

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

**“DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE DIRETA DE  
FOLHAS DE SOJA E MILHO EMPREGANDO A  
*LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY (LIBS)*”**

**João Victor Borges Assis\***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE PROFISSIONAL EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA.

**Orientador: Edenir Rodrigues Pereira Filho**

**\* Químico de P&D (Hoff e Brait Ltda)**

**São Carlos – SP**

**Junho de 2023**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato João Victor Borges Assis, realizada em 22/06/2023.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho (UFSCar)

Prof. Dr. Carlos Henrique Hoff Brait (Labexata)

Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira (EMBRAPA)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e  
fazer um novo começo, qualquer um pode  
começar agora e fazer um novo fim.”*

*Chico Xavier*

*“A vida é feita de momentos, momentos pelos  
quais temos que passar, sendo bons ou não,  
para o nosso aprendizado. Nada é por acaso.  
Precisamos fazer a nossa parte, desempenhar  
o nosso papel no palco da vida, lembrando de  
que a vida nem sempre segue o nosso querer,  
mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”*

*Chico Xavier*

**Dedico este trabalho a todos aqueles que  
veem a Ciência como meio que nos ajuda  
a compreender aquilo que, por hora,  
está incompreendido.**

## Agradecimentos

- À Deus, à vida, ao cosmos, à força maior que nos rege, por colocar na minha vida aquilo que é necessário, por mostrar que em cada amanhecer sempre há uma nova oportunidade. Meu muitíssimo obrigado por TUDO!
- Ao meu pai, Geneilton, e à minha mãe, Alessandra, por todo apoio e incentivo durante toda a minha vida, por sempre batalharem e garantirem que eu seguisse os meus sonhos, por todos os conselhos e consolos nos momentos difíceis, por sempre estarem presentes na minha vida.
- Aos meus irmãos, Pedro Augusto e Ana Júlia, por sempre estarem comigo nos momentos de dificuldade, pela amizade e pelas alegrias e risadas trocadas desde sempre.
- Ao meu orientador, Edenir, pela amizade, pelo apoio, sugestões e conselhos fornecidos durante a realização do mestrado.
- Ao Grupo Exata Brasil, pela oportunidade de ter tido acesso a melhor tecnologia possível. Sem o apoio estrutural e profissional deste Laboratório, nada disso seria possível.
- Aos meus chefes, Carlos e Daniela, por todo conhecimento trocado, pela amizade, pelo companheirismo e pela confiança depositada para realização deste mestrado.
- À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em especial ao Departamento de Química (DQ), por toda estrutura, receptividade e apoio fornecidos durante o período de realização da parte experimental.
- Ao Dennis, amigo que fiz quando estive em São Carlos, por toda ajuda na obtenção dos espectros, tratamento de dados e correção de textos.
- A todos os meus amigos, colegas de trabalho e familiares que contribuíram de certa forma para realização deste trabalho.
- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## LISTA DE ABREVIATURAS

B	Boro
Ca	Cálcio
CV	Coeficiente de variação
DPR	Desvio Padrão Relativo
Fe	Ferro
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico
ICP OES	Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado ( <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> )
K	Potássio
LD	Limite de detecção
LIBS	Espectroscopia de Emissão em Plasma Induzido por Laser ( <i>Laser-Induced Breakdown Spectroscopy</i> )
LQ	Limite de quantificação
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
MRC	Materiais de referência certificados
P	Fósforo
PLS	Mínimos quadrados parciais ( <i>Partial least squares</i> )
PRESS <sub>cv</sub>	Soma dos quadrados dos erros de previsão da validação cruzada ( <i>Predicted Residual Error Sum of Squares</i> )
S	Enxofre

SEC	Erro Padrão de Calibração ( <i>Standard Error of Calibration</i> )
SECV	Erro Padrão de Validação Cruzada ( <i>Standard Error of Cross-validation</i> )
SEP	Erro Padrão de Previsão ( <i>Standard Error of Prediction</i> )
SEV	Erro Padrão de Validação ( <i>Standard Error of Validation</i> )
Y	Ítrio
Zn	Zinco

## LISTA DE TABELAS

TABELA 2.2.1 Faixas de concentrações e funções bioquímicas de macro e micronutrientes em plantas sadias de interesse agrônômico. ....	5
TABELA 4.1.1. Faixas de concentração dos analitos de interesse nas amostras selecionadas para este trabalho. ....	19
TABELA 4.2.1. Condições de operação do LIBS. ....	23
TABELA 4.2.2. Condições de operação do ICP OES. ....	24
TABELA 4.3.2.1. Programa de aquecimento para digestão das amostras. ....	26
TABELA 5.2.1. Resumo dos dados obtidos para os modelos uni e multivariado para cultura de milho. ....	42
TABELA 5.2.2. Resumo dos dados obtidos para os modelos uni e multivariado para cultura de soja. ....	43
TABELA 5.2.3. Resumo dos dados obtidos para os modelos uni e multivariado para cultura de soja com pecíolo. ....	44
Tabela 5.3.1. Comparativo da precisão entre as metodologias. ....	52

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.2.1. Esquema de um equipamento de digestão assistida por radiação micro-ondas.....	7
FIGURA 2.3.1. Configuração instrumental típica de um equipamento LIBS. ....	8
FIGURA 2.3.2. Número de publicações sobre espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser entre 1972 e 2022.....	10
FIGURA 4.2.1. Visão geral da estufa TE-394/5 da Tecnal.....	20
FIGURA 4.2.2. Visão geral do moinho tipo Willey TE-650/1 da Tecnal.....	20
FIGURA 4.2.3. Visão geral do micro-ondas MARS 5 da CEM. ....	21
FIGURA 4.2.4. Visão geral do ICP OES Optima 8300 da PerkinElmer acoplado ao auto amostrador SC-14 da ESI. ....	22
FIGURA 4.2.5. Visão geral do equipamento LIBS J200 da Applied Spectra.....	23
FIGURA 4.2.6. Visão geral da prensa hidráulica SL-10 da Solab. ....	25
FIGURA 4.3.3.1. Ilustração das etapas envolvidas na obtenção das pastilhas de materiais vegetais para análise via LIBS.....	27
FIGURA 5.1.1. Scores da PC1 E PC2, obtidos pela PCA com as concentrações dos analitos determinadas por ICP OES nas culturas de milho, soja e soja com pecíolo. ....	32
FIGURA 5.1.2. Loadings obtidos para cada variável referente à PC1 da PCA das culturas de soja, soja com pecíolo e milho. ....	33
FIGURA 5.1.3. Loadings obtidos para cada variável referente ao PC2 da PCA das culturas de soja, soja com pecíolo e milho. ....	33
FIGURA 5.1.4. Scores obtidos para dois componentes principais, obtidos pela PCA com as concentrações dos analitos determinadas por ICP OES nas culturas de soja e soja com pecíolo. ....	34
FIGURA 5.1.5. Loadings obtidos para cada variável referente à PC1 da PCA das culturas de soja e soja com pecíolo. ....	35
FIGURA 5.1.6. Loadings obtidos para cada variável referente à PC2 da PCA das culturas de soja e soja com pecíolo. ....	35
FIGURA 5.1.7. Espectro médio de emissão obtido via LIBS para cultura de milho. ....	36



FIGURA 5.1.8. Espectro médio de emissão obtido via LIBS para cultura de soja.	37
FIGURA 5.1.9. Espectro médio de emissão obtido via LIBS para cultura de soja com pecíolo.....	37
FIGURA 5.1.10. Espectro médio de emissão da soja com pecíolo e a identificação das principais linhas de emissão.....	39
FIGURA 5.2.1. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o Cu na soja com pecíolo.....	41
FIGURA 5.2.2. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o Ca no milho. ....	46
FIGURA 5.2.3. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o K no milho. ....	46
FIGURA 5.2.4. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o Mg no milho.....	47
FIGURA 5.2.5. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o Ca na soja. ....	47
FIGURA 5.2.6. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o K na soja. ....	48
FIGURA 5.2.7. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o Mg na soja.....	48
FIGURA 5.2.8. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o Ca na soja com pecíolo.....	49
FIGURA 5.2.9. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o K na soja com pecíolo.....	49
FIGURA 5.2.10. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o Mg na soja com pecíolo. ....	50
FIGURA 5.2.11. Comprimentos de onda de emissão do elemento Mg, selecionados para construção do modelo de calibração multivariada para cultura de soja. ....	51
FIGURA 5.3.1. Histograma de distribuição de DPR para o analito Ca. ....	53
FIGURA 5.3.2. Histograma de distribuição de DPR para o analito K. ....	53
FIGURA 5.3.3. Histograma de distribuição de DPR para o analito Mg. ....	54

## RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE DIRETA DE FOLHAS DE SOJA E MILHO POR MEIO DA *LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY* (LIBS). Esse trabalho foi dedicado ao desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de macronutrientes (P, K, Ca, Mg) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn, S e Zn) em folhas de milho, soja e soja com pecíolo. A principal proposta do estudo foi apresentar a Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) como uma alternativa viável para a análise direta de amostras de folhas utilizando ferramentas quimiométricas para interpretar os dados obtidos. A condição de utilização escolhida para o LIBS foi de 70 mJ de energia, 1,0  $\mu$ s de delay time e 100  $\mu$ m de spot size, a qual foi aplicada em 952 amostras, sendo 81 de milho, 305 de soja e 566 de soja com pecíolo. Os valores de referência dos analitos para a construção de modelos de calibração foram obtidos utilizando a técnica de Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES). Para minimizar as variações do sinal e as diferenças das matrizes das amostras, foram testados doze modos de normalizações e duas estratégias de calibração. Foram estudadas: calibração multivariada utilizando Partial Least Squares (PLS) e calibração univariada empregando área e altura de várias linhas de emissão. Assim, buscou-se o melhor modo de normalização, linha de emissão e estratégia de calibração para cada analito. O modo de normalização notável para a maioria dos modelos foi a norma euclidiana. Nenhum analito apresentou bons resultados para calibrações univariadas. Os modelos multivariados para P, S e os micronutrientes não apresentaram resultados satisfatórios. Os modelos multivariados obtidos para Ca, K e Mg apresentaram bons resultados. O erro padrão de calibração (SEC) variou de 0,5 g/kg, para Mg em folhas de milho com 2 variáveis latentes, até 4,9 g/kg, para K em folhas de soja com pecíolo com 2 variáveis latentes. Como conclusão do trabalho, os modelos de calibração propostos foram testados em conjuntos de dados de validação e predição com resultados promissores para análise de rotina direta da planta para Ca, K e Mg.

## ABSTRACT

DEVELOPMENT OF DIRECT METHOD ANALYSIS OF SOY AND CORN LEAVES USING *LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY* (LIBS). This academic master's dissertation was devoted to the development of analytical methods for the determination of macronutrients (P, K, Ca, Mg) and micronutrients (B, Cu, Fe, Mn, S and Zn) in corn, soy (without and with petiole) leaves. The main purpose of this study was to present Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) as a viable alternative for the direct analysis of leaf samples using chemometric tools to interpret the data obtained. The usage condition chosen for LIBS was 70 mJ of energy, 1.0  $\mu$ s of delay time and 100  $\mu$ m of spot size, which were applied to 952 samples, 81 of corn, 305 of soy and 566 of soy with petiole. The reference values of the analytes for the construction of calibration models were obtained using the Inductively Coupled Plasma Optical Emission spectroscopy (ICP OES). To minimize signal variations and sample matrix differences, twelve normalization modes and two calibration strategies were tested. The following were studied: multivariate calibration using Partial Least Squares (PLS) and univariate calibration using area and height of several emission lines. Thus, sought to identify the best normalization mode, emission line and calibration strategy for each analyte. The noteworthy normalization mode for most models was the Euclidean norm. No analyte showed good results for univariate calibrations. Multivariate models for P, S and micronutrients did not show satisfactory results. The models obtained for Ca, K and Mg showed good results, the standard error of calibration (SEC) varied from 0.5 g/kg, for Mg in corn leaves with 2 latent variables, up to 4.9 g/kg, for K in soy with petiole leaves with 2 latent variables. As a conclusion of the work, the proposed calibration models were tested on validation and prediction datasets with promising results for direct routine analysis of the plant for Ca, K and Mg.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 Importância das culturas de soja e milho .....	3
2.2 Avaliação do estado nutricional das plantas .....	4
2.3 LIBS .....	8
2.4 A Quimiometria aplicada à LIBS .....	10
2.5 Análise Foliar via LIBS .....	15
3. Objetivo e Justificativa.....	17
4. Materiais e Métodos .....	18
4.1 Amostras .....	18
4.2 Instrumentação .....	20
4.3 Preparo de amostras.....	25
4.3.1 Determinação do nitrogênio .....	25
4.3.2 ICP OES.....	26
4.3.3 LIBS.....	26
4.4 Modelos de calibração univariada e multivariada.....	27
5. Resultado e Discussão.....	31
5.1 Caracterização das culturas.....	31
5.2 Modelos de calibração uni e multivariados.....	40
5.3 Comparativo da precisão entre os métodos.....	52
6. Conclusão .....	55
7. Referências .....	56
Anexos .....	60

Apêndices..... 64

## 1. Introdução

O Laboratório Exata, atualmente unidade Goiás do Grupo Exata Brasil, foi inaugurado em fevereiro de 1997. Desde então, já são quase três décadas auxiliando na tomada de decisões no agronegócio, por meio da entrega de análises agroindustriais confiáveis, precisas e exatas. Quando as atividades do laboratório foram iniciadas, havia uma considerável carência regional por uma empresa especializada em análises destinadas ao agropecuário. Ao longo do tempo de atuação, o Grupo Exata Brasil foi se renovando e buscando novas capacitações para outras demandas analíticas. Com mais de 110 funcionários, o grupo se destaca como um dos maiores laboratórios agrônômicos da América Latina, com capacidade para analisar diariamente 5 mil amostras de solo, mais de 400 amostras de tecido vegetal, além de oferecer análises de fertilizantes, fármacos, alimentos, corretivos agrícolas e outras matrizes complexas. Atualmente, um dos serviços mais requisitados é a análise foliar. Por ano, são analisadas cerca de 20 mil amostras de folha. Em uma análise foliar típica são determinados 11 analitos (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn) (EXATA BRASIL, 2022).

No que diz respeito as análises, sabe-se que o preparo das amostras, além de ser a etapa que geralmente demanda o maior tempo, é a principal fonte de erros associados às medidas analíticas. A maioria dos procedimentos necessita da adição de reagentes e da aplicação de energia suficiente para romper as interações presentes nas amostras. A abertura destes materiais por meio da radiação micro-ondas em frascos fechados na presença de ácidos oxidantes e peróxido de hidrogênio é, atualmente, referência em determinações analíticas (KRUG e ROCHA, 2019).

No entanto, a necessidade de desenvolver estratégias mais simples, sustentáveis e econômicas tem sido foco de inúmeras pesquisas. Considerando uma rotina de análises, as variáveis tempo e frequência de análise, custo do preparo de amostras e da análise e geração de resíduos devem ser constantemente avaliados. Neste contexto, a possibilidade de analisar diretamente as amostras com

mínimo ou nenhum tratamento prévio é vista como uma alternativa atraente para aumentar a frequência de amostragem (COSTA et al., 2019) (OLIVEIRA, 2003).

Diante do exposto, visando sempre a qualidade e agilidade dos resultados entregues pelo laboratório, essa dissertação de mestrado profissional visou a proposição de métodos rápidos e confiáveis para a análise direta de folhas de soja e milho. No desenvolvimento da parte experimental utilizou-se a técnica de espectroscopia de emissão em plasma induzido por laser (*Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*, LIBS) que permite a análise com mínimo preparo das amostras sólidas (análise direta).

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 Importância das culturas de soja e milho

A soja (*Glycine max L.*) é a principal oleaginosa cultivada no mundo, sendo uma das culturas de maior relevância no mercado mundial. No Brasil, foi o cultivo que mais cresceu nas últimas três décadas. Em 2022, a soja em grãos registrou 2,45 milhões de toneladas em exportações, representando uma receita de US\$ 1,24 bilhão, valor recorde para o mês de janeiro (CONAB, 2022).

