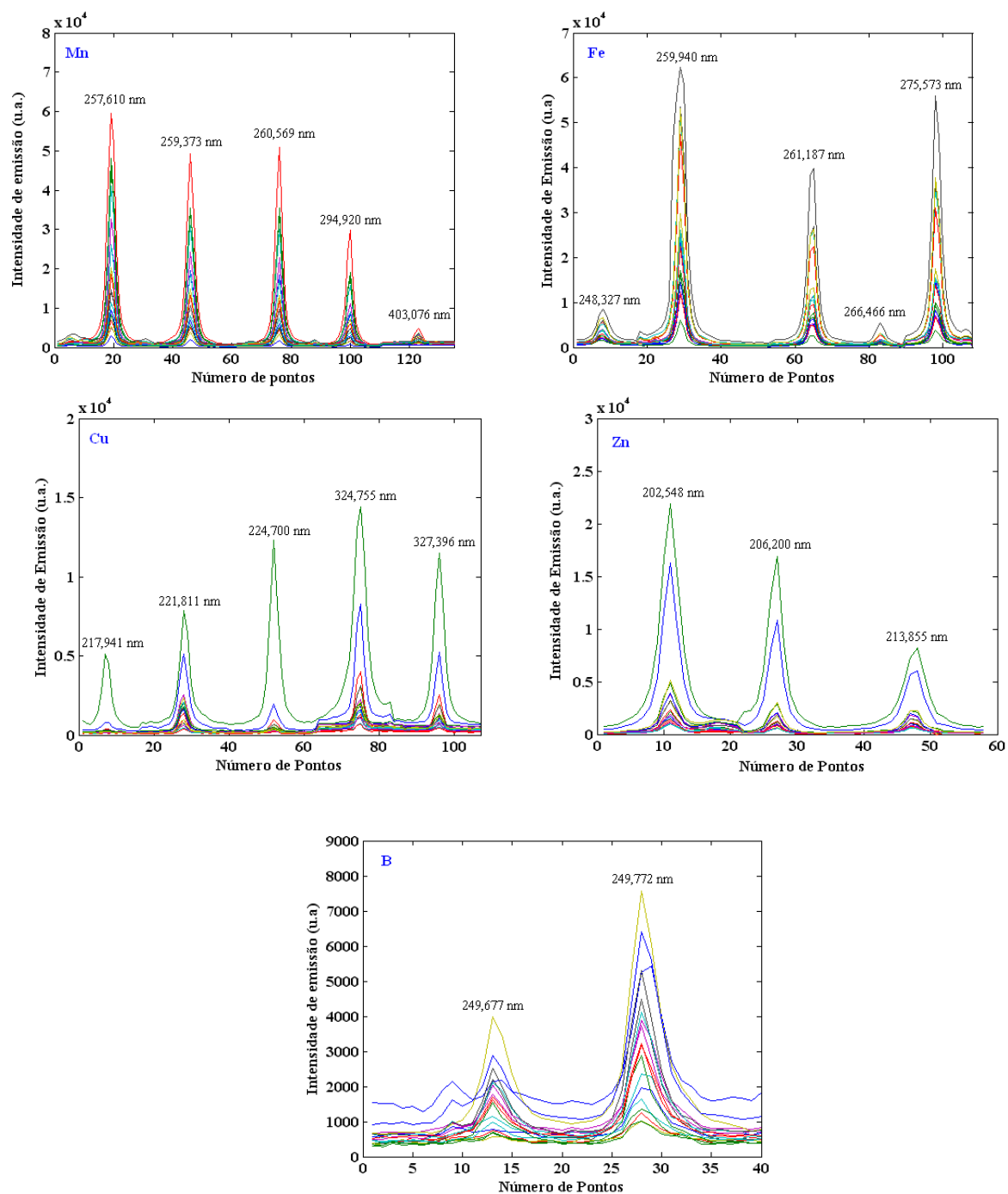


FIGURA 3.14 - Fragmentos espectrais de Mn, Fe, Cu, Zn e B utilizados nos modelos de regressão por PLS para amostras de diferentes culturas.

As linhas selecionadas para a regressão univariada de cada elemento foram: P I 214,914 nm; K I 404,414 nm, Ca I 315,887 nm; Mg I 277,983 nm; Mn II 257,610 nm; Fe II 259,940 nm; Cu I 324,755; Zn I 213,855 nm e B II 249,772 nm.

O número de variáveis latentes do modelo PLS para cada elemento foi determinado como o número que apresentou menor RMSECV (FIGURA 3.15). Utilizaram-se 2 VLs para P, K, e Cu, 4 para Ca, Mg e Zn e 7 para Mn, 6 para Fe e B. Nenhum modelo apresentou amostras anômalas e, assim, utilizaram-se as 17 amostras de calibração para todos os elementos.

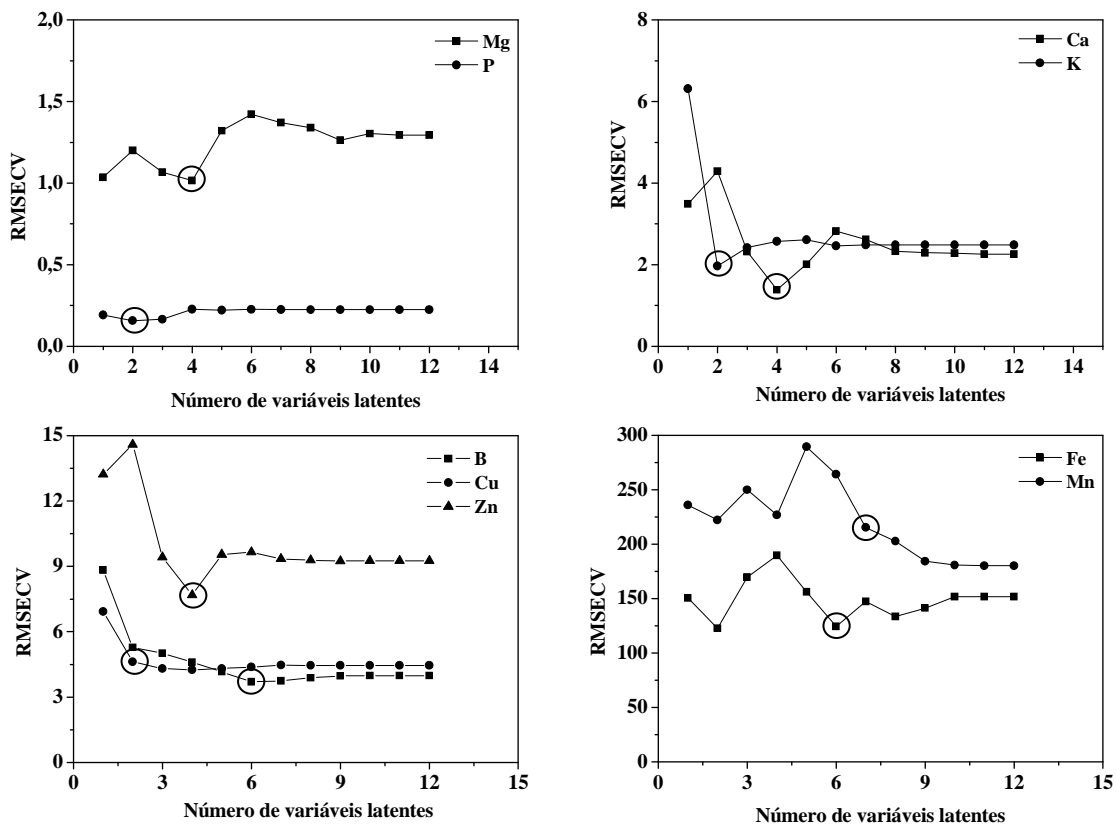


FIGURA 3.15 – Valores de RMSECV em função do número de variáveis latentes nos modelos PLS para Mg, P, Ca, K, B, Cu, Zn, Fe e Mn em folhas de plantas de diferentes culturas.



O ajuste dos modelos foi avaliado com base nos gráficos do sinal analítico líquido (NAS) em função dos valores de referência. Esta avaliação do ajuste com o auxílio do NAS refere-se à representação pseudo-univariada dos modelos de calibração multivariada (FIGURAS 3.16 e 3.17).

De modo geral observou-se uma boa correlação entre os valores de referência e os valores calculados pelo modelo, o que explica a boa concordância entre os resultados obtidos por LIBS e ICP OES.

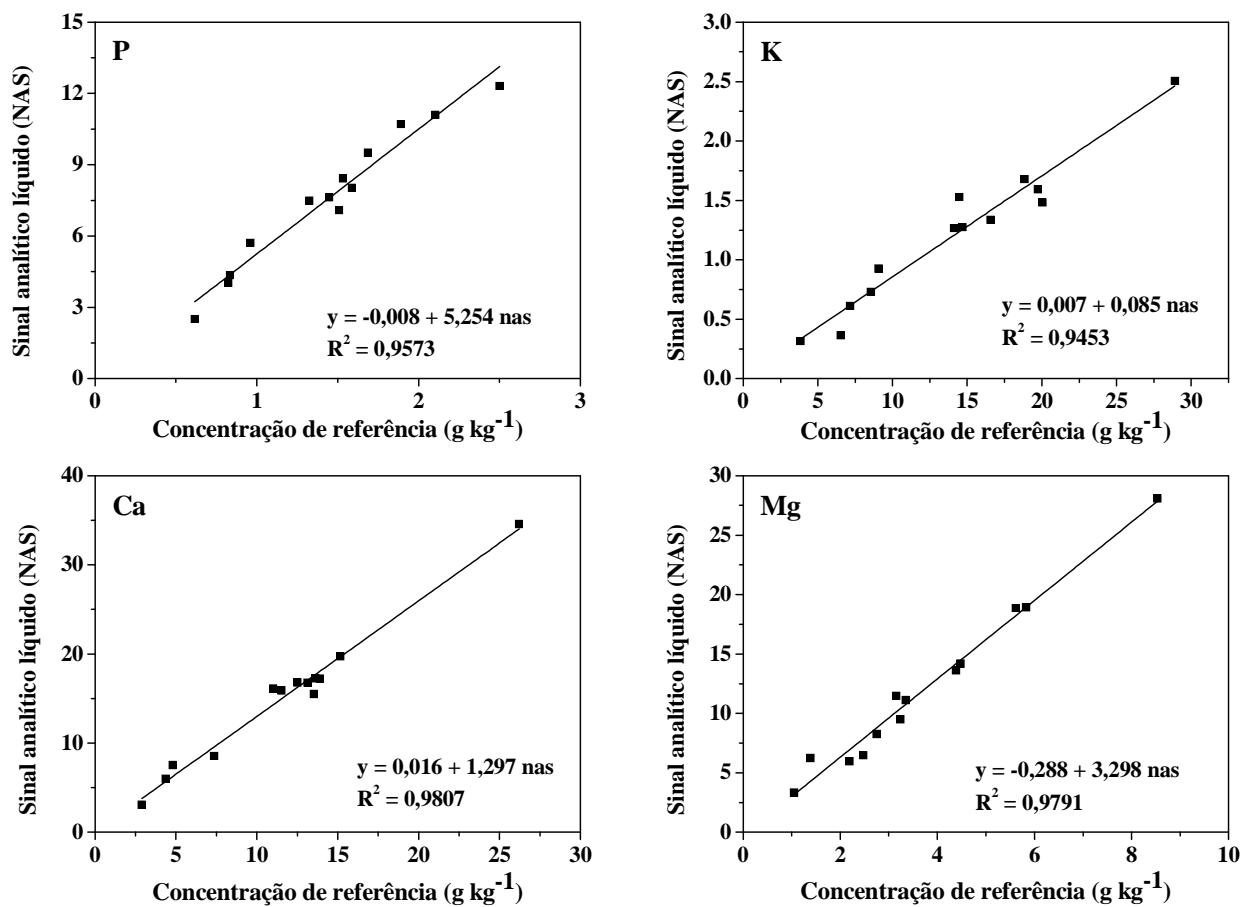


FIGURA 3.16 – Correlação entre concentrações de referência e sinal analítico líquido do modelo PLS (NAS) em sua forma pseudo-univariada para P, K, Ca e Mg em folhas de plantas de diferentes culturas.

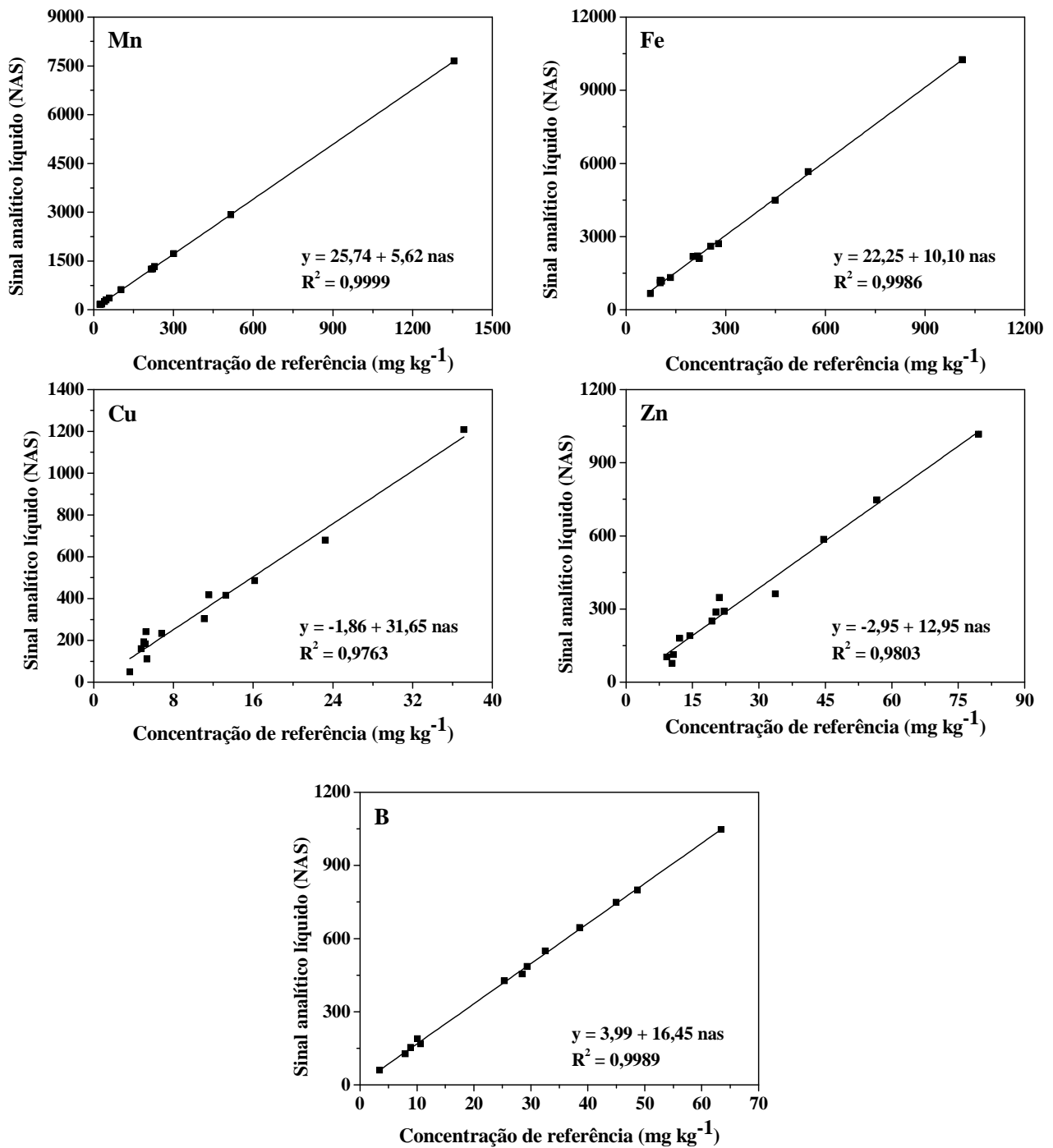


FIGURA 3.17 – Correlação entre concentrações de referência e sinal analítico líquido do modelo PLS (NAS) em sua forma pseudo-univariada para Mn, Fe, Cu, Zn e B em folhas de plantas de diferentes culturas.

A comparação entre os valores de concentração estimados pelas calibrações multivariada, univariada e os valores de referência obtidos por ICP OES nas 4 amostras de validação são mostrados nas FIGURAS 3.18 a 3.20.

De modo geral, os resultados obtidos por LIBS com PLSR e regressão univariada mostraram boa concordância com os valores obtidos por ICP OES. Com PLS, maior concordância foi observada para o Mn.

Para confirmar os resultados, aplicou-se o teste t pareado, encontrando-se os valores de 0,14 (P), 2,0 (K), 0,03 (Ca), 2,5 (Mg), 0,25 (Mn), 0,30 (Fe), 2,3 (Cu), 0,50 (Zn) e 0,30 (B) para a regressão univariada e valores de 1,0 (P), 1,2 (K), 1,7 (Ca), 1,1 (Mg), 0,1 (Mn), 2,8 (Fe), 0,8 (Cu), 1,25 (Zn) e 1,95 (B) para a regressão multivariada. O valor crítico para a distribuição t-Student com 95% de confiança é 3,18. Neste sentido, não foram observadas diferenças significativas para no nível de 95% de confiança para regressão univariada e PLS quando comparadas com o método de referência.

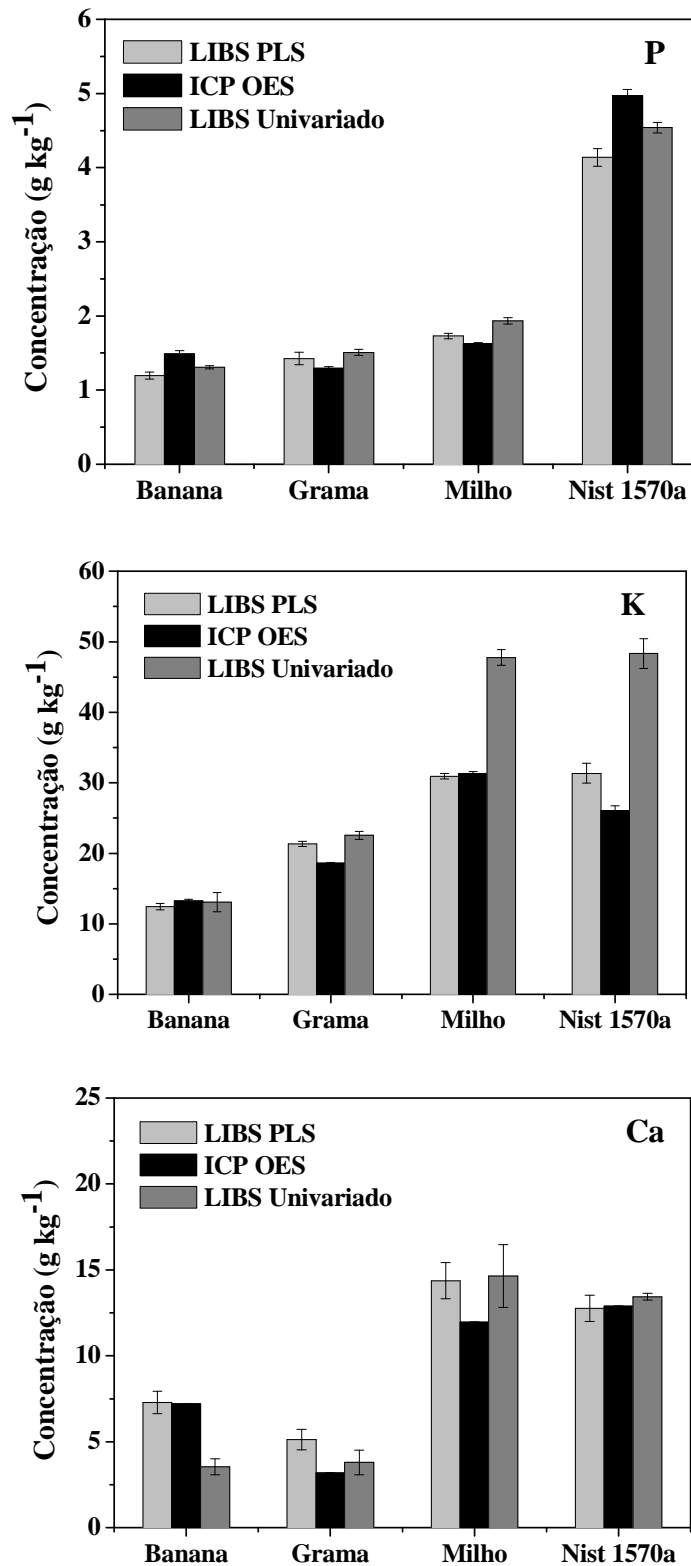


FIGURA 3.18 - Comparação entre resultados de P, K e Ca nas amostras de validação, para diferentes culturas, obtidos por LIBS com calibração multivariada (PLS), univariada e por ICP OES. As barras de incerteza são representadas por  $\pm 1$  desvio-padrão ( $n = 3$ ).

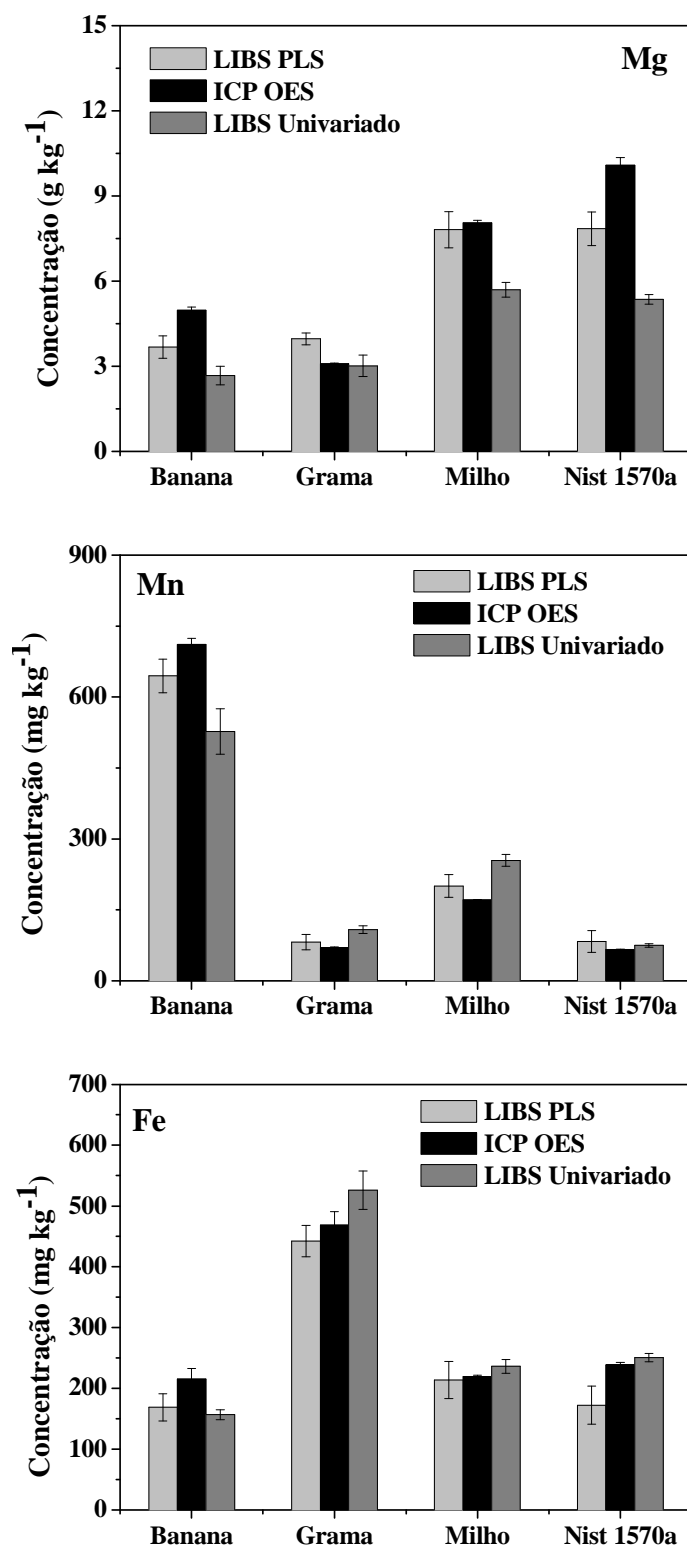


FIGURA 3.19 - Comparação entre resultados de Mg, Mn e Fe nas amostras de validação, para diferentes culturas, obtidos por LIBS com calibração multivariada (PLS), univariada e por ICP OES. As barras de incerteza são representadas por  $\pm 1$  desvio-padrão ( $n = 3$ ).

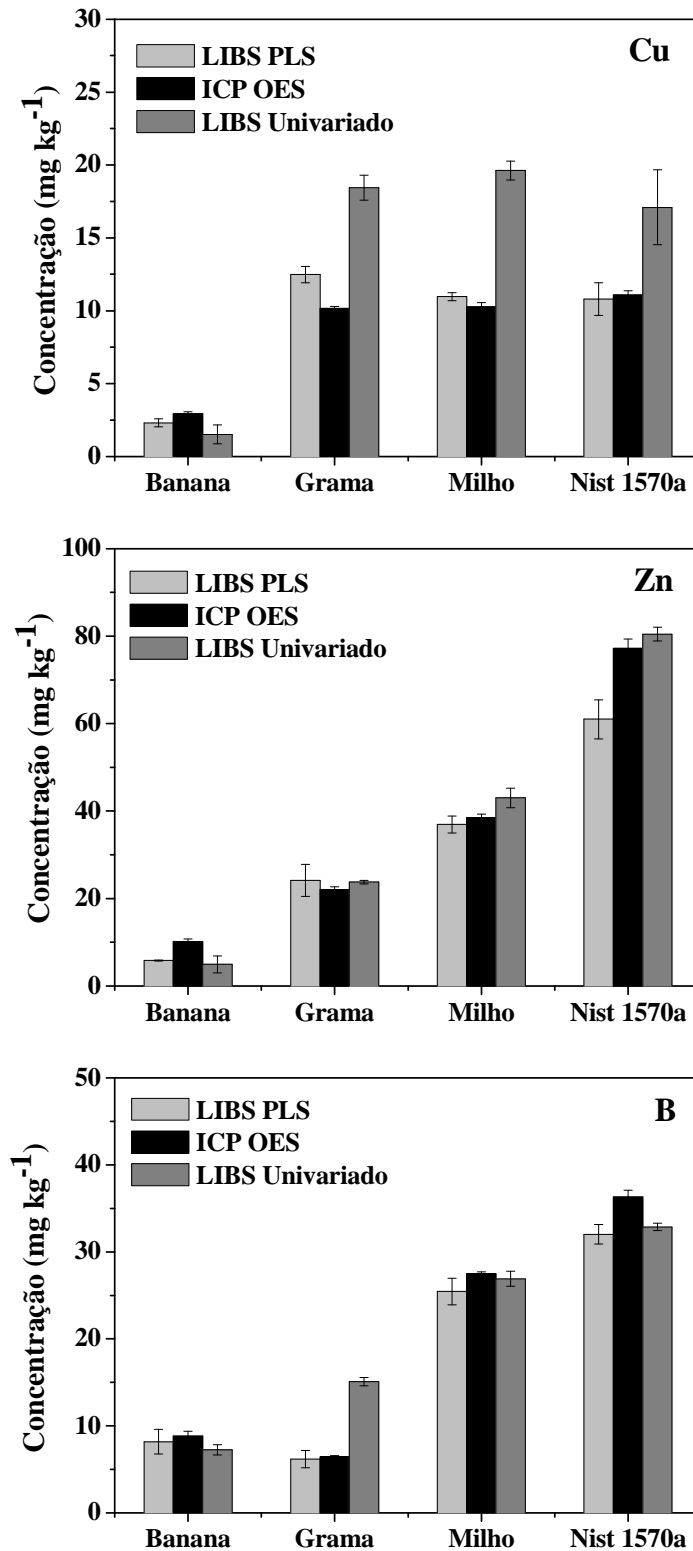


FIGURA 3.20 - Comparação entre resultados de Cu, Zn e B nas amostras de validação, para diferentes culturas, obtidos por LIBS com calibração multivariada (PLS), univariada e por ICP OES. As barras de incerteza são representadas por  $\pm 1$  desvio-padrão ( $n = 3$ ).

Os resultados de algumas figuras de mérito para LIBS com PLSR e regressão univariada são mostrados nas TABELAS 3.12 e 3.13.

De um modo geral, melhores resultados para o RMSEP foram obtidos com a calibração univariada para os macronutrientes. Para os micronutrientes, melhores resultados foram obtidos com a regressão multivariada. Para a precisão média, não se observaram diferenças significativas entre os dois modelos de calibração.

Independentemente do modelo de regressão, observa-se que os limites de detecção estimados estão abaixo do intervalo de concentrações definido pelas amostras de calibração (TABELA 3.11). Assim, os LODs foram considerados apropriados para a determinação dos macro e micronutrientes avaliados em tecidos vegetais, considerando-se as faixas de concentração de ocorrência na maioria das plantas (TABELA 1.1).

TABELA 3.12 - Resultados médios de algumas figuras de mérito para determinação de macronutrientes comparando as calibrações univariada e multivariada por PLS em amostras de diferentes culturas.