A ampliação na produção de soja está ligada a vários fatores, dentre os quais destacam-se: (i) teores proteicos (~ 40%) e de óleo (~ 20%) consideráveis, uma vez que são favoráveis para alimentação, produção de biocombustíveis, entre outros setores; (ii) mercadoria padronizada e uniforme, o que facilita produção, negociação e transporte; (iii) houve a ampliação significativa de áreas e produtividade da oleaginosa, com a crescente oferta de tecnologias de produção (HIRAKURI e LAZZAROTTO, 2011).

Estudos indicam que a produção de soja no Brasil pode alcançar 146,5 milhões de toneladas em 2026/2027. A área plantada de soja pode aumentar 9,3 milhões de hectares nos próximos 5 anos, chegando a 43,2 milhões de hectares em 2027 (MAPA, 2017).

A indústria nacional produz por ano cerca de 6,0 milhões de toneladas de óleo comestível e 24 milhões de toneladas de farelo proteico, contribuindo para a produção de carnes, ovos e leite. Ademais, a soja também é uma alternativa para fabricação de biodiesel, combustível capaz de reduzir em 78% a emissão de gases do efeito estufa (ABIOVE, 2022).

Já o milho (*Zea mays L.*) foi um dos primeiros grupos de grãos domesticados para consumo humano e beneficiamento na forma de ração para o consumo animal. É a segunda cultura agrícola e o principal cereal cultivado no Brasil, atingindo na safra de 2021/2022 aproximadamente 115 mil toneladas. O Brasil ocupa o terceiro lugar no ranking de produtores mundiais de milho, com



produção total de 115,2 milhões de toneladas e área plantada da ordem de 21,6 mil hectares, resultando em uma produtividade média de 5,32 mil kg/ha. Esta cultura possui grande importância econômica, devido ao alto valor nutricional de seus grãos e por seu uso intenso na alimentação humana e animal, além de ser a base de várias cadeias agroindustriais (CONAB, 2022).

## **2.2 Avaliação do estado nutricional das plantas**

As plantas, seres autotróficos, utilizam a energia fotoquímica da luz solar juntamente aos nutrientes essenciais – dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e 14 elementos – para produzir os componentes necessários para o seu desenvolvimento. Os nutrientes essenciais possuem uma variedade de funções, dentre elas: energética e/ou estrutural; ativadores enzimáticos (cofatores); reguladores de potenciais eletroquímicos e osmóticos; entre outros (MARSCHNER, 2012).

Sabe-se que 95% da matéria seca das plantas é composta basicamente por hidrogênio, carbono e oxigênio, sendo o restante corresponde aos 6 macronutrientes (Ca, K, Mg, N, P, S) e 8 micronutrientes (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn). A divisão entre macro e micronutrientes não tem correlação com uma maior ou menor importância, e sim, na maior ou menor quantidade do nutriente. Os macronutrientes estão basicamente ligados com o processo de síntese proteica, formação da parede celular e o transporte de energia. Já os micronutrientes, com processos de ativação enzimática e proteção contra estresse oxidativo. A TABELA 2.2.1 mostra a faixa de concentração de macro e micronutrientes considerados essenciais para as plantas em bom estado nutricional e seus respectivos papéis metabólicos (HUSTED et al., 2011) (SANTOS JR et al., 2012).

TABELA 2.2.1 Faixas de concentrações e funções bioquímicas de macro e micronutrientes em plantas saudias de interesse agrônômico.

	Faixas de concentrações	Função bioquímica
<b>Macronutriente (g/kg)</b>		
Ca	2 – 60	Síntese e estabilização da parede celular e transdução de sinal
K	6 – 60	Translocação, osmorregulação, homeostase do pH e ativação enzimática
Mg	1 – 10	Fotossíntese (átomo central da clorofila) e ativação enzimática
N	0,1 – 20	Síntese proteica, formação dos ácidos nucleicos e equilíbrio hormonal
P	0,8 – 10	Transporte de energia e biomembranas
S	0,1 - 10	Síntese e funcionalidade de proteínas
<b>Micronutriente (mg/kg)</b>		
B	10 – 200	Estabilização da parede celular, biossíntese de nucleotídeos, translocação e germinação de pólen
Cl	100 – 40000	Eletroneutralidade, osmorregulação e fotossíntese
Cu	3 – 50	Ativação enzimática, síntese de componentes da parede celular, transporte de elétrons e proteção contra estresse oxidativo
Fe	50 – 900	Ativação enzimática, transporte de elétrons, biossíntese de clorofila e proteção contra o estresse oxidativo
Mn	20 – 2000	Ativação enzimática, fotossíntese, transporte de elétrons, síntese de componentes da parede celular e proteção contra o estresse oxidativo
Mo	0,2 – 2	Ativação enzimática, fixação de nitrogênio e redução de nitrato
Ni	< 1,0	Ativação enzimática e metabolismo da ureia
Zn	5 – 200	Expressão genica, ativação enzimática, síntese de hormônios e ácidos nucléicos e proteção contra o estresse oxidativo

Fonte: Adaptado de HUSTED et al. (2011) e SANTOS JR et al. (2012).

A análise do tecido vegetal é essencial para o adequado crescimento das plantas, alto rendimento e produtividade, e garantia da qualidade dos produtos. Assim, por meio da determinação de elementos essenciais, é possível identificar quais estão presentes em quantidades inadequadas e, desse modo, corrigir as deficiências empregando fertilizantes e/ou outros insumos agrícolas. A avaliação do estado nutricional é geralmente feita por meio da diagnose foliar, pois a folha é o órgão que melhor reflete o estado nutricional da cultura, isto é, responde mais às variações nos suprimentos de nutrientes. É válido destacar que esse tipo de análise deve ser empregada, sempre que possível, em conjunto com a análise de fertilidade do solo para obter melhores resultados. Mediante esta necessidade, técnicas analíticas que possibilitem análises multielementares têm se tornado ferramentas importantes na avaliação do estado nutricional das plantas e da qualidade dos produtos vegetais (MAATHUIS, 2013).

Dentro desta perspectiva, a técnica de ICP OES – do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* – tem sido muito empregada em análises de rotinas por sua alta capacidade de determinação simultânea. Geralmente, para determinação dos analitos por meio desta técnica, é necessário que as amostras estejam na forma de soluções líquidas. Para tanto, as amostras sólidas, além das etapas de pré-processamento (lavagem, secagem, moagem), devem ser cuidadosamente decompostas para, posteriormente, serem feitas as determinações dos analitos (MENGEL e KIRKBY, 2001).

Um método bastante moderno e eficiente para decomposição de diversos tipos de amostras, incluindo as matrizes foliares, consiste na digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados, conforme a ilustração da FIGURA 2.1.1. As micro-ondas são produzidas pelo magnetron, propagadas através do guia de ondas, e inseridas diretamente na cavidade do forno onde o espalhador as distribui em diferentes direções sendo, então, absorvidas pelas moléculas polares das amostras e solventes (KRUG e ROCHA, 2019).

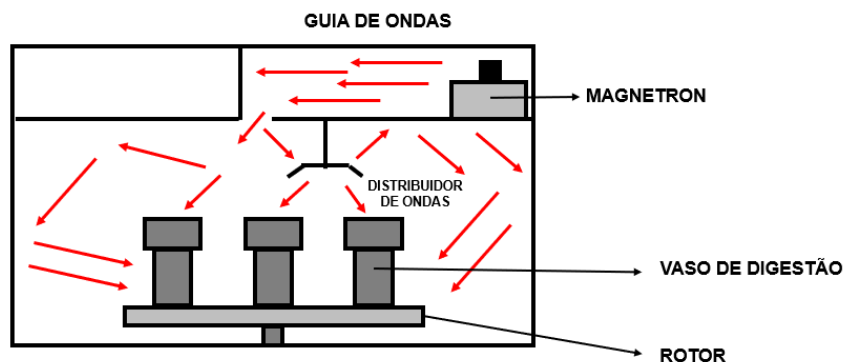


FIGURA 2.2.1. Esquema de um equipamento de digestão assistida por radiação micro-ondas.

As principais vantagens da decomposição via micro-ondas por meio de frascos fechados em relação aos sistemas abertos incluem: (i) maior eficiência na dissolução em altas temperaturas; (ii) diminuição dos riscos de perda dos analitos por volatilização; (iii) diminuição dos riscos de contaminações pelo ambiente de trabalho e (iv) menor consumo de reagentes de elevada pureza. Porém, a principal limitação do emprego de radiação micro-ondas é a pequena massa de amostra utilizada, uma vez que a pressão interna depende da pressão de vapor do ácido utilizado e da pressão resultante ocasionada pelos produtos gasosos gerados. Além disso, os insumos (frascos reacionais) dos fornos de micro-ondas são de custo elevado. (MEYERS, 2011). Por muitos anos, o Laboratório Exata Brasil tem empregado esse método em suas análises (EXATA BRASIL, 2022).

Com o desenvolvimento da Química Analítica, a análise direta de amostras sólidas tem se tornado atraente, pois, pode melhorar a eficiência analítica, pela eliminação das etapas de digestão, reduzindo os riscos de contaminação das amostras, minimizando o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e contribuindo com os princípios da Química Verde (COSTA et al., 2019).

## 2.3 LIBS

A análise direta de amostras por meio de lasers tem despertado o interesse do meio científico nos últimos anos devido, principalmente, aos conceitos de sustentabilidade e química verde, e aos grandes avanços tecnológicos da indústria de componentes ópticos e eletrônicos (COSTA et al., 2019).

A LIBS é uma técnica espectroscópica de emissão óptica que utiliza um pulso curto de radiação de alta energia, focalizado por meio de uma lente sobre a superfície da amostra. Desta forma, é vaporizada uma pequena quantidade de amostra e tem-se a geração de um plasma. Este, por sua vez, emite radiações que são coletadas por fibras ópticas e direcionadas ao espectrômetro, que é responsável pela separação da radiação emitida pelos diferentes constituintes do plasma. Por fim, um detector registra os sinais de emissão. Geralmente, esta técnica realiza as determinações dos analitos empregando pastilhas obtidas pela prensagem das amostras previamente moídas. De forma geral, cada pastilha possui cerca de 0,5 g do material e aproximadamente 15 mm de diâmetro. A instrumentação de um equipamento LIBS pode ser ilustrada resumidamente na FIGURA 2.3.1 (COSTA et al., 2019).

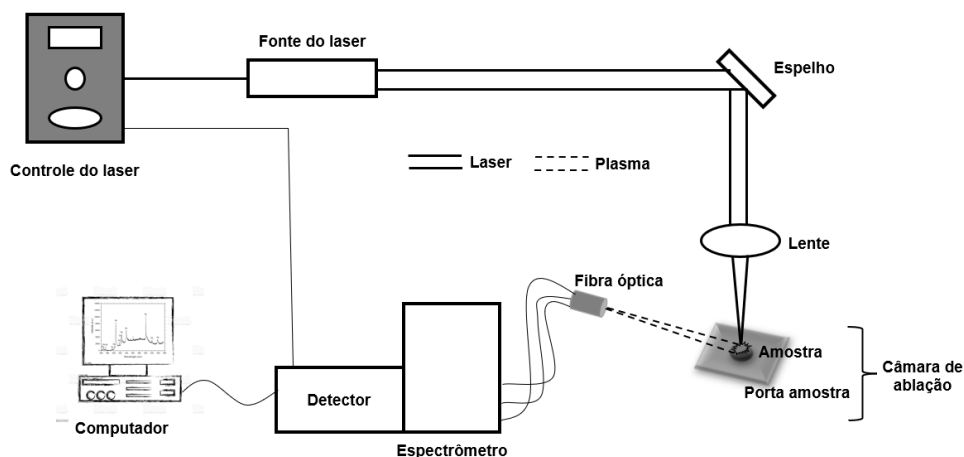


FIGURA 2.3.1. Configuração instrumental típica de um equipamento LIBS.

Por meio do espectro de emissão do plasma obtido, é possível realizar análises quali e quantitativas monitorando o comprimento de onda e a intensidade das linhas de emissão dos elementos presentes na amostra. O comprimento de onda identifica o elemento e, quando há uma calibração apropriada, a intensidade da linha (área ou altura) permite a quantificação (SINGH e THAKUR, 2020).

As características do plasma são dependentes da composição da amostra, condições da sua superfície, de suas propriedades térmicas e ópticas, além dos parâmetros do laser. Normalmente, a LIBS utiliza um laser pulsado entre 1 e 10 ns, com taxa de repetição entre 1 e 10 Hz e energia por pulso do laser entre 10 e 200 mJ (COSTA et al., 2019).

No que diz respeito as vantagens da LIBS em relação as outras técnicas analíticas, pode-se destacar principalmente: (i) a análise direta e rápida (com pouco ou nenhum preparo das amostras); (ii) o menor consumo da amostra (sendo considerada uma técnica quase não destrutiva) e (iii) a possibilidade de microanálise (GALBÁCS, 2022) (PEREIRA-FILHO, 2021)

Por estes motivos, nos últimos anos, a LIBS vem se destacando como técnica analítica e alternativa viável aos métodos clássicos de espectrometria atômica. Em uma consulta realizada no banco de dados SCOPUS (<https://www.scopus.com/>), o termo “*laser-induced breakdown spectroscopy*” foi encontrado em 8.047 artigos publicados entre 1972 e setembro de 2022. O número de publicações tem aumentado a cada ano como pode ser observado na FIGURA 2.3.2, destacando um crescimento significativo nas últimas duas décadas.

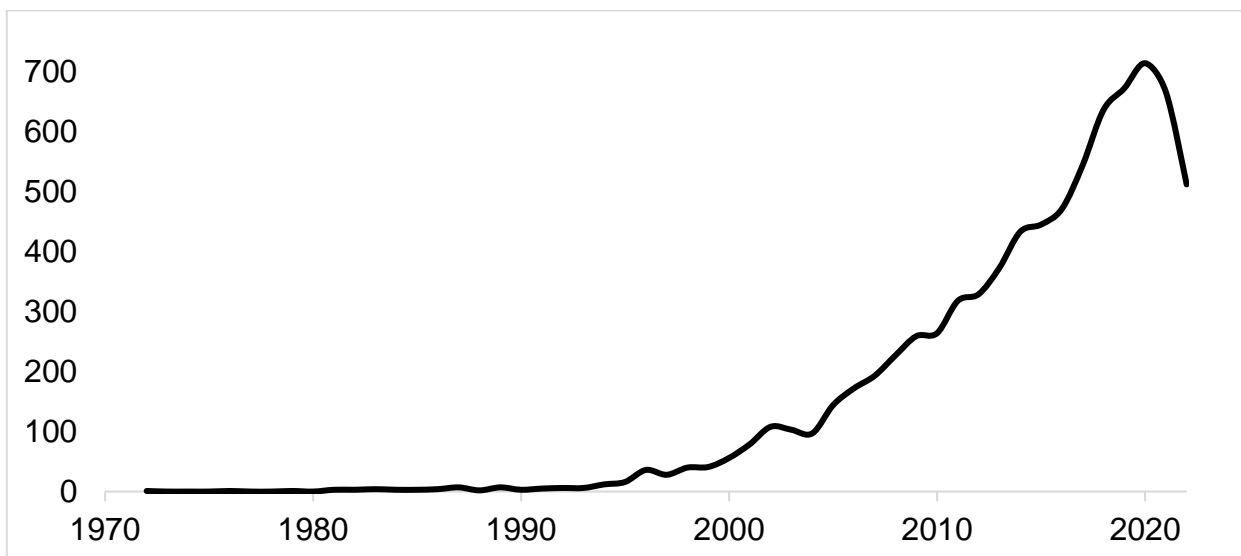


FIGURA 2.3.2. Número de publicações sobre espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser entre 1972 e 2022.

## 2.4 A Quimiometria aplicada à LIBS

A Quimiometria é uma ciência indispensável para a extração de informações relevantes de dados obtidos por experimentos químicos. Dentro desta ciência, há o planejamento fatorial, que é uma ferramenta versátil, que estuda a influência das variáveis por meio da execução de um número reduzido de experimentos. As principais vantagens do planejamento fatorial são eficiência, economia e abrangente quando comparado a experimentos efetuados de forma univariada, pois, além de economizar recursos financeiros e diminuir o trabalho laboratorial, é possível o estudo de duas ou mais variáveis simultaneamente com a identificação de interações entre elas (PEREIRA-FILHO, 2015).