	Regressão	LOD	RMSEP <sup>a</sup>	Precisão <sup>b</sup> média
		(g kg <sup>-1</sup> )		
P	univariada	0,03	0,20	0,08
	PLS	0,01	0,45	0,10
K	univariada	0,34	3,0	1,15
	PLS	1,15	3,1	0,95
Ca	univariada	0,005	2,90	0,99
	PLS	0,22	0,77	0,76
Mg	univariada	0,02	0,30	0,45
	PLS	0,09	1,45	0,60

<sup>a</sup> Determinado em analogia com o RMSECV (equação 6) considerando-se amostras de validação.

<sup>b</sup> Estimado como o desvio-padrão das replicatas (n = 3) nas amostras de validação.

TABELA 3.13 - Resultados médios de algumas figuras de mérito para determinação de micronutrientes comparando as calibrações univariada e multivariada por PLS em amostras de diferentes culturas.

	Regressão	LOD	RMSEP <sup>a</sup>	Precisão <sup>b</sup> média
		(mg kg <sup>-1</sup> )		
Mn	univariada	1,0	1850	39
	PLS	19	138	37,5
Fe	univariada	0,8	2200	20
	PLS	12	70	53
Cu	univariada	0,7	8,0	1,5
	PLS	2,5	4,2	0,8
Zn	univariada	2,0	8	2,0
	PLS	6,5	9	3,7
B	univariada	0,5	0,3	0,7
	PLS	7	3	2,25

<sup>a</sup> Determinado em analogia com o RMSECV (equação 6) considerando-se amostras de validação.

<sup>b</sup> Estimado como o desvio-padrão das replicatas (n = 3) nas amostras de validação.



### 3.3.4 - Calibração multivariada para determinação de macro e micronutrientes em folhas de cana-de-açúcar.

Utilizaram-se espectros de 67 amostras de folhas de cana-de-açúcar. As amostras para o conjunto de calibração e validação foram selecionadas de acordo com os agrupamentos obtidos pela PCA.

No gráfico de *scores* para o conjunto das 67 amostras (FIGURA 3.21), observa-se que as amostras 44 e 48 apresentaram-se anômalas. Estas amostras foram retiradas do conjunto de dados e uma nova PCA foi gerada com as 65 amostras. Neste caso, nenhuma amostra apresentou-se como anômala (FIGURA 3.22), portanto 65 amostras foram utilizadas.

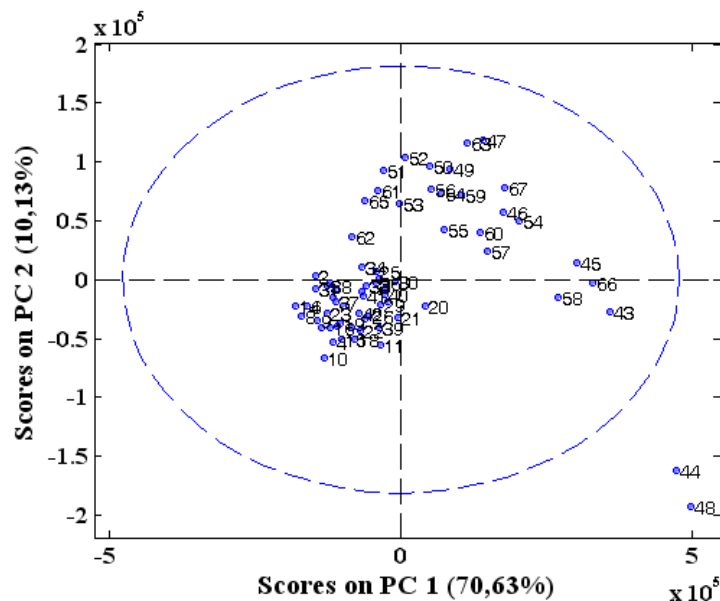


FIGURA 3.21 - Representação gráfica das duas componentes principais obtidas para 67 amostras de folhas de cana-de-açúcar.

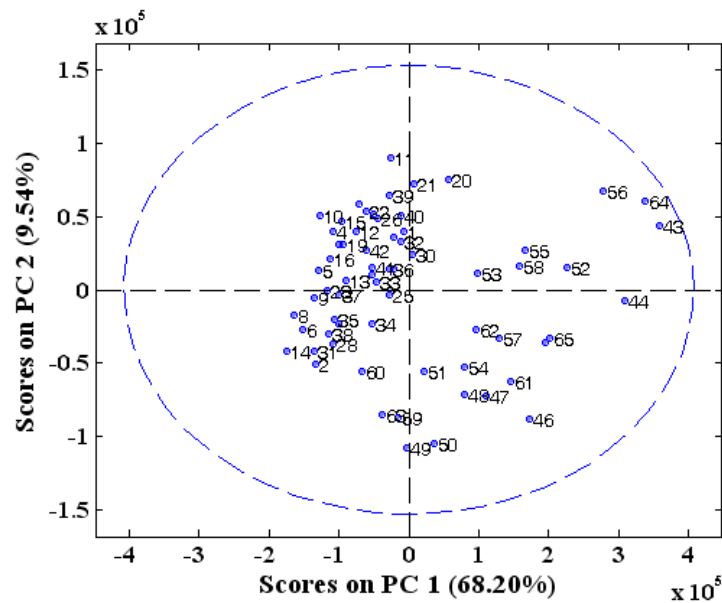


FIGURA 3.22 - Representação gráfica das duas componentes principais obtidas para 65 amostras de folhas de cana-de-açúcar.

Quando a calibração multivariada é aplicada, especialmente no domínio de primeira ordem, uma grande quantidade de amostras de calibração pode ser necessária a fim de contemplar as fontes de variabilidade presentes nas amostras. A adição de novas amostras torna o modelo mais robusto e, muitas vezes, pode levar à melhores resultados de previsão. A partir da dispersão das amostras na PCA, selecionaram-se 49 amostras para a construção dos modelos de regressão (amostras de calibração) e 16, com dispersão mais interna, para validação (TABELA 3.14). Os intervalos de concentração abrangidos pelas amostras de calibração para cada elemento são apresentados na TABELA 3.15.

TABELA 3.14 - Conjunto de amostras utilizadas para construção dos modelos de calibração e validação.

Amostra	Identificação	Variedade	Amostra	Identificação	Variedade
1	1410	RB 855536	34	1447	RB 855036
2	1412	RB 855536	35	1448*	RB 855036
3	1413	RB 855536	36	1449	RB 855036
4	1414	SP 813250	37	1450*	RB 855113
5	1415	SP 813250	38	1451*	RB 855113
6	1416	SP 813250	39	1452	RB 855113
7	1417	SP 813250	40	1453*	RB 855113
8	1418	RB 855035	41	1454*	RB 845486
9	1419	RB 855035	42	1455	RB 845486
10	1420	RB 855035	43	-	V1 CTC
11	1421	RB 855035	44	-	V3 CTC
12	1422*	RB 855036	45	-	V4 CTC
13	1423	RB 855036	46	-	V5 CTC
14	1424	RB 855036	47	-	V7 CTC
15	1425	RB 855036	48	-	V8 CTC*
16	1426*	RB 855113	49	-	V9 CTC
17	1427	RB 855113	50	-	V10 CTC
18	1428	RB 855113	51	-	V11 CTC
19	1429*	RB 855113	52	-	V12 CTC
20	1430	RB 845486	53	-	V13 CTC
21	1431	RB 845486	54	-	V14 CTC*
22	1432*	RB 845486	55	-	V15 CTC*
23	1433	RB 845486	56	-	V16 CTC
24	1434	RB 855536	57	-	V17 CTC*
25	1436	RB 855536	58	-	V18 CTC*
26	1437*	RB 855536	59	-	V5 IAC
27	1438	SP 813250	60	-	867515
28	1439	SP 813250	61	-	873396
29	1441	SP 813250	62	-	911099
30	1443	RB 855035	63	-	93606
31	1444*	RB 855035	64	-	855453
32	1445	RB 855035	65	-	813250
33	1446	RB 855036			

\* Amostras do conjunto de validação

TABELA 3.15 - Faixas de concentração de macro e micronutrientes do conjunto de calibração para folhas de cana-de-açúcar.

Elemento	Intervalo de concentração (g kg <sup>-1</sup> )
P	0,08 – 2,03
K	0,14 – 15,25
Ca	1,57 – 5,84
Mg	0,75 – 3,78
Intervalo de concentração (mg kg <sup>-1</sup> )	
Mn	31 – 210
Fe	60 – 250
Zn	3,5 – 24
B	3 – 32
Al	70 – 300

A concentração de Cu não foi determinada porque apresentava-se abaixo do limite de detecção (< 2,0 mg kg<sup>-1</sup>) nos digeridos analisados por ICP OES.

Utilizou-se o programa iPLS para a seleção de um intervalo espectral com menores valores de RMSECV para construção dos modelos de calibração. Os espectros foram divididos em intervalos de 10 a 50. Os intervalos obtidos para cada elemento e os valores do RMSECV em cada intervalo (barras) e no modelo global (linha pontilhada) são mostrados nas FIGURAS 3.23 a 3.25. Os números em itálico mostrados dentro de cada intervalo são referentes ao número de variáveis latentes ideal para a construção do modelo PLS empregando determinado intervalo. Obtiveram-se intervalos com menores erros de previsão quando comparados com o modelo global, para todos os elementos. Para o P, por exemplo, os intervalos 1, 2 e 6 apresentaram valores de RMSECV menores em relação ao modelo global, o qual é representado pela linha pontilhada. O número do intervalo e os subintervalos selecionados para a construção do modelo PLS para cada elemento são mostrados na TABELA 3.16.

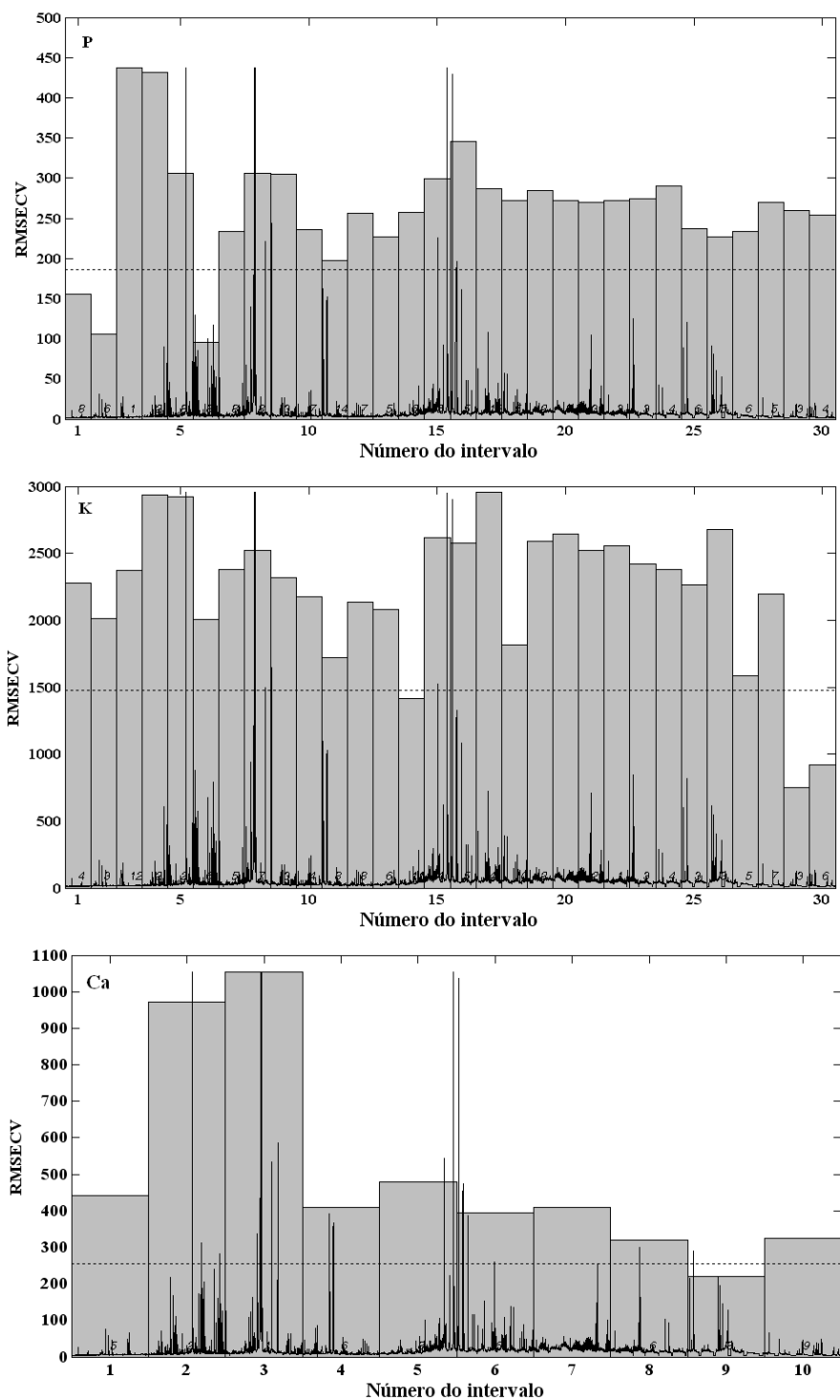


FIGURA 3.23 - Valores de RMSECV observados em diferentes intervalos obtidos com o iPLS para P, K e Ca. (.....) RMSECV do PLS construído com todo espectro.