Um exemplo que utiliza a LIBS juntamente com planejamento fatorial é o trabalho desenvolvido por ANDRADE et al. (2017), em que os autores determinaram elementos essenciais e tóxicos em 18 amostras de ervas medicinais por LIBS e ICP OES. Os parâmetros do instrumento (energia do pulso de laser, *delay time* e *spot size*) foram avaliados com o uso do planejamento do tipo Doehlert com uso da função de desejabilidade. Assim, os autores obtiveram uma condição

de compromisso para todos os tipos de amostras com um *delay time* de 1  $\mu$ s, energia do pulso de laser de 70 mJ e o *spot size* fixado em 100  $\mu$ m (ANDRADE et al., 2017).

Antes de realizar qualquer tipo de análise nos dados, é importante efetuar um pré-tratamento, pois esta etapa auxilia na redução da contribuição das variações indesejáveis que não foram eliminadas durante os experimentos e que poderão afetar futuras análises. Frequentemente, estas variações estão relacionadas com flutuações da linha de base, ruído experimental e desalinhamento de sinais. Com o pré-tratamento, a matriz de dados se tornará mais adequada para uma análise quimiométrica. Para tanto, é necessário organizar os dados em uma matriz cuja linha corresponde a uma amostra  $i$  e cada coluna se refere a uma variável  $j$ . Portanto, é construído uma matriz de dados ( $i \times j$ ), com um total de  $i$  linhas (amostras) e  $j$  colunas (variáveis). Didaticamente, o pré-tratamento de dados é dividido em dois grupos: transformação – conjunto de operações que são aplicados nas amostras (linhas); e o pré-processamento – conjunto de operações aplicadas nas variáveis (colunas) (FERREIRA, 2015).

Um tipo de tratamento é a normalização, em que os valores de cada variável de cada amostra são divididos por um fator de normalização. Dentre estes fatores, destaca-se: a normalização pela área total, pela norma Euclidiana e por padrão interno. A normalização pela área total minimiza o efeito da intensidade total de perfis de resposta, pela variabilidade da amostra e do caminho óptico. Nesta situação, o fator de normalização é a soma dos valores absolutos ( $\sum_{j=1}^n |x_{i,j}|$ ) de todas as variáveis para uma dada amostra (chamada de norma 1). A normalização pela norma é utilizada na remoção de variações sistemáticas relacionadas com o tamanho da amostra ou quando a concentração absoluta dos analitos nas amostras é incontrolável (chamada de norma 2). Neste caso, o fator de normalização pode ser a norma Euclidiana ( $\sqrt{\sum_{j=1}^j x_{ij}^2}$ ). Por fim, a padronização interna, procedimento também utilizado para minimizar a flutuação dos resultados analíticos, tem como fator de normalização geralmente, no caso de técnicas espectrométricas, a intensidade de alguma linha de emissão de um elemento cuja concentração é



constante em todas as amostras, devendo flutuar da mesma forma que o analito de interesse (CASTRO e PEREIRA-FILHO, 2016).

No que se refere ao pré-processamento, isto é, ao tratamento aplicado nas colunas, centrar os dados na média e o autoescalamento são os mais utilizados quando se realiza análises exploratórias dos dados e modelos de calibração. Ao centrar os dados na média ( $x_{ij(cm)}$ ), ocorre uma translação de eixos para o valor médio de cada um deles sem perder a estrutura dos dados. Desse modo, é calculado o valor médio de cada coluna ( $\bar{x}_j$ ) que é subtraído de cada um dos valores da respectiva coluna ( $x_{ij}$ ), como mostrado na Equação 1. Este tipo de pré-processamento é mais utilizado em dados espectrais (FERREIRA, 2015).

$$x_{ij(cm)} = x_{ij} - \bar{x}_j \quad (1)$$

Já o autoescalamento ( $x_{ij(a)}$ ), além de realizar o mesmo cálculo ao centrar os dados na média, divide-se esse resultado pelo desvio-padrão da coluna ( $s_j$ ). Assim, os dados são autoescalados pelo desvio-padrão, conforme a Equação 2, de tal forma que média e desvio-padrão dos dados autoescalados sejam de 0 e 1, respectivamente. Quando as variáveis são dados de concentração, por exemplo, ou quando elas possuem unidades diferentes, este pré-processamento é empregado para que se iguale o impacto de cada uma delas (FERREIRA, 2015).

$$x_{ij(a)} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j} \quad (2)$$

Por meio dos métodos quimiométricos, é possível o reconhecimento de semelhanças e diferenças entre vários tipos de amostra. Estes métodos são divididos em: métodos supervisionados – é preestabelecido uma classe, a qual é utilizada nos cálculos dos modelos de classificação, e, assim, é feita a análise de cada amostra; e métodos não supervisionados – não é necessário um conhecimento prévio sobre a classificação das amostras, logo elas serão agrupadas de acordo com os dados obtidos pelos experimentos. Dentre os métodos não

supervisionados, destaca-se a PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*). Este método visa reduzir o tamanho do conjunto de dados original, preservando a maior quantidade de informação possível. Essa redução é obtida por meio do estabelecimento de novas variáveis ortogonais entre si, denominadas componentes principais (PCs). Organizadas em ordem decrescente de importância, as PCs são combinações lineares das variáveis originais. Os gráficos obtidos representam as amostras em um sistema cartesiano onde os eixos são as PCs. Estes gráficos apresentam informações que expressam as inter-relações que podem existir entre as variáveis. Assim, viabiliza a interpretação multivariada do comportamento das amostras, facilitando a interpretação dos dados e, conseqüentemente, a identificação de grupos de amostras com características semelhantes (FERREIRA, 2015).

A principal hipótese desta dissertação de mestrado é que as variações das intensidades obtidas pela LIBS estejam relacionadas com alterações nas informações obtidas pelo método de referência (ICP OES). Esta relação pode ser estabelecida por meio de modelos de regressão (COSTA et al., 2019).

No cálculo de modelos é utilizado um conjunto de calibração que deve ser representativo, isto é, conter todas as fontes de variação que as amostras de previsão possam ter. Ademais, é necessário que as amostras de calibração estejam distribuídas uniformemente ao longo de todo o intervalo, apresentando assim uma boa previsão. Um dos métodos mais utilizados é o PLS (do inglês, *Partial Least Squares*), elaborado em uma única etapa, em que as informações das matrizes  $\mathbf{X}$  (variáveis independentes) e  $\mathbf{Y}$  (variáveis da propriedade de interesse) são consideradas durante a decomposição e a compressão dos dados. Para isto, é necessário escolher o número de fatores, geralmente realizado por meio da validação cruzada (*cross validation*), que é feita da seguinte forma: é excluída uma ou mais amostras  $i$  do conjunto de calibração, e depois o modelo é calculado sem essas amostras. O modelo obtido é utilizado para calcular a propriedade de interesse das amostras excluídas e em seguida é feita uma comparação entre os valores previstos com os reais, calculando-se os resíduos (Equação 3) (FERREIRA, 2015).

$$\text{Resíduo} = y_i - \hat{y}_i \quad (3)$$

Onde  $y_i$  é o valor real ou de referência,  $\hat{y}_i$  é o valor previsto e  $n$  é o número de amostras utilizadas na validação interna cruzada.

Estes resíduos são expressos pelo valor da soma dos quadrados dos erros de previsão efetuados pela validação cruzada (*Predicted Residual Error Sum of Squares*,  $\text{PRESS}_{\text{CV}}$ ) ou pelo erro padrão de validação cruzada (*Standard Error of Cross-validation*,  $\text{SECV}$ ) determinados pelas Equações 4 e 5, respectivamente. O número ótimo de fatores será aquele que produz um menor valor de  $\text{PRESS}_{\text{CV}}$  ou  $\text{SECV}$ . Além disso, o  $\text{SECV}$  pode ser utilizado para avaliar a capacidade do modelo de fazer previsão (FERREIRA, 2015).

$$\text{PRESS}_{\text{CV}} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (4)$$

$$\text{SECV} = \sqrt{\frac{\text{PRESS}_{\text{CV}}}{n}} \quad (5)$$

Para concluir a etapa de validação do modelo é necessário calcular os parâmetros de qualidade do modelo proposto como: sensibilidade, sensibilidade analítica, seletividade, limites de detecção e de quantificação e desvio padrão relativo. Com isso, o modelo está pronto para fazer previsões da propriedade de interesse em novas amostras (FERREIRA, 2015).

Na próxima seção, alguns trabalhos foram levantados a fim de mostrar a aplicação dos métodos quimiométricos juntamente a LIBS nas análises foliares.

## 2.5 Análise foliar via LIBS

A LIBS tem sido amplamente empregada para análise direta de plantas. Na literatura são propostos métodos para determinação direta e simultânea de P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn, Zn, B e Si em materiais vegetais na forma de pastilhas. A análise por meio de pastilhas promove uma redução das etapas da sequência analítica, simplificando o processo de análise quando comparado aos convencionais que necessitam da decomposição da amostra (KRUG e ROCHA, 2019).

SUN et al. (1999) estudaram a viabilidade da LIBS para a determinação de Ca, Mg, P, Fe, Cu, Mn, Zn e Al em materiais vegetais. As curvas de calibração foram preparadas a partir de materiais de referência certificados (MRC) e da mistura entre eles. As amostras de folhas foram fixadas em uma fita adesiva dupla face, posicionadas em lâmina de vidro, e pulsos de laser com energia de 100 mJ (Nd:YAG a 1064 nm, aproximadamente  $25 \text{ J cm}^{-2}$ ) foram aplicados na superfície para formação do plasma. A melhor razão sinal/ruído foi observada após 1  $\mu\text{s}$  de tempo de atraso, 10  $\mu\text{s}$  de integração e 20 pulsos do laser. Os coeficientes de variação (CV) das medidas variaram entre 8 e 15 %. Os resultados pela LIBS foram validados com um CRM (NIST 1575), entretanto foram fornecidas apenas informações para Al, Cu, Fe e P. Os limites de detecção (LD) foram 1 mg/kg Al, 25 mg/kg P, 200 mg/kg Ca, 2700 mg/kg Mg, 0,08 mg/kg Cu, 3 mg/kg Fe, 0,8 mg/kg Mn e 2 mg/kg Zn. De acordo com os autores, o método mostrou-se rápido e viável para a determinação dos elementos em materiais vegetais, agrícolas e outros com matriz similar (SUN et al., 1999).

O trabalho desenvolvido por TREVIZAN et al. (2008) determinou macronutrientes (P, K, Ca e Mg) em diversos materiais foliares e MRC por LIBS. As amostras foram moídas em moinho criogênico e analisadas aplicando-se 8 pulsos (Nd:YAG, 1064 nm, 5 ns) consecutivos de laser com energia de 200 mJ ( $\sim 25 \text{ J cm}^{-2}$ ). Os MRC foram usados para a construção das curvas de calibração e os resultados obtidos por LIBS foram comparados com aqueles obtidos por ICP

OES após decomposição ácida em forno de micro-ondas. Os LD foram adequados para fins de diagnose foliar (TREVIZAN et al., 2008).

BRAGA et al. (2010) avaliaram o uso da LIBS como alternativa ao tradicional método analítico baseado na digestão úmida ácida de amostras de folhas, de 20 plantas diferentes, para determinação de B, Cu, Fe, Mn e Zn. Os resultados foram precisos e exatos tanto para calibrações univariadas quanto multivariadas. Porém, os autores obtiverem um número significativo menor de valores anômalos para Cu e Zn ao usar uma calibração multivariada ao invés do método univariado (BRAGA et al., 2010).

NUNES et al. (2010) determinaram macronutrientes (P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) em folhas de cana-de-açúcar por meio da LIBS aplicando calibração univariada e multivariada (PLS). Ambas as estratégias de calibração produziram resultados semelhantes, exceto para Fe onde melhores resultados foram alcançados pela abordagem multivariada. A precisão de repetibilidade variou de 0,7 a 15% e 1,3 a 20% nas medidas obtidas por calibração multivariada e univariada, respectivamente (NUNES et al., 2010).

Em um estudo publicado em 2017, os autores compararam as análises por meio da LIBS e do ICP OES de amostras de ervas medicinais ricas em flavonoides provenientes da Europa Oriental. Os autores determinaram Ca, K, Mg, Na, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn, Cd, Cr e Pb. Os dados obtidos mostraram uma forte correlação dos resultados da LIBS com aqueles obtidos pelo ICP OES para Ca, K e Mg através de uma calibração univariada. Os LD obtidos foram de 0,1, 0,4 e 0,07 % (m/m) para Ca, K e Mg, respectivamente (ANDRADE et al., 2017).

Mediante a revisão bibliográfica, nota-se a possibilidade de propor modelos que determinem os analitos via LIBS que, atualmente, são rotineiramente determinados por ICP OES nos laboratórios da Exata Brasil.

### 3. Objetivo e justificativa

Atualmente, um dos serviços mais requisitados nos laboratórios da Exata Brasil é a análise foliar. Por ano, são analisadas cerca de 20 mil amostras de folha, sendo 55% de soja, 25% de milho e 20% de outras culturas. A análise foliar pelo método bastante consolidado em rotinas (digestão ácida por micro-ondas e determinações por ICP OES) tem custo médio de R\$ 71,00, com margem em torno de 25%, sendo que 55% são custos fixos (funcionários, manutenção, tributos, entre outros) e 45% variáveis (gases, consumíveis, reagentes, entre outros). O tempo de entrega de um resultado varia de 5 a 15 dias, podendo em épocas de alta demanda, meses de novembro a maio, exigir até 30 dias para entrega. Em uma análise foliar típica são determinados 11 analitos (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn).

Nesta conjuntura, o desenvolvimento de um método que reduza o tempo de entrega do resultado, bem como as despesas relacionadas com reagentes e equipamentos é de extremo interesse da empresa. É neste contexto que essa dissertação de mestrado profissional se enquadra.

O objetivo dessa dissertação foi propor um método de análise direta para amostras de folhas de milho e soja por meio da técnica LIBS. Para tanto, buscou-se desenvolver modelos de calibração para as amostras avaliadas, visando a determinação dos analitos.

## 4. Materiais e métodos

### 4.1 Amostras

Neste trabalho, ao todo, foram utilizadas 2.978 amostras de folhas, sendo 923 de soja, 1.780 de soja com pecíolo e 275 de milho. Todas as amostras selecionadas foram recebidas de diversos clientes do Grupo Exata Brasil espalhados pelo território nacional. A seleção das amostras foi baseada no recebimento a partir do 2º semestre de 2021 até outubro de 2022.

A TABELA 4.1.1 mostra a faixa de concentração, bem como suas respectivas médias e desvios padrões, dos analitos das amostras selecionadas. É válido ressaltar que estas amostras foram digeridas via micro-ondas e os analitos foram determinados por ICP OES. Tais resultados serviram como referência para a proposição de modelos de calibração.

No processo de mineralização para determinação dos analitos via ICP OES, foi utilizado 65% v/v HNO<sub>3</sub> (Synth, Brasil) para o preparo da solução ácida diluída e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v/v (Synth, Brasil) para auxiliar no processo de digestão. Além disso, a solução multielementar para a curva de calibração foi preparada a partir de soluções estoque de padrões monoelementares de 1.000 mg/L (NSI Lab Solutions, Estados Unidos da América).

TABELA 4.1.1. Faixas de concentração dos analitos de interesse nas amostras selecionadas para este trabalho.