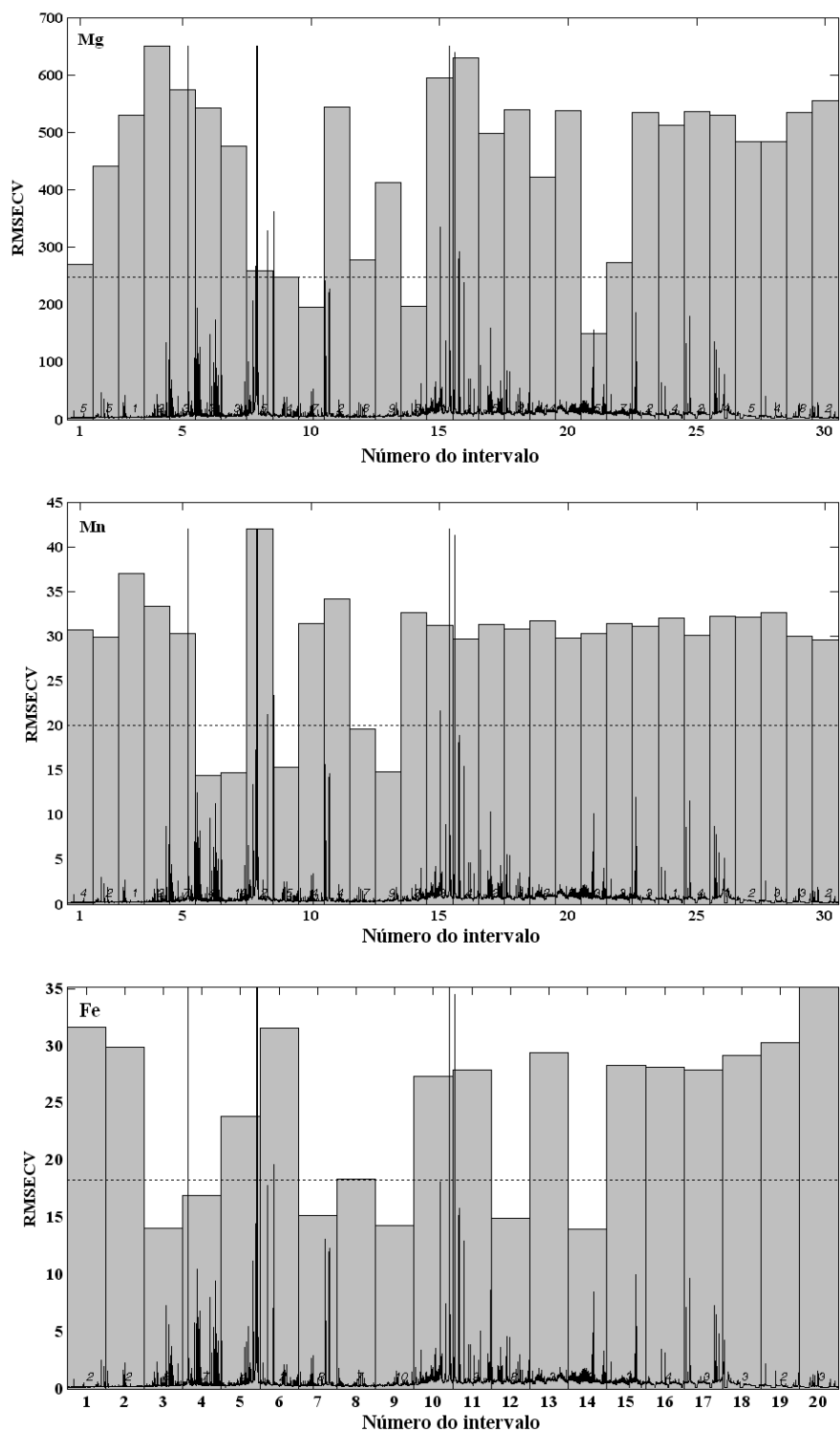
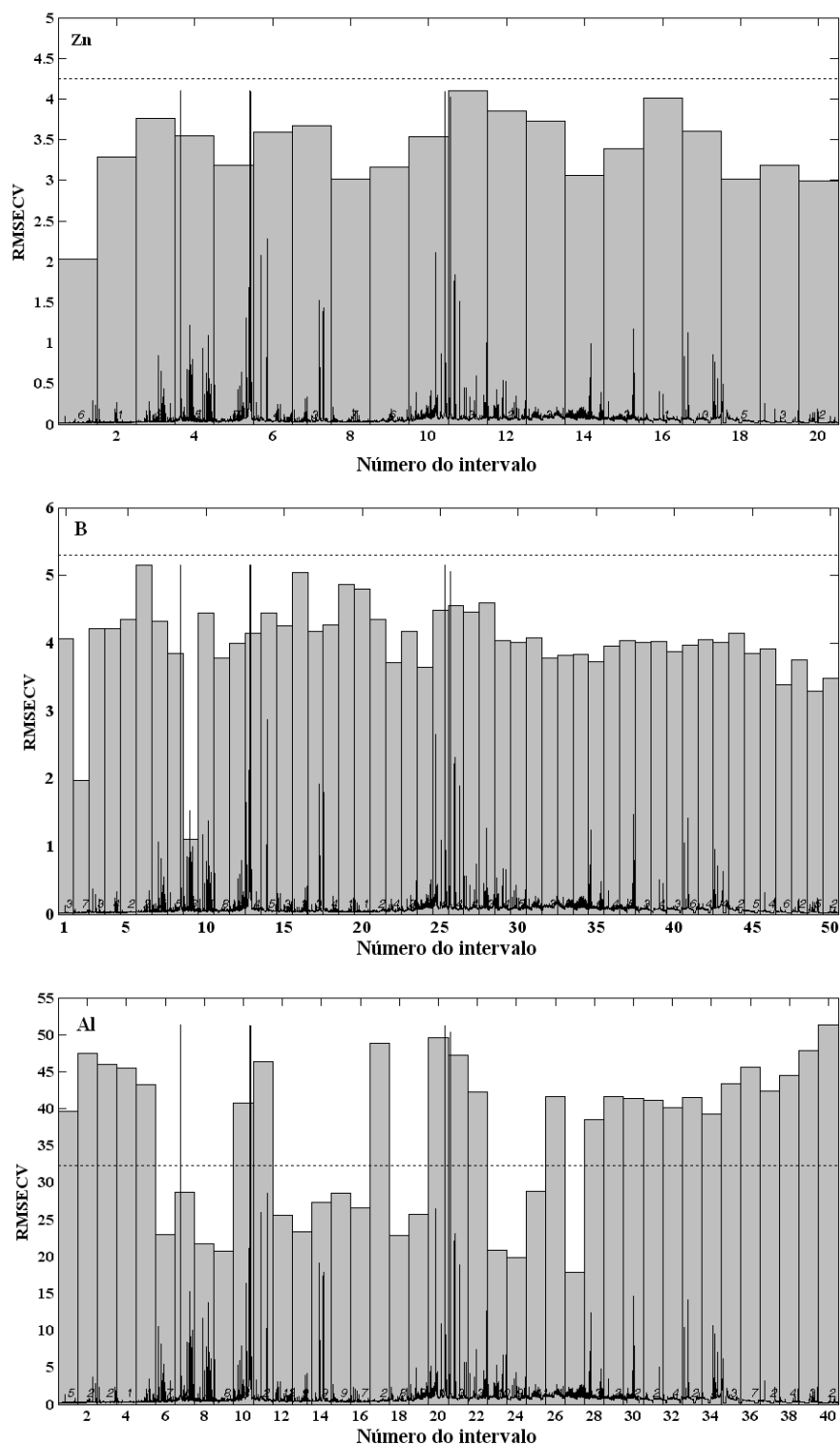


FIGURA 3.24 - RMSECV observados em diferentes intervalos obtidos com o iPLS para Mg, Mn e Fe. (.....) RMSECV do PLS construído com o espectro global.



IGURA 3.25 - Valores de RMSECV observados em diferentes intervalos obtidos com o iPLS para Zn e B. (.....) RMSECV do PLS construído com o espectro global.

TABELA 3.16 - Número de intervalos e subintervalos selecionados para construção dos modelos de calibração para P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn e B.

Elemento	Número de intervalos	Subintervalo selecionado
P	30	6
K	30	29
Ca	10	9
Mg	30	10
Mn	30	6
Fe	20	3
Zn	20	1
B	50	9
Al	40	6

Utilizando-se a seleção de variáveis por iPLS para o desenvolvimento do modelo para o P, por exemplo, ocorreu redução de 53717 variáveis iniciais para 1791. Os resultados obtidos com a seleção da região espectral foram mais eficientes do que os construídos com o espectro que utiliza todas as variáveis espectrais.

O número de variáveis latentes do modelo PLS foi determinado como o número que apresentou menor RMSECV (Figura 3.26). Utilizaram-se 5 VLs para P, 2 para K, 6 para Ca, Mg, Fe e Zn, 4 para Mn e Al e 8 para B.



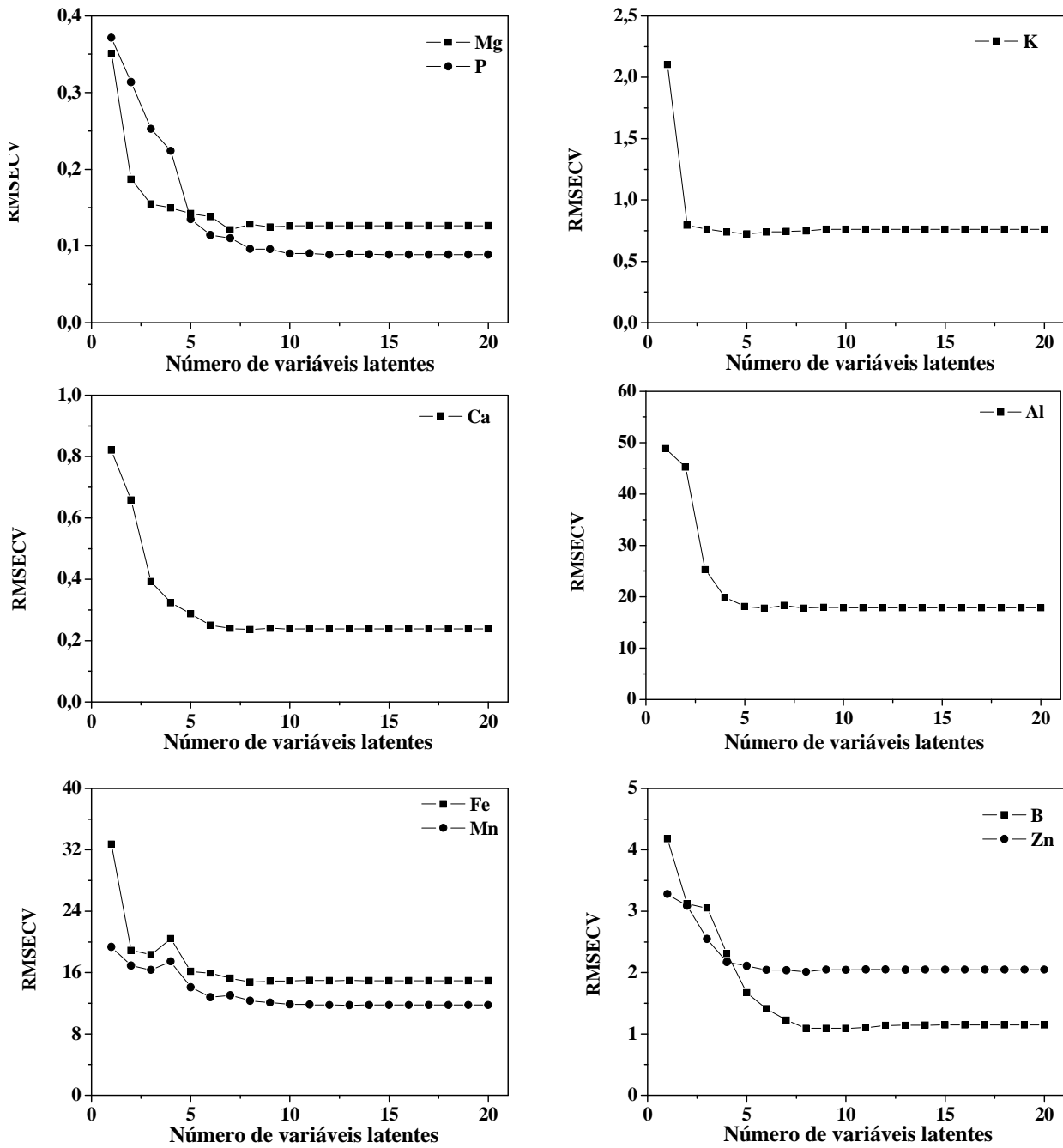


FIGURA 3.26 – Valores de RMSECV para Mg, P, Ca, K, B, Zn, Fe, Mn e Al em função do número de variáveis latentes para os modelos PLS.

A otimização para identificar amostras anômalas resultou em 44 amostras no conjunto de calibração para P, 43 para K, 42 para Ca, Mg, Mn e Fe, 46 para Zn, 45 para B e 48 para Al.

O ajuste dos modelos foi avaliado com base nos gráficos do sinal analítico líquido em função dos valores de referência como mostrados nas FIGURAS 3.27 e 3.28. De modo geral observou-se uma boa correlação entre os valores de referência e os valores calculados pelo modelo, o que explica a boa concordância entre os resultados obtidos por LIBS e ICP OES.

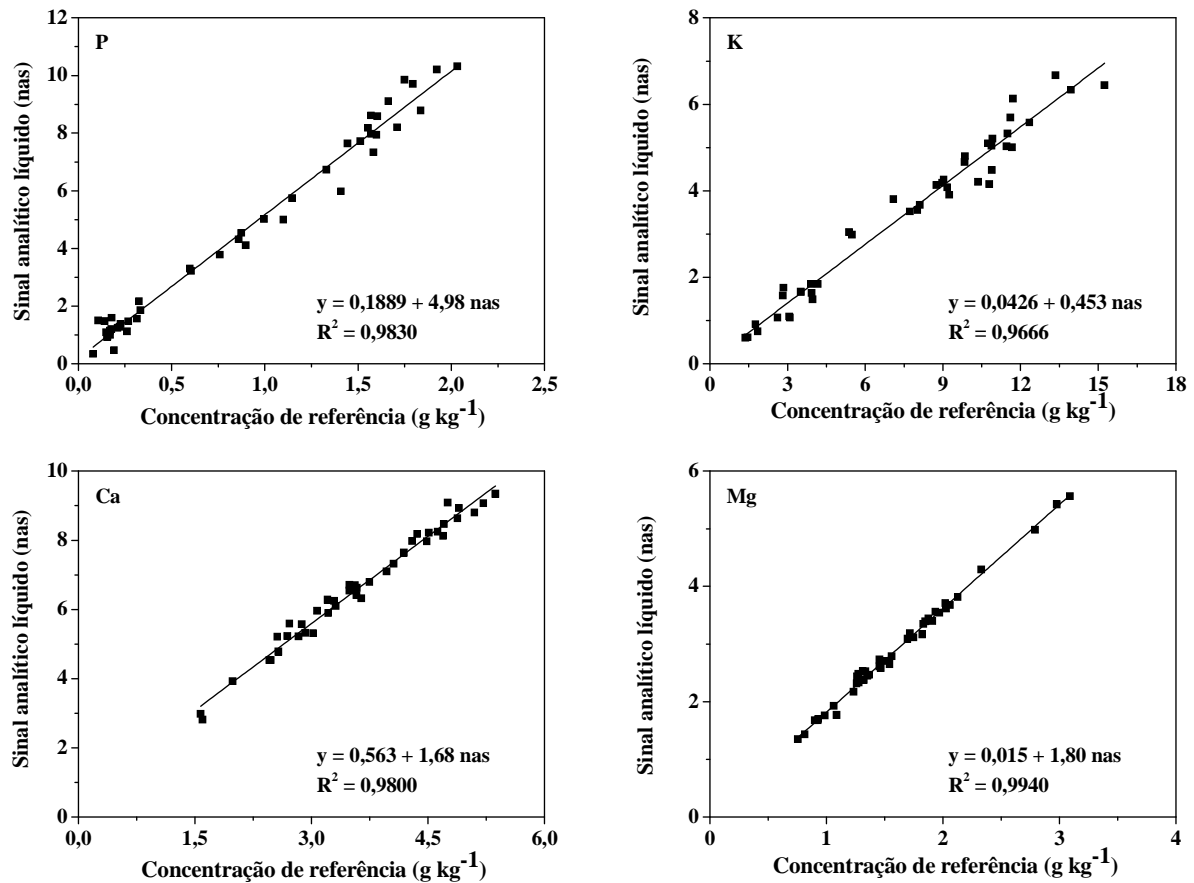


FIGURA 3.27 – Correlação entre concentrações de referência e sinal analítico líquido do modelo PLS (NAS) em sua forma pseudo-univariada para P, K, Ca e Mg em folhas de cana-de-açúcar.

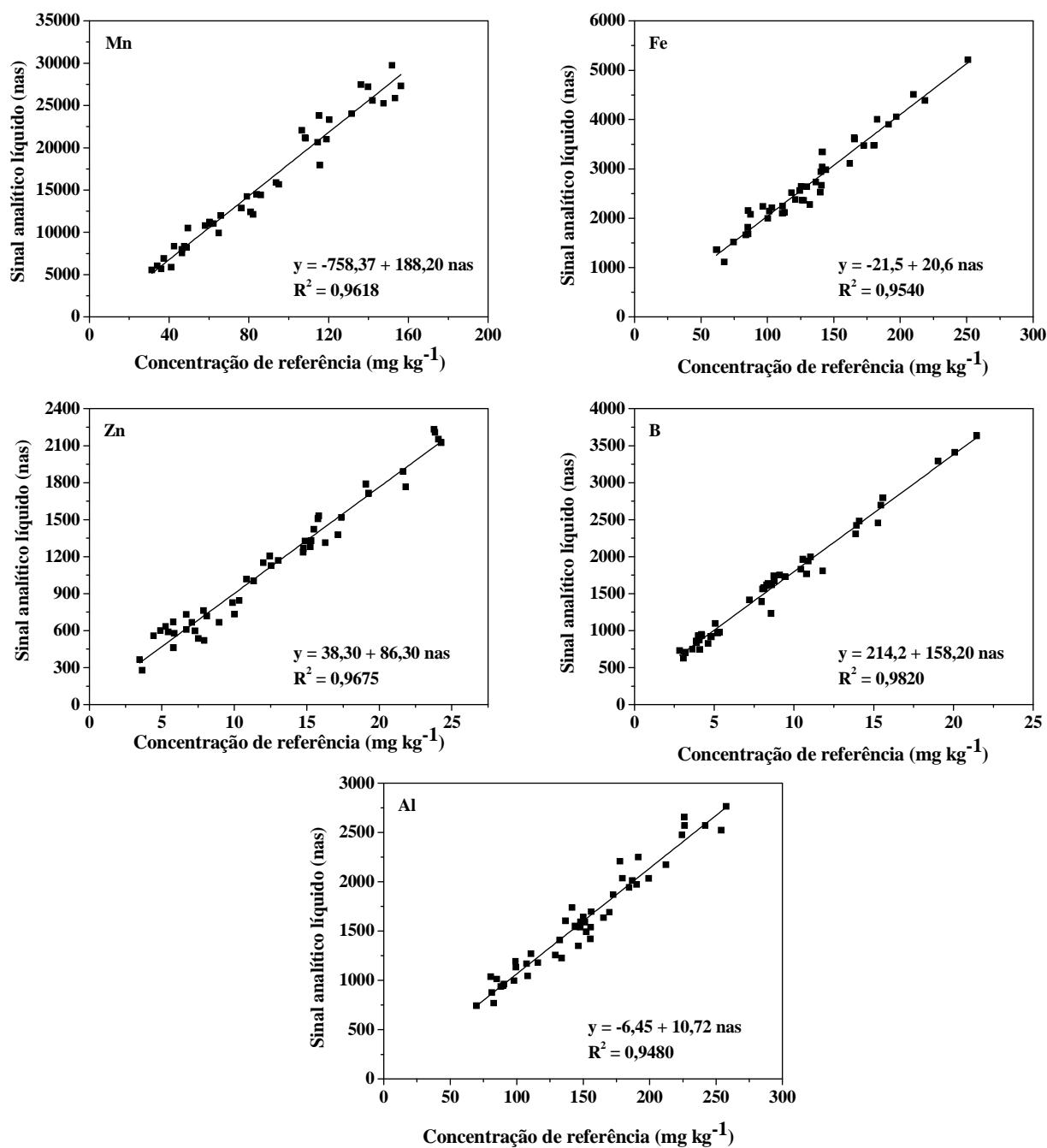


FIGURA 3.28 – Correlação entre concentrações de referência e sinal analítico líquido do modelo PLS (NAS) em sua forma pseudo-univariada para Mn, Fe, Cu, Zn e B em folhas de plantas de cana-de-açúcar.

A comparação entre valores de concentração estimados pela calibração multivariada e os valores de referência obtidos por ICP OES nas 16 amostras de validação são mostrados nas FIGURAS 3.29 a 3.31.

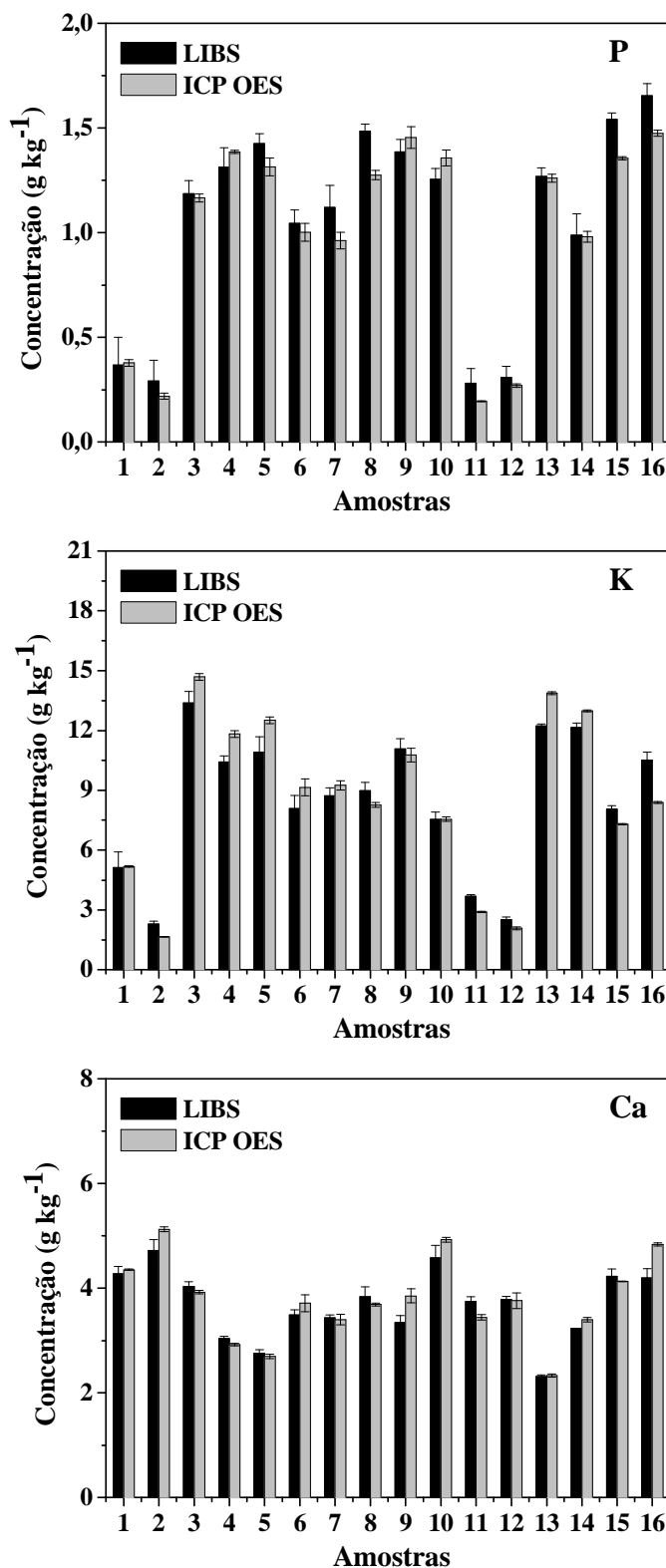


FIGURA 3.29 - Comparação entre resultados de P, K e Ca nas amostras de validação para folhas de cana-de-açúcar obtidos por LIBS com calibração multivariada (PLS) e por ICP OES. As barras de incerteza são representadas por  $\pm 1$  desvio-padrão ( $n = 3$ ).

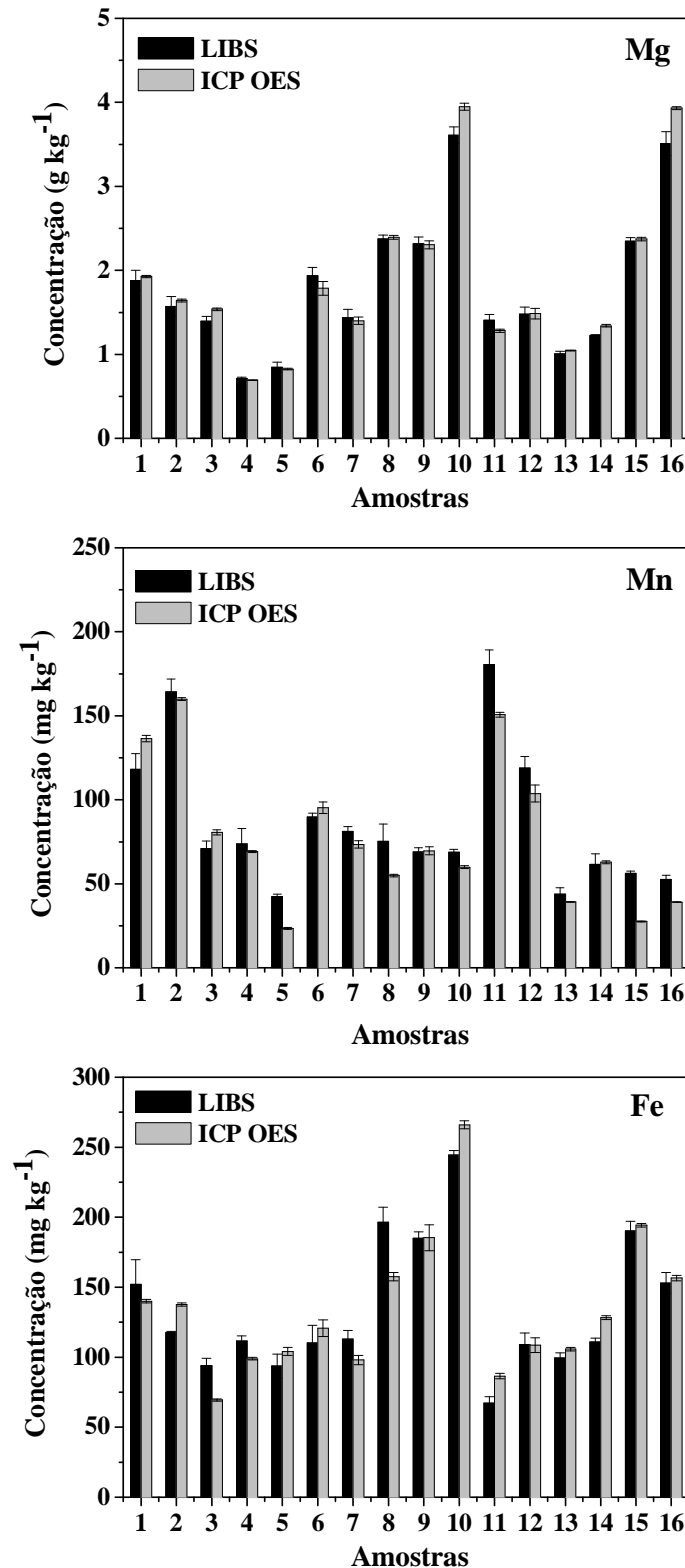


FIGURA 3.30 - Comparação entre resultados de Mg, Mn e Fe nas amostras de validação para folhas de cana-de-açúcar obtidos por LIBS com calibração multivariada (PLS) e por ICP OES. As barras de incerteza são representadas por  $\pm 1$  desvio-padrão ( $n = 3$ ).

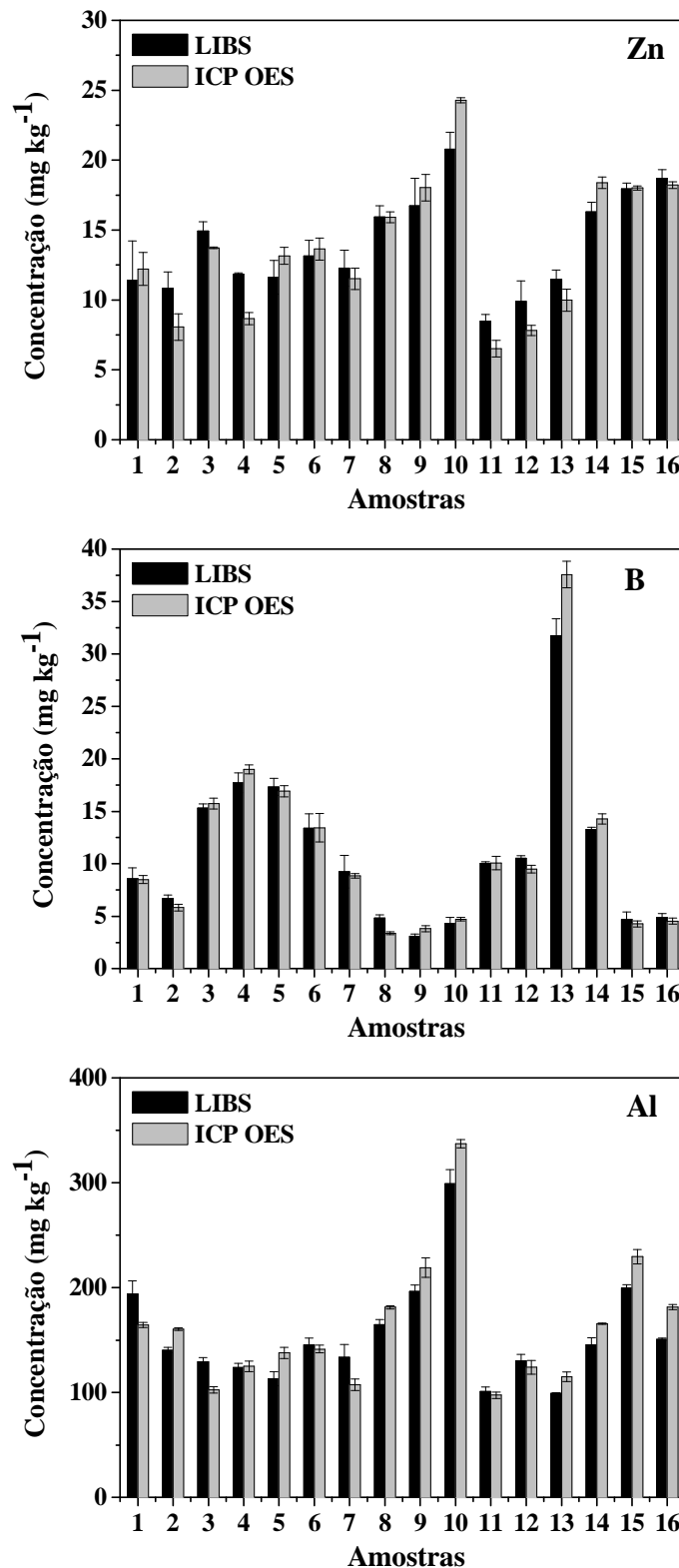


FIGURA 3.31 - Comparação entre resultados de Zn, B e Al nas amostras de validação para folhas de cana-de-açúcar obtidos por LIBS com calibração multivariada (PLS) e por ICP OES. As barras de incerteza são representadas por  $\pm 1$  desvio-padrão ( $n = 3$ ).