Analito		Soja (n = 923)	Soja com pecíolo (n = 1.780)	Milho (n = 275)
<b>N*</b>	Mínimo	27,0	23,0	10,9
	Máximo	70,5	71,1	42,7
	Média	54,0	48,0	27,2
	$\sigma$	8,2	6,8	6,7
<b>P*</b>	Mínimo	1,8	1,3	1,6
	Máximo	7,8	6,1	5,6
	Média	3,7	3,6	3,2
	$\sigma$	0,8	0,6	0,7
<b>Ca*</b>	Mínimo	5,8	4,6	2,1
	Máximo	26,6	24,5	6,8
	Média	10,6	10,2	4,6
	$\sigma$	3,1	2,4	0,9
<b>Mg*</b>	Mínimo	1,7	1,6	0,9
	Máximo	9,9	8,2	5,3
	Média	4,3	4,3	2,6
	$\sigma$	1,2	0,8	0,8
<b>S*</b>	Mínimo	1,2	1,5	0,7
	Máximo	6,8	4,3	3,0
	Média	2,9	2,7	2,2
	$\sigma$	0,5	0,4	0,5
<b>B**</b>	Mínimo	20,2	13,1	1,9
	Máximo	138,6	281,4	40,3
	Média	48,1	58,6	14,7
	$\sigma$	12,7	17,9	8,6
<b>Cu**</b>	Mínimo	1,0	0,8	1,5
	Máximo	110,7	415,6	29,8
	Média	8,6	10,8	10,4
	$\sigma$	6,2	25,6	5,0
<b>Fe**</b>	Mínimo	50,2	48,5	46,2
	Máximo	4668,4	780,9	612,0
	Média	137,5	109,6	164,4
	$\sigma$	187,0	51,3	61,0
<b>Mn**</b>	Mínimo	8,5	15,7	6,5
	Máximo	477,4	1093,6	84,3
	Média	70,9	65,2	31,8
	$\sigma$	47,6	64,3	13,3
<b>Zn**</b>	Mínimo	12,6	6,2	7,1
	Máximo	135,7	175,6	59,4
	Média	44,4	44,4	18,9
	$\sigma$	17,5	14,8	5,9

Legenda: n = número de amostras;  $\sigma$  = desvio padrão; \*concentrações expressas em g/kg; \*\*concentrações expressas em ppm (mg/kg);



## 4.2 Instrumentação

Todas as amostras de folhas foram secas e moídas. Nas etapas de secagem e moagem foram empregadas a estufa modelo TE-394/5 (Tecnal, Brasil) – FIGURA 4.2.1 – em temperatura de 65 °C e circulação forçada de ar, e o moinho tipo Willey modelo TE-650/1 (Tecnal, Brasil) – FIGURA 4.2.2, respectivamente.



FIGURA 4.2.1. Visão geral da estufa TE-394/5 da Tecnal.



FIGURA 4.2.2. Visão geral do moinho tipo Willey TE-650/1 da Tecnal.

Para determinação dos analitos pelo método de referência (abertura ácida em sistema fechado), com exceção do nitrogênio, foi utilizado o forno de micro-ondas com cavidade modelo MARS 5 (CEM, Estados Unidos da América) – FIGURA 4.2.3 –, e o ICP OES modelo Optima 8300 (PerkinElmer, Estados Unidos da América) acoplado com auto mostrador modelo SC-14 (ESI, Estados Unidos da América) – FIGURA 4.2.4.



FIGURA 4.2.3. Visão geral do micro-ondas MARS 5 da CEM.



FIGURA 4.2.4. Visão geral do ICP OES Optima 8300 da PerkinElmer acoplado ao auto amostrador SC-14 da ESI.

As determinações das concentrações dos elementos foram feitas por interpolação gráfica após a construção de curvas de calibração com soluções contendo 0,05, 0,2, 0,5, 1 e 5 mg/L para B, Cu, Fe, Mn e Zn; 5, 10, 20, 50 e 100 mg/L para Mg, S e P, e 10, 50, 100, 250 e 500 mg/L para Ca e K.

Para a análise direta das amostras foliares foi utilizada a técnica LIBS, cujo equipamento comercial é o modelo J200 da Applied Spectra (Fremont, EUA) – FIGURA 4.2.5 –, o qual possui um laser de Nd:YAG que emite um pulso de laser em 1064 nm. O detector é um dispositivo de carga acoplada (*Charge Coupled Device*, CCD) e a duração do pulso é em torno de 10 ns. O espectrômetro tem 6 canais, com uma resolução de 0,08 – 0,1 nm do canal 1 (186,940 a 311,195 nm) ao 4 (591,426 a 693,690 nm) e resolução de 0,11 – 0,14 nm nos canais 5 (693,807 a 884,407 nm) e 6 (884,509 a 1042,026 nm). Em relação as variáveis instrumentais do equipamento, tem-se que a energia máxima do pulso de laser é de 100 mJ, o tempo de aquisição dos sinais é fixo em 1,05 ms, o delay time pode ser variado de 0 a 2  $\mu$ s e o spot size de 50 a 250  $\mu$ m.



FIGURA 4.2.5. Visão geral do equipamento LIBS J200 da Applied Spectra.

As condições operacionais utilizadas no LIBS estão apresentadas na TABELA 4.2.1. Vale ressaltar que foram iguais ao do trabalho desenvolvido por ANDRADE et al. (2017), apresentado na seção 2.5 desta dissertação.

TABELA 4.2.1. Condições de operação do LIBS.

Parâmetro	Valor
<i>Delay time</i>	1 $\mu$ s
Energia do pulso de laser	70 mJ
<i>Spot size</i>	100 $\mu$ m
<b>Tempo de aquisição do sinal</b>	1,05 ms

Os parâmetros utilizados no ICP OES para determinação dos analitos estão representados na TABELA 4.2.2.

TABELA 4.2.2. Condições de operação do ICP OES.

Parâmetro	Valor
Comprimento de onda (nm)	B: 249,77 Ca: 317,95 Cu: 327,39 Fe: 238,21 K: 766,54 Mg: 285,22 Mn: 257,61 P: 213,62 S: 181,97 Y: 371,03 Zn: 206,19
Número de réplicas de leitura	3
Padrão Interno	Y
Potência de radiofrequência	1450 W
Vazão de introdução de amostra	0,50 mL/min
Vazão do argônio	12 L/min
Vazão do gás auxiliar	0,2 L/min
Vazão do gás do nebulizador	0,60 L/min
Vista do Plasma	Axial: B, Cu, Fe, Mn, P, S, Zn e Y Radial: Ca, K, Mg e Y

Para as análises via LIBS, foi necessário confeccionar pastilhas das amostras. Para este procedimento, foi utilizado a prensa hidráulica modelo SL-10 (Solab, Brasil) – FIGURA 4.2.6.



FIGURA 4.2.6. Visão geral da prensa hidráulica SL-10 da Solab.

## 4.3 Preparo de amostras

### 4.3.1 Determinação do nitrogênio

Para a determinação de nitrogênio, foi utilizado o método Kjeldahl. Pesou-se 0,2 g da amostra moída em tubos de digestão. Em seguida, foram adicionados aproximadamente 1,6 g de uma mistura catalítica (10:1 de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Depois, foram adicionados 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. As amostras foram levadas ao bloco digestor e digeridas a  $400^\circ\text{C}$  até completa solubilização. Após a digestão, foram adicionados 20 mL de solução de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4% e, em seguida, as amostras foram destiladas com NaOH 40%. Por fim, as amostras destiladas foram tituladas com solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 mol/L.

### 4.3.2 ICP OES

Para determinações via ICP OES, as amostras foram mineralizadas de acordo com o seguinte procedimento: as amostras ficaram em estufa por 24 h a 60 °C. Depois da secagem, foram moídas em moinho tipo Willey. Após estas etapas, pesou-se uma alíquota de 250 mg de cada amostra seca e moída em tubos de TFM<sup>®</sup> (politetrafluoretileno modificado). Adicionaram-se 4 mL de solução 4 mol/L de HNO<sub>3</sub> e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v). As amostras foram condicionadas no rotor apropriado para o micro-ondas e, em seguida, aplicou-se o programa de digestão cuja descrição encontra-se na TABELA 4.3.2.1. Após a digestão, transferiu-se as amostras para frascos tipo Falcon, avolumando para 25 mL com água deionizada. Com isso, os analitos foram determinados via ICP OES.

TABELA 4.3.2.1. Programa de aquecimento para digestão das amostras.