De modo geral, os resultados obtidos por LIBS com PLSR mostraram boa concordância com os valores obtidos por ICP OES. Para confirmar os resultados, aplicou-se o teste t pareado, encontrando-se os valores de 2,05 (P), 0,60 (K), 0,30 (Ca), 1,45 (Mg), 2,05 (Mn), 0,15 (Fe), 0,6 (Zn) e 0,70 (B). O valor crítico para a distribuição t-Student com 95% de confiança é 2,13. Neste sentido, não foram encontradas diferenças significativas pelos modelos PLS quando comparados com os resultados do método de referência, ao nível de 95% de probabilidade.

Algumas figuras de mérito para LIBS com PLSR são mostradas na TABELA 3.17.

Comparando-se os valores de RMSEP do conjunto de validação feito com amostras de folhas de cana-de-açúcar com aqueles do conjunto de amostras de diferentes culturas, melhores resultados foram obtidos com cana-de-açúcar. Para o Mn, por exemplo, o RMSEP foi de 138 na calibração com diferentes culturas e de apenas 9,5 com cana-de-açúcar. Vale ressaltar que os modelos de calibração para folhas de cana-de-açúcar foram construídos com folhas de mesma cultura minimizando assim os possíveis efeitos de matriz que podem ocorrer devido à diferença na constituição e estrutura das diversas amostras. Além disso, o modelo foi construído com maior número de amostras ( $n = 42$ ), tornando-o mais robusto.

Os limites de detecção foram considerados apropriados para a determinação dos macro e micronutrientes avaliados em folhas de cana de açúcar, considerando-se as faixas de concentração de ocorrência na maioria das plantas.

TABELA 3.17 - Figuras de mérito para determinação de macro e micronutrientes em folhas de cana-de-açúcar com calibração multivariada por PLSR.

	LOD	RMSEP <sup>a</sup>	Precisão média <sup>b</sup>
P (g kg <sup>-1</sup> )	0,02	0,13	0,1
K (g kg <sup>-1</sup> )	0,21	1,14	0,5
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	0,09	0,30	0,14
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	0,09	0,17	0,09
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	0,57	9,5	3,8
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	5,8	26	7,8
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	1,8	2,8	1,4
B (mg kg <sup>-1</sup> )	0,7	1,8	0,93
Al (mg kg <sup>-1</sup> )	10	26	11

<sup>a</sup> Determinado em analogia com o RMSECV (equação 6) considerando-se amostras de validação.

<sup>b</sup> Estimado como o desvio padrão das replicatas (n = 3) nas amostras de validação.



## **Conclusões**

Procedimentos quimiométricos de otimização baseados na utilização da matriz Doehlert e o algoritmo genético com redes neurais artificiais (BRANN) foram apropriados para a otimização do número de pulsos acumulados, tempo de integração, tempo de atraso, energia por pulso, distância lente-amostra, visando à determinação simultânea de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, B, Al e Si em pastilhas de tecidos vegetais por LIBS.

Foram obtidos modelos de calibração multivariada de primeira ordem com o método de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLSR) para análise quantitativa das pastilhas por LIBS, que proporcionaram resultados concordantes, ao nível de 95% de probabilidade, com os valores do método de referência por ICP OES.

Demonstrou-se que a calibração analítica é altamente dependente das características químicas e físicas da matriz, e que o sucesso da técnica LIBS depende das estratégias de preparo das amostras, com conhecimento da distribuição de tamanho de partículas. Não obstante, nas condições otimizadas, incluindo o preparo das pastilhas, os resultados foram apropriados para a análise de tecidos foliares. Os coeficientes de variação das medidas variaram de 2% para Mn a 15% para P ( $n = 3$ ), utilizando-se o conceito de espectro representativo de 10 crateras ou de 250 pulsos (25 pulsos por cratera).

Os limites de detecção do modelo multivariado para determinação de macro e micronutrientes por LIBS nas pastilhas de folhas de plantas de diferentes culturas também são adequados para fins de diagnose foliar.

## Referências bibliográficas

1. KRUG, F. J. *Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*. Piracicaba: copiadora Luiz de Queiroz, 2008.
2. HONIG, R. E. & WOOLSTON, J. R. "Laser-Induced Emission of Electrons, Ions, and Neutral Atoms from Solid Surfaces". *Appl. Phys. Lett.*, **2**(7): 138, 1963.
3. MAIMAN, T. H. "Stimulated Optical Radiation in Ruby". *Nat.*, **187**(4736): 493, 1960.
4. SCHAWLOW, A. L. & TOWNES, C. H. "Infrared and Optical Masers". *Phys. Rev.*, **112**(6): 1940, 1958.
5. BRECH, F. & CROSS, L. "Optical microemission stimulated by a ruby laser". *Appl. Spectrosc.*, **16**: 59, 1962.
6. WINEFORDNER, J. D.; GORNUSHKIN, I. B.; CORRELL, T.; GIBB, E.; SMITH, B. W. & OMENETTO, N. "Comparing several atomic spectrometric methods to the super stars: special emphasis on laser induced breakdown spectrometry, LIBS, a future super star". *J. Anal. At. Spectrom.*, **19**(9): 1061, 2004.
7. CREMERS, D. A.; RADZIEMSKI, L. J. & LOREE, T. R. "Spectrochemical Analysis of Liquids Using the Laser Spark". *Appl. Spectrosc.*, **38**(5): 721, 1984.
8. WACHTER, J. R. & CREMERS, D. A. "Determination of Uranium in Solution Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy". *Appl. Spectrosc.*, **41**(6): 1042, 1987.
9. PASQUINI, C.; CORTEZ, J.; SILVA, L.M.C. & GONZAGA, F.B. "Laser induced breakdown spectroscopy". *J. Braz. Chem. Soc.*, **18**(3): 463, 2007.
10. RADZIEMSKI, L. J. "From LASER to LIBS, the path of technology development". *Spectrochim. Acta Part B*, **57**(7): 1109, 2002.
11. RUSAK, D. A.; CASTLE, B. C.; SMITH, B. W. & WINEFORDNER, J. D. "Recent trends and the future of laser-induced plasma spectroscopy". *Trac-Trend Anal. Chem.* **17**(8-9): 453, 1998.

12. SNEDDON, J. & LEE, Y. I. "Novel and recent applications of elemental determination by laser-induced breakdown spectrometry". *Anal. Lett.*, **32**(11): 2143, 1999.
13. SONG, K.; LEE, Y.I. & SNEDDON, J. "Applications of laser-induced breakdown spectrometry". *Appl. Spectrosc. Rev.*, **32**(3): 183, 1997.
14. SONG, K.; LEE, Y. I. & SNEDDON, J. "Recent developments in instrumentation for laser induced breakdown spectroscopy". *Appl Spectrosc. Rev.*, **37**(1): 89, 2002.
15. TOGNONI, E.; PALLESCHI, V.; CORSI, M. & CRISTOFORETTI, G. "Quantitative micro-analysis by laser-induced breakdown spectroscopy: a review of the experimental approaches". *Spectrochim. Acta Part B*, **57**(7): 1115, 2002.
16. VADILLO, J. M. & LASERNA, J. J. "Laser-induced plasma spectrometry: truly a surface analytical tool". *Spectrochim. Acta B.*, **59**(2): 147, 2004.
17. CREMERS, D. A. & RADZIEMSKI, L. J. *Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*. 1ª ed. Chichester: John Wiley & Sons. 2006. 283 p.
18. MIZIOLEK, A. W.; PALLESCHI, V. & SCHECHTER, I. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) - Fundamentals and Applications*. 1ª ed., New York: Cambridge University Press, 2006. 620 p.
19. SINGH, J. P. & THAKUR, S. N. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*. Amsterdam: Elsevier Science. 2007. 429 p.
20. GARCIA-AYUSO, L. E.; AMADOR-HERNANDEZ, J.; FERNANDEZ-ROMERO, J. M. & DE CASTRO, M. D. L. "Characterization of jewellery products by laser-induced breakdown spectroscopy". *Anal. Chim. Acta*, **457**(2): 247, 2002.
21. JURADO-LOPEZ, A. & DE CASTRO, M. D. L. "An atypical interlaboratory assay: Looking for an updated hallmark (-jewelry) method". *Anal. Bioanal. Chem.*, **372**(1): 109, 2002.
22. ORTIZ, M. C.; SARABIA, L.; JURADO-LOPEZ, A. & DE CASTRO, M. D. L. "Minimum value assured by a method to determine gold in alloys by using laser-induced breakdown spectroscopy and partial least-squares calibration model". *Anal. Chim. Acta*, **515**(1): 151, 2004.

23. CANEVE, L.; COLAO, F.; FANTONI, R. & SPIZZICHINO, V. "Laser ablation of copper based alloys by single and double pulse laser induced breakdown spectroscopy". *Appl. Phys. A*, **85**(2): 151, 2006.
24. CRAVETCHI, I. V.; TASCHUK, M. T.; TSUI, Y. Y. & FEDOSEJEVS, R. "Evaluation of femtosecond LIBS for spectrochemical microanalysis of aluminium alloys". *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**(2): 287, 2006.
25. CRAVETCHI, I. V.; TASCHUK, M.; RIEGER, G. W.; TSUI, Y. Y. & FEDOSEJEVS, R. "Spectrochemical microanalysis of aluminum alloys by laser-induced breakdown spectroscopy: identification of precipitates". *Appl. Opt.*, **42**(30): 6138, 2003.
26. PANDHIJA, S. & RAI, A. K. "Laser-induced breakdown spectroscopy: A versatile tool for monitoring traces in materials". *Pramana-J. Phys.* **70**(3): 553, 2008.
27. FINK, H.; PANNE, U. & NIESSNER, R. "Process analysis of recycled thermoplasts from consumer electronics by laser-induced plasma spectroscopy". *Anal. Chem.*, **74**(17): 4334, 2002.
28. MILAN, M.; VADILLO, J. M. & LASERNA, J. J. "Removal of air interference in laser-induced breakdown spectrometry monitored by spatially and temporally resolved charge-coupled device measurements". *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **12**(4): 441, 1997.
29. SATTMANN, R.; MONCH, I.; KRAUSE, H.; NOLL, R.; COURIS, S.; HATZIAPOSTOULOU, A.; MAVROMANOLAKIS, A.; FOTAKIS, C.; LARRAURI, E. & MIGUEL, R. "Laser-induced breakdown spectroscopy for polymer identification". *Appl. Spectrosc.*, **52**(3): 456, 1998.
30. MARTIN, M. Z.; LABBE, N.; RIALS, T. G. & WULLSCHLEGER, S. D. "Analysis of preservative-treated wood by multivariate analysis of laser-induced breakdown spectroscopy spectra". *Spectrochim. Acta Part B*, **60**(7-8): 1179, 2005.
31. ACQUAVIVA, S.; DE GIORGI, M.L.; MARINI, C. & POSO, R. "Elemental analyses by laser induced breakdown spectroscopy as restoration test on a piece of ordnance". *J. Cult. Herit.*, **5**(4): 365, 2004.

32. BRUDER, R.; DETALLE, V. & COUPRY, C. "An example of the complementarity of laser-induced breakdown spectroscopy and Raman microscopy for wall painting pigments analysis". *J. Raman Spectrosc.*, **38**(7): 909, 2007.
33. KAMINSKA, A.; SAWCZAK, A.; KOMAR, K. & SLIWINSKI, G. "Application of the laser ablation for conservation of historical paper documents". *Appl. Surf. Sci.*, **253**(19): 7860, 2007.
34. DIKMELIK, Y.; MCENNIS, C. & SPICER, J. B. "Femtosecond and nanosecond laser-induced breakdown spectroscopy of trinitrotoluene". *Opt. Express*, **16**(8): 5332, 2008.
35. WILLIAMSON, C. K.; DANIEL, R. G.; MCNESBY, K. L. & MIZIOLEK, A. W. "Laser-induced breakdown spectroscopy for real-time detection of halon alternative agents". *Anal. Chem.*, **70**(6): 1186, 1998.
36. DE LUCIA, F. C.; GOTTFRIED, J. L. & MIZIOLEK, A. W. "Evaluation of femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy for explosive residue detection". *Opt. Express*, **17**(2): 419, 2009.
37. HARMON, R. S.; DELUCIA, F. C.; MCMANUS, C. E.; MCMILLAN, N. J.; JENKINS, T. F.; WALSH, M. E. & MIZIOLEK, A. "Laser-induced breakdown spectroscopy - An emerging chemical sensor technology for real-time field-portable, geochemical, mineralogical, and environmental applications". *Appl. Geochem.*, **21**(5): 730, 2006.
38. MCMILLAN, N.J.; MCMANUS, C.E.; HARMON, R.S.; DE LUCIA, F.C. & MIZIOLEK, A.W. "Laser-induced breakdown spectroscopy analysis of complex silicate minerals-beryl". *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**(2): 263, 2006.
39. ALVEY, D.C.; MORTON, K.; HARMON, R.S.; GOTTFRIED, J.L.; REMUS, J.J.; COLLINS, L.M. & WISE, M.A. "Laser-induced breakdown spectroscopy-based geochemical fingerprinting for the rapid analysis and discrimination of minerals: the example of garnet". *Appl. Opt.*, **49**(13): C168, 2010.
40. DEATH, D.L.; CUNNINGHAM, A.P. & POLLARD, L.J. "Multi-element analysis of iron ore pellets by laser-induced breakdown spectroscopy and principal components regression". *Spectrochim. Acta Part B*, **63**(7): 763, 2008.

41. DEATH, D.L.; CUNNINGHAM, A.P. & POLLARD, L.J. "Multi-element and mineralogical analysis of mineral ores using laser induced breakdown spectroscopy and chemometric analysis". *Spectrochim. Acta Part B*, **64**(10): 1048, 2009.
42. GALIOVA, M.; KAISER, J.; NOVOTNY, K.; NOVOTNY, J.; VACULOVIC, T.; LISKA, M.; MALINA, R.; STEJSKAL, K.; ADAM, V. & KIZEK, R. "Investigation of heavy-metal accumulation in selected plant samples using laser induced breakdown spectroscopy and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry". *Appl. Phys. A*, **93**(4): 917, 2008.
43. GIBB-SNYDER, E.; GULLETT, B.; RYAN, S.; OUDEJANS, L. & TOUATI, A. "Development of size-selective sampling of Bacillus anthracis surrogate spores from simulated building air intake mixtures for analysis via laser-induced breakdown spectroscopy". *Appl. Spectrosc.*, **60**(8): 860, 2006.
44. DIXON, P. B. & HAHN, D. W. "Feasibility of detection and identification of individual bioaerosols using laser-induced breakdown spectroscopy". *Anal. Chem.*, **77**(2): 631, 2005.
45. DOCKERY, C.R. & GOODE, S.R. "Laser-induced breakdown spectroscopy for the detection of gunshot residues on the hands of a shooter". *Applied Optics*. **42**(30): 6153, 2003.
46. TASCHUK, M. T.; TSUI, Y. Y. & FEDOSEJEVS, R. "Detection and mapping of latent fingerprints by laser-induced breakdown spectroscopy". *Appl. Spectrosc.* **60**(11): 1322, 2006.
47. SAMEK, O.; BEDDOWS, D.C.S.; TELLE, H.H.; MORRIS, G.W.; LISKA, M. & KAISER, J. "Quantitative analysis of trace metal accumulation in teeth using laser-induced breakdown spectroscopy". *Appl. Phys. A*, **69**: S179, 1999.
48. SAMEK, O.; BEDDOWS, D.C.S.; TELLE, H.H.; KAISER, J.; LISKA, M.; CACERES, J.O. & URENA, A.G. "Quantitative laser-induced breakdown spectroscopy analysis of calcified tissue samples". *Spectrochim. Acta Part B*, **56**(6): 865, 2001.
49. SUN, Q.; TRAN, M.; SMITH, B. W. & WINEFORDNER, J. D. "Zinc analysis in human skin by laser induced-breakdown spectroscopy". *Talanta*, **52**(2): 293, 2000.

50. ASSION, A.; WOLLENHAUPT, M.; HAAG, L.; MAYOROV, F.; SARPE-TUDORAN, C.; WINTER, M.; KUTSCHERA, U. & BAUMERT, T. "Femtosecond laser-induced-breakdown spectrometry for  $\text{Ca}^{2+}$  analysis of biological samples with high spatial resolution". *Appl. Phys. B*, **77**(4): 391, 2003.
51. CORSI, M.; CRISTOFORRETTI, G.; HIDALGO, M.; LEGNAIOLI, S.; PALLESCHI, V.; SALVETTI, A.; TOGNONI, E. & VALLEBONA, C. "Application of laser-induced breakdown spectroscopy technique to hair tissue mineral analysis". *Appl. Opt.*, **42**(30): 6133, 2003.
52. LABBE, N.; SWAMIDOSS, I. M.; ANDRE, N.; MARTIN, M. Z.; YOUNG, T. M. & RIALS, T. G. "Extraction of information from laser-induced breakdown spectroscopy spectral data by multivariate analysis". *Appl. Opt.*, **47**(31): G158, 2008.
53. BURAKOV, V. S.; TARASENKO, N. V.; NEDELKO, M. I.; KONONOV, V. A.; VASILEV, N. N. & ISAKOV, S. N. "Analysis of lead and sulfur in environmental samples by double pulse laser induced breakdown spectroscopy". *Spectrochim. Acta Part B*, **64**(2): 141, 2009.
54. MALAVOLTA, E. *Manual de nutrição de plantas*. São Paulo: Agronômicas Ceres, 2006.
55. MENGEL, K. & KIRKBY, E. A. *Principles of plant nutrition*. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 2001.
56. MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C. & OLIVEIRA, S. A. D. *Avaliação do estado nutricional das plantas*. Piracicaba: Potafos, 1997.
57. TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 2004.
58. ARAUJO, G. C. L.; GONZALEZ, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. R. A. & NOBREGA, J. A. "Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials". *Spectrochim. Acta Part B*, **57**(12): 2121, 2002.
59. FRANTZ, J. M.; LOCKE, J. C.; DATNOFF, L.; OMER, M.; WIDRIG, A.; STURTZ, D.; HORST, L. & KRAUSE, C. R. "Detection, Distribution, and Quantification of Silicon in Floricultural Crops utilizing Three Distinct Analytical Methods". *Commun. Soil Sci. Plan. Anal.*, **39**(17-18): 2734, 2008.

60. MOMEN, A. A.; ZACHARIADIS, G. A.; ANTHEMIDIS, A. N. & STRATIS, J. A. "Investigation of four digestion procedures for multi-element determination of toxic and nutrient elements in legumes by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, **565**(1): 81, 2006.
61. SAPKOTA, A.; KRACHLER, M.; SCHOLZ, C.; CHEBURKIN, A. K. & SHOTYK, W. "Analytical procedures for the determination of selected major (Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, and Ti) and trace (Li, Mn, Sr, and Zn) elements in peat and plant samples using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, **540**(2): 247, 2005.
62. MOKGALAKA, N.S.; MCCRINDLE, R.I. & BOTHA, B.M. "Multielement analysis of tea leaves by inductively coupled plasma optical emission spectrometry using slurry nebulisation". *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **19**(10): 1375, 2004.
63. ALVARADO, J. S.; NEAL, T. J.; SMITH, L. L. & ERICKSON, M. D. "Microwave dissolution of plant tissue and the subsequent determination of trace lanthanide and actinide elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, **322**(1-2): 11, 1996.
64. BAKER, J. H. & GREWELIN, T. "Extraction Procedure for Quantitative Determination of 6 Elements in Plant Tissue". *J Agr Food Chem.* **15**(2): 340, 1967.
65. JUVE, V.; PORTELLI, R.; BOUERI, M.; BAUDELET, M. & YU, J. "Space-resolved analysis of trace elements in fresh vegetables using ultraviolet nanosecond laser-induced breakdown spectroscopy". *Spectrochim. Acta Part B*, **63**(10): 1047, 2008.
66. KAISER, J.; GALIOVA, M.; NOVOTNY, K.; CERVENKA, R.; REALE, L.; NOVOTNY, J.; LISKA, M.; SAMEK, O.; KANICKY, V.; HRDLICKA, A.; STEJSKAL, K.; ADAM, V. & KIZEK, R. "Mapping of lead, magnesium and copper accumulation in plant tissues by laser-induced breakdown spectroscopy and laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry". *Spectrochim. Acta Part B*, **64**(1): 67, 2009.
67. POUZAR, M.; CERNOHORSKY, T.; PRUSOVA, M.; PROKOPCAKOVA, P. & KREJCOVA, A. "LIBS analysis of crop plants". *J. Anal. Atom. Spectrom.* **24**(7): 953, 2009.



68. SUN, Q.; TRAN, M.; SMITH, B. W. & WINEFORDNER, J. D. "Direct determination of P, Al, Ca, Cu, Mn, Zn, Mg and Fe in plant materials by laser-induced plasma spectroscopy". *Can. J. Anal. Sci. Spect.*, **44**(6): 164, 1999.
69. SAMEK, O.; LAMBERT, J.; HERGENRODER, R.; LISKA, M.; KAISER, J.; NOVOTNY, K. & KUKHLEVSKY, S. "Femtosecond laser spectrochemical analysis of plant samples". *Laser Phys. Lett.*, **3**(1): 21, 2006.
70. KAISER, J.; SAMEK, O.; REALE, L.; LISKA, M.; MALINA, R.; RITUCCI, A.; POMA, A.; TUCCI, A.; FLORA, F.; LAI, A.; MANCINI, L.; TROMBA, G.; ZANINI, F.; FAENOV, A.; PIKUZ, T. & CINQUE, G. "Monitoring of the heavy-metal hyperaccumulation in vegetal tissues by X-ray radiography and by femto-second laser induced breakdown spectroscopy". *Microsc. Res. Techniq.*, **70**(2): 147, 2007.
71. GORNUSHKIN, S.I.; GORNUSHKIN, I.B.; ANZANO, J.M.; SMITH, B.W. & WINEFORDNER, J.D. "Effective normalization technique for correction of matrix effects in laser-induced breakdown spectroscopy detection of magnesium in powdered samples". *Appl. Spectrosc.*, **56**(4): 433, 2002.
72. GALIOVA, M.; KAISER, J.; NOVOTNY, K.; SAMEK, O.; REALE, L.; MALINA, R.; PALENIKOVA, K.; LISKA, M.; CUDEK, V.; KANICKY, V.; OTRUBA, V.; POMA, A. & TUCCI, A. "Utilization of laser induced breakdown spectroscopy for investigation of the metal accumulation in vegetal tissues". *Spectrochim. Acta Part B*, **62**(12): 1597, 2007.
73. TREVIZAN, L. C.; SANTOS, D.; SAMAD, R. E.; VIEIRA, N. D.; NOMURA, C. S.; NUNES, L. C.; RUFINI, I. A. & KRUG, F. J. "Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of macronutrients in plant materials". *Spectrochim. Acta Part B*, **63**(10): 1151, 2008.
74. TREVIZAN, L. C.; SANTOS, D.; SAMAD, R. E.; VIEIRA, N. D.; NUNES, L. C.; RUFINI, I. A. & KRUG, F. J. "Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of micronutrients in plant materials". *Spectrochim. Acta Part B*, **64**(5): 369, 2009.
75. NUNES, L. C.; DA SILVA, G. A.; TREVIZAN, L. C.; SANTOS, D.; POPPI, R. J. & KRUG, F. J. "Simultaneous optimization by neuro-genetic approach for analysis of plant materials by laser induced breakdown spectroscopy". *Spectrochim. Acta Part B*, **64**(6): 565, 2009.

76. BRAGA, J. W. B.; TREVIZAN, L. C.; NUNES, L. C.; RUFINI, I. A.; SANTOS, D. & KRUG, F. J. "Comparison of univariate and multivariate calibration for the determination of micronutrients in pellets of plant materials by laser induced breakdown spectrometry". *Spectrochim. Acta Part B*, **65**(1): 66, 2010.
77. PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J. & ARRUDA, M. A. Z. "Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS". *Quím. Nova*, **25**: 246, 2002.
78. NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S. & BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos*. 3<sup>a</sup> ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2007. 480 p.
79. FERREIRA, S. L. C.; DOS SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B. & BOSQUE-SENDRA, J. A. "Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry - review". *Talanta*, **63**(4): 1061, 2004.
80. HRISTOZOV, D.; DOMINI, C. E.; KMETOV, V.; STEFANOVA, V.; GEORGIEVA, D. & CANALS, A. "Direct ultrasound-assisted extraction of heavy metals from sewage sludge samples for ICP-OES analysis". *Anal. Chim. Acta*, **516**(1-2): 187, 2004.
81. MELO, M. H. A.; COSTA, A. C. S.; NOBREGA, J. A. & FERREIRA, S. L. C. "The use of water soluble tertiary amine reagent for solubilization and metal determination in fish muscle tissue". *J. Brazil. Chem. Soc.*, **16**(1): 69, 2005.
82. JALBANI, N.; KAZI, T. G.; ARAIN, B. M.; JAMALI, M. K.; AFRIDI, H. I. & SARFRAZ, R. A., "Application of factorial design in optimization of ultrasonic-assisted extraction of aluminum in juices and soft drinks". *Talanta*, **70**(2): 307, 2006.
83. SORIANO, S.; NETTO, A.D.P. & CASSELLA, R. J., "Multivariate optimization of a microwave-assisted leaching procedure using dilute acid solutions, for FAAS determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in multivitamin/multimineral supplements". *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**(3): 1113, 2007.
84. CONDE, F. J.; AYALA, J. H.; AFONSO, A. M. & GONZALEZ, V. "Optimization of a sampling method to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke from incomplete biomass combustion". *Anal. Chim. Acta*, **524**(1-2): 287, 2004.

85. DE AMORIM, F. V.; BOF, C.; FRANCO, M. B.; DA SILVA, J. B. B. & NASCENTES, C. C. "Comparative study of conventional and multivariate methods for aluminum determination in soft drinks by graphite furnace atomic absorption spectrometry". *Microchem. J.* **82**(2): 168, 2006.
86. TREVIZAN, L. C.; VIEIRA, E. C.; NOGUEIRA, A. R. A. & NOBREGA, J. A. "Use of factorial design for evaluation of plasma conditions and comparison of two liquid sample introduction systems for an axially viewed inductively coupled plasma optical emission spectrometer". *Spectrochim. Acta Part B*, **60**(5): 575, 2005.
87. LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTROM, A.; PETTERSEN, J. & BERGMAN, R. "Experimental design and optimization". *Chemometr. Intell. Lab.*, **42**(1-2): 3, 1998.
88. DOEHLERT, D. H. "Uniform Shell Designs". *Roy. Stat. Soc. C-App.*, **19**(3): 231, 1970.
89. NECHAR, M.; MOLINA, M. F. M.; RODRIGUEZ, L. C. & SENDRA, J. M. B. "The Application of Doehlert Designs in the Optimization of Experimental-Variables in Solid-Phase Spectrophotometry". *Anal. Chim. Acta*, **316**(2): 185, 1995.
90. CAMPANA, A. M. G.; RODRIGUEZ, L. C.; GONZALEZ, A. L.; BARRERO, F. A. & CEBA, M. R. "Sequential response surface methodology for multioptimization in analytical chemistry with three-variable Doehlert designs". *Anal. Chim. Acta*, **348**(1-3): 237, 1997.
91. HU, Y. Z. & MASSART, D. L. "Uniform Shell Designs for Optimization in Reversed-Phase Liquid-Chromatography". *J. Chromatogr.*, **485**: 311, 1989.
92. CERQUEIRA, E. O. D.; ANDRADE, J. C. D.; POPPI, R. J. & MELLO, C. "Redes Neurais e suas Aplicações em Calibração Multivariada". *Quím. Nova*, **24**: 864, 2001.
93. DESPAGNE, F. & MASSART, D. L. "Neural networks in multivariate calibration". *Analyst*, **123**(11): 157r, 1998.
94. DA SILVA, G. A.; AUGUSTO, F. & POPPI, R. J. "Simultaneous optimization by neuro-genetic approach of a multiresidue method for determination of pesticides in *Passiflora alata* infuses using headspace solid phase microextraction and gas chromatography". *J. Chromatogr. A*, **1138**(1-2): 251, 2007.

95. MACKAY, D. J. C., "A Practical Bayesian Framework for Backpropagation Networks". *Neural Comput.*, **4**(3): 448, 1992.
96. BURDEN, F. R. & WINKLER, D. A. "Robust QSAR models using Bayesian regularized neural networks". *J. Med. Chem.*, **42**(16): 3183, 1999.
97. KUMAR, P.; MERCHANT, S. N. & DESAI, U. B. "Improving performance in pulse radar detection using Bayesian regularization for neural network training". *Digit Signal Process.*, **14**(5): 438, 2004.
98. LUCASIUS, C. B. & KATEMAN, G. "Understanding and Using Genetic Algorithms .2. Representation, Configuration and Hybridization". *Chemometr. Intell. Lab.*, **25**(2): 99, 1994.
99. PEREIRA, E. R.; MELLO, C.; COSTA, P. A.; ARRUDA, M. A. Z. & POPPI, R. J. "Neuro-genetic approach for optimisation of the spectrophotometric catalytic determination of cobalt". *Anal. Chim. Acta*, **433**(1): 111, 2001.
100. HOLLAND, J. H. "Genetic Algorithms". *Sci. Am.*, **267**(1): 66, 1992.
101. BOOKER, L. B.; GOLDBERG, D. E. & HOLLAND, J. H. "Classifier Systems and Genetic Algorithms". *Artif. Intell.*, **40**(1-3): 235, 1989.
102. NIST (National Institute of Standards and Technology), [http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines\\_form.html](http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html).
103. DEMUTH, H. BEALE, M. Neural network toolbox version 4.0 for use with MATLAB, THE MATHWORKS INC: NATICK, 2002.
104. HOUCK, C. JOINES, J.; KAY, M. A genetic algorithm for function optimization: A MATLAB implementation, NCSU-IE, Technical Report, 95-09. North Carolina State University.
105. OSYCZKA, A. *Multicriterion optimization in engineering*. Chichester: John Wiley & Sons, 1984.
106. ARAGON, C.; PENALBA, F. & AGUILERA, J.A. "Curves of growth of neutral atom and ion lines emitted by a laser induced plasma". *Spectrochim. Acta Part B*, **60**(7-8): 879, 2005.

107. AMADOR-HERNANDEZ, J.; GARCIA-AYUSO, L. E.; FERNANDEZ-ROMERO, J.M. & DE CASTRO, M.D.L. "Partial least squares regression for problem solving in precious metal analysis by laser induced breakdown spectrometry". *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **15**(6): 587, 2000.
108. SMITH, B. "25 years of lasers and analytical chemistry: A reluctant pairing with a promising future". *Trac-Trend. Anal. Chem.*, **26**(1): 60, 2007.
109. OTTO, M., *Chemometrics – Statistics and computer application in analytical chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, 1999.
110. GELADI, P. & KOWALSKI, B. R. "Partial Least-Squares Regression - a Tutorial". *Anal. Chim. Acta*, **185**: 1, 1986.
111. OSBORNE, S.D.; JORDAN, R. B. & KUNNEMEYER, R. "Method of wavelength selection for partial least squares". *Analyst*, **122**(12): 1531, 1997.
112. NORGAARD, L.; SAUDLAND, A.; WAGNER, J.; NIELSEN, J. P.; MUNCK, L. & ENGELSEN, S. B. "Interval partial least-squares regression (iPLS): A comparative chemometric study with an example from near-infrared spectroscopy". *Appl. Spectrosc.*, **54**(3): 413, 2000.
113. PASCHOAL, J.; BARBOZA, F. D. & POPPI, R. J. "Analysis of contaminants in lubricant oil by near infrared spectroscopy and interval partial least-squares". *J. near Infrared Spec.*, **11**(3): 211, 2003.
114. LORBER, A. "Error Propagation and Figures of Merit for Quantification by Solving Matrix Equations". *Anal. Chem.*, **58**(6): 1167, 1986.
115. GOICOECHEA, H. C. & OLIVIERI, A. C. "A comparison of orthogonal signal correction and net analyte preprocessing methods. Theoretical and experimental study". *Chemometr. Intell. Lab.*, **56**(2): 73, 2001.
116. FERRE, J.; BROWN, S. D. & RIUS, F. X. "Improved calculation of the net analyte signal in inverse multivariate calibration". *J. Chemometr.*, **15**(6): 537, 2001.
117. MARTIN, M. Z.; LABBE, N.; ANDRE, N.; HARRIS, R.; EBINGER, M.; WULLSCHLEGER, S. D. & VASS, A. A. "High resolution applications of laser-induced breakdown spectroscopy for environmental and forensic applications". *Spectrochim. Acta Part B*, **62**(12): 1426, 2007.
118. BOUSQUET, B.; SIRVEN, J. B. & CANIONI, L., "Towards quantitative laser-induced breakdown spectroscopy analysis of soil samples". *Spectrochim. Acta Part B*, **62**(12): 1582, 2007.

119. MUNSON, C. A.; DE LUCIA, F. C.; PIEHLER, T.; MCNESBY, K. L. & MIZIOLEK, A. W. "Investigation of statistics strategies for improving the discriminating power of laser-induced breakdown spectroscopy for chemical and biological warfare agent simulants". *Spectrochim. Acta Part B*, **60**(7-8): 1217, 2005.
120. PONTES, M. J. C.; CORTEZ, J.; GALVAO, R. K. H.; PASQUINI, C.; ARAUJO, M. C. U.; COELHO, R. M.; CHIBA, M. K.; DE ABREU, M. F. & MADARI, B. E. "Classification of Brazilian soils by using LIBS and variable selection in the wavelet domain". *Anal. Chim. Acta*, **642**(1-2): 12, 2009.
121. GOTTFRIED, J. L.; DE LUCIA, F. C.; MUNSON, C. A. & MIZIOLEK, A. W. "Strategies for residue explosives detection using laser-induced breakdown spectroscopy". *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **23**(2): 205, 2008.
122. SIRVEN, J. B.; SALLE, B.; MAUCHIEN, P.; LACOUR, J. L.; MAURICE, S. & MANHES, G. "Feasibility study of rock identification at the surface of Mars by remote laser-induced breakdown spectroscopy and three chemometric methods". *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **22**(12): 1471, 2007.
123. REMUS, J. J.; GOTTFRIED, J. L.; HARMON, R. S.; DRAUCKER, A.; BARON, D. & YOHE, R. "Archaeological applications of laser-induced breakdown spectroscopy: an example from the Coso Volcanic Field, California, using advanced statistical signal processing analysis". *Applied Optics*. **49**(13): C120, 2010.
124. DE LUCIA, F. C.; GOTTFRIED, J. L.; MUNSON, C. A. & MIZIOLEK, A. W. "Multivariate analysis of standoff laser-induced breakdown spectroscopy spectra for classification of explosive-containing residues". *Appl. Optics*, **47**(31): G112, 2008.
125. DUCHENE, S.; DETALLE, V.; BRUDER, R. & SIRVEN, J. B. "Chemometrics and Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) Analyses for Identification of Wall Paintings Pigments". *Curr. Anal. Chem.*, **6**(1): 60, 2010.
126. GOTTFRIED, J. L.; DE LUCIA, F. C.; MUNSON, C. A. & MIZIOLEK, A. W. "Standoff detection of chemical and biological threats using laser-induced breakdown spectroscopy". *Appl. Spectrosc.*, **62**(4): 353, 2008.
127. GOTTFRIED, J. L.; HARMON, R. S.; DE LUCIA, F. C. & MIZIOLEK, A. W. "Multivariate analysis of laser-induced breakdown spectroscopy chemical signatures for geomaterial classification". *Spectrochim. Acta Part B*, **64**(10): 1009, 2009.

128. MARTELLI, M. R.; BRYGO, F.; SADOUDI, A.; DELAPORTE, P. & BARRON, C., "Laser-Induced Breakdown Spectroscopy and Chemometrics: A Novel Potential Method to Analyze Wheat Grains". *J. Agr. Food. Chem.*, **58**(12): 7126, 2010.
129. SAMUELS, A. C.; DELUCIA, F. C.; MCNESBY, K. L. & MIZIOLEK, A. W. "Laser-induced breakdown spectroscopy of bacterial spores, molds, pollens, and protein: initial studies of discrimination potential". *Appl. Optics*, **42**(30): 6205, 2003.
130. CORSI, M.; CRISTOFORETTI, G.; GIUFFRIDA, M.; HIDALGO, M.; LEGNAIOLI, S.; MASOTTI, L.; PALLESCHI, V.; SALVETTI, A.; TOGNONI, E.; VALLEBONA, C. & ZANINI, A. "Archaeometric analysis of ancient copper artefacts by laser-induced breakdown spectroscopy technique". *Microch. Acta*. **152**(1-2): 105, 2005.
131. GONZAGA, F. B. & PASQUINI, C. "A Complementary Metal Oxide Semiconductor sensor array based detection system for Laser Induced Breakdown Spectroscopy: Evaluation of calibration strategies and application for manganese determination in steel". *Spectrochim. Acta Part B*, **63**(1): 56, 2008.
132. DOUCET, F. R.; BELLIVEAU, T. F.; FORTIER, J. L. & HUBERT, J. "Use of chemometrics and laser-induced breakdown spectroscopy for quantitative analysis of major and minor elements in aluminum alloys". *Appl. Spectrosc.*, **61**(3): 327, 2007.
133. JURADO-LOPEZ, A. & DE CASTRO, M. D. L. "Chemometric approach to laser-induced breakdown analysis of gold alloys". *Appl. Spectrosc.*, **57**(3): 349, 2003.
134. DOUCET, F. R.; FAUSTINO, P. J.; SABSABI, M. & LYON, R. C. "Quantitative molecular analysis with molecular bands emission using laser-induced breakdown spectroscopy and chemometrics". *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **23**(5): 694, 2008.
135. GOODE, S. R.; MORGAN, S. L.; HOSKINS, R. & OXSHER, A. "Identifying alloys by laser-induced breakdown spectroscopy with a time-resolved high resolution echelle spectrometer". *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **15**(9): 1133, 2000.

136. SIRVEN, J. B.; BOUSQUET, B.; CANIONI, L. & SARGER, L. "Laser-induced breakdown spectroscopy of composite samples: Comparison of advanced chemometrics methods". *Anal. Chem.* **78**(5): 1462, 2006.
137. SIRVEN, J. B.; BOUSQUET, B.; CANIONI, L.; SARGER, L.; TELLIER, S.; POTIN-GAUTIER, M. & LE HECHO, I. "Qualitative and quantitative investigation of chromium-polluted soils by laser-induced breakdown spectroscopy combined with neural networks analysis". *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**(2): 256, 2006.
138. FERREIRA, E. C.; MILORI, D. M. B. P.; FERREIRA, E. J.; DA SILVA, R. M. & MARTIN-NETO, L. "Artificial neural network for Cu quantitative determination in soil using a portable Laser Induced Breakdown Spectroscopy system". *Spectrochim. Acta Part B*, **63**(10): 1216, 2008.
139. PALANCO, S. & LASERNA, J. J. "Full automation of a laser-induced breakdown spectrometer for quality assessment in the steel industry with sample handling, surface preparation and quantitative analysis capabilities". *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **15**(10): 1321, 2000.
140. JURADO-LOPEZ, A. & DE CASTRO, M. D. L. "Rank correlation of laser-induced breakdown spectroscopic data for the identification of alloys used in jewelry manufacture". *Spectrochim. Acta Part B*, **58**(7): 1291, 2003.
141. JURADO-LOPEZ, A. & DE CASTRO, M. D. L. "Laser-induced breakdown spectrometry in jewellery industry. Part II: quantitative characterisation of goldfilled interface". *Talanta*. **59**(2): 409, 2003.
142. PANNE, U.; CLARA, M.; HAISCH, C. & NIESSNER, R. "Analysis of glass and glass melts during the vitrification of fly and bottom ashes by laser-induced plasma spectroscopy. Part II. Process analysis". *Spectrochim. Acta Part B*, **53**(14): 1969, 1998.
143. LUQUE-GARCIA, J.L.; SOTO-AYALA, R. & DE CASTRO, M. D. L. "Determination of the major elements in homogeneous and heterogeneous samples by tandem laser-induced breakdown spectroscopy-partial least square regression". *Microchem. J.* **73**(3): 355, 2002.
144. BALZER, H.; HOELTERS, S.; STURM, V. & NOLL, R. "Systematic line selection for online coating thickness measurements of galvanised sheet steel using LIBS". *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**(2): 234, 2006.



145. KRAUSHAAR, M.; NOLL, R. & SCHMITZ, H. U. "Slag analysis with laser-induced breakdown spectrometry". *Appl. Spectrosc.* **57**(10): 1282, 2003.
146. STURM, V.; SCHMITZ, H. U.; REUTER, T.; FLEIGE, R. & NOLL, R., "Fast vacuum slag analysis in a steel works by laser-induced breakdown spectroscopy". *Spectrochim. Acta Part B*, **63**(10): 1167, 2008.
147. DA SILVA, R. M.; MILORI, D. M. B. P.; FERREIRA, E. C.; FERREIRA, E. J.; KRUG, F. J. & MARTIN-NETO, L. "Total carbon measurement in whole tropical soil sample". *Spectrochim. Acta Part B*, **63**(10): 1221, 2008.
148. ESSINGTON, M. E.; MELNICHENKO, G. V.; STEWART, M. A. & HULL, R. A., "Soil Metals Analysis Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS)". *Soil Sci. Soc. Am. J.* **73**(5): 1469, 2009.
149. YUN, J. I.; KLENZE, R. & KIM, J. I., "Laser-induced breakdown Spectroscopy for the on-line multielement analysis of highly radioactive glass melt simulants. Part II: Analyses of molten glass samples". *Appl. Spectrosc.* **56**(7): 852, 2002.
150. WOLD, S.; ESBENSEN, K. & GELADI, P., "Principal Component Analysis". *Chemometr. Intell. Lab.*, **2**(1-3): 37, 1987.
151. BRO, R. & SMILDE, A. K., "Centering and scaling in component analysis". *J. Chemometr.*, **17**(1): 16, 2003.
152. MARTENS, H. & NAES, T. *Multivariate calibration*. New York: John Wiley & Sons Inc, 1996.
153. CURRIE, L. A., "Detection: International update, and some emerging dilemmas involving calibration, the blank, and multiple detection decisions". *Chemometr. Intell. Lab.*, **37**(1): 151, 1997.
154. ZEISLER, R., "Reference materials for small-sample analysis". *Fresen. J. Anal. Chem.*, **360**(3-4): 376, 1998.
155. ROSSBACH, M. & ZEILLER, E. "Assessment of element-specific homogeneity in reference materials using microanalytical techniques". *Anal. Bioanal. Chem.*, **377**(2): 334, 2003.
156. ARROYO, L.; TREJOS, T.; GARDINALI, P. R. & ALMIRALL, J. R. "Optimization and validation of a Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry method for the routine analysis of soils and sediments". *Spectrochim. Acta Part B*, **64**(1): 16, 2009.