Etapa	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Potência (W)
Rampa de aquecimento	20	200	1800
Patamar	15	200	1800
Resfriamento	10	-	-

### 4.3.3 LIBS

Para as análises via LIBS, foi necessário confeccionar pastilhas de acordo com o seguinte procedimento: as amostras que já se encontravam secas e moídas foram selecionadas de acordo com as concentrações determinadas pela técnica de referência. Amostras com baixa, média e alta concentração dos analitos foram selecionadas. Após a seleção, transferiu-se aproximadamente 0,5 g de cada material moído para o conjunto de prensagem, aplicando, em seguida, 12 ton cm<sup>-2</sup> durante 3 minutos. A FIGURA 4.3.3.1 mostra um diagrama das principais etapas envolvidas até a obtenção das pastilhas

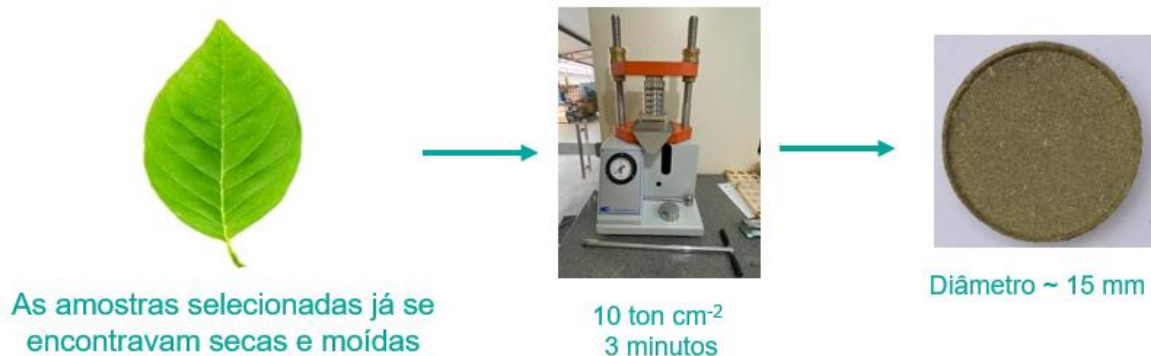


FIGURA 4.3.3.1. Ilustração das etapas envolvidas na obtenção das pastilhas de materiais vegetais para análise via LIBS.

#### 4.4 Modelos de calibração univariada e multivariada

De posse das concentrações determinadas pela técnica de referência, utilizou-se o software Pirouette® (versão 4.5, Infometrix, Estados Unidos da América) para análise de componentes principais (PCA) com objetivo de avaliar os padrões entre as culturas (soja, soja com pecíolo e milho) para, assim, propor os modelos de calibração.

Após a PCA, para cada amostra foram registrados aproximadamente 300 espectros pela varredura com o laser via LIBS. Com os resultados, 12 diferentes modos de normalização foram testados (CASTRO e PEREIRA-FILHO, 2016) com o objetivo de minimizar as variações do sinal e as diferenças da matriz da amostra por meio do software Matlab 2019® (Matworks, Estados Unidos da América):

- 1) Média dos 300 espectros;
- 2) A norma individual (comprimento do vetor) é calculada para cada espectro e os dados são divididos por esse valor. A norma do espectro normalizado é igual a 1. Em seguida é calculada a média dos espectros normalizados (300 espectros normalizados);



- 3) A área individual (soma de todos os sinais) é calculada para cada espectro e os dados são divididos por esse valor. A área do espectro normalizado é 1. Em seguida é calculada a média dos espectros normalizados (300 espectros normalizados);
- 4) O máximo individual (sinal mais alto) é calculado para cada espectro e os dados são divididos por esse valor. A intensidade de sinal para a linha de emissão mais alta é 1. Em seguida é calculada a média dos espectros normalizados (300 espectros normalizados);
- 5) O espectro individual é dividido pela intensidade de sinal do carbono I 193,091 nm. Em seguida é calculada a média dos espectros normalizados (300 espectros normalizados). A intensidade do sinal resultante para o C I 193,091 nm é 1;
- 6) O espectro individual é dividido pela intensidade de sinal do carbono I 247,856 nm. Em seguida é calculada a média dos espectros normalizados (300 espectros normalizados). A intensidade do sinal resultante para o C I 247,856 nm é 1;
- 7) Soma dos 300 espectros;
- 8) A norma individual (comprimento do vetor) é calculada para cada espectro e os dados são divididos por esse valor. Em seguida é calculada a soma dos espectros normalizados (300 espectros normalizados);
- 9) A área individual (soma de todos os sinais) é calculada para cada espectro e os dados são divididos por esse valor. Em seguida é calculada a soma dos espectros normalizados (300 espectros normalizados);
- 10) O máximo individual (sinal mais alto) é calculado para cada espectro e os dados são divididos por esse valor. Em seguida é calculada a soma dos espectros normalizados (300 espectros normalizados);
- 11) O espectro individual é dividido pela intensidade de sinal do carbono I 193,091 nm. Em seguida é calculada a soma dos espectros normalizados (300 espectros normalizados);
- 12) O espectro individual é dividido pela intensidade de sinal do carbono I 247,856 nm. Em seguida é calculada a soma dos espectros normalizados (300 espectros normalizados).

O Anexo 1 mostra a rotina computacional `libs_treat` que pode ser utilizada para o cálculo das 12 normalizações.

Após as normalizações, calculou-se modelos univariados preliminares para avaliar a melhor normalização para cada elemento em cada cultura. Para isso, foram utilizadas as principais linhas de cada analito (P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn), considerando sua área ou altura para cada linha. Este processo foi realizado utilizando o software Excel (Microsoft, Estados Unidos da América) para organização das matrizes e cálculos preliminares dos modelos univariados e a base de dados da NIST (do inglês, *National Institute of Standards and Technology*) para seleção das principais linhas de emissão de cada elemento. O objetivo foi selecionar as normalizações e linhas que apresentaram menores valores de SEC.

Após a avaliação das melhores normalizações e linhas, utilizando o software Pirouette®, foram calculados modelos de PLS para cada analito. Com o objetivo de avaliar os modelos de calibração gerados, para as culturas de milho e soja, cerca de 80% das amostras foram utilizadas para calibração e 20%, para validação. Para as amostras soja com pecíolo, 80% foram utilizadas para calibração, 10%, para validação e 10%, para previsão.

Assim, foram calculados modelos PLS com validação cruzada. Os parâmetros observados foram: quantidade de variáveis latentes, SEC, SECV, erro padrão de validação (Standard Error of validation, SEV), erro padrão de previsão (Standard Error of prevision, SEP), erro controle (EC) e porcentagem das amostras cujas concentrações estavam acima do erro controle ( $\% > EC$ ). O EC é uma estimativa do Limite de Quantificação (LQ). Considerando que o LD do modelo seja próximo do SEC, pode-se estimar o EC pela equação 6. Já  $\% > EC$  foi calculada pela equação 7.

$$EC = 3,3 \times SEC \quad (6)$$

$$\% > EC = \frac{\text{amostras com concentração maiores que o EC}}{\text{total de amostras}} \times 100 \quad (7)$$

Habitualmente, nos ensaios químicos a precisão é o componente majoritário da incerteza global e necessita ser avaliada em todo o âmbito de

aplicação do método. A incerteza associada à precisão pode ser quantificada, com base na dispersão dos resultados, em condições de precisão intermediária (ABNT/INMETRO, 2008). A incerteza padrão de uma série de medidas, assim como é o caso da precisão, é estimada pela equação 8:

$$u_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (8)$$

Em que:  $u_{\bar{x}}$  é a incerteza associada à medida em questão (nesse caso, a precisão do método);  $\sigma$  é o desvio padrão das medidas; e  $n$  é o número de réplicas realizadas.

O método utilizado para determinação de macro e micronutrientes em plantas pelo Grupo Exata Brasil está validado segundo as normas da ISO 17025. Com o objetivo de comparar as precisões dos métodos propostos (ICP OES e LIBS), um conjunto de 50 amostras de soja com pecíolo foram analisadas em duplicata e o desvio padrão relativo – DPR (%) – foi calculado, conforme a equação 9.

$$\text{DPR (\%)} = \frac{\bar{x}}{\sigma} \times 100 \quad (9)$$

Em que:  $\bar{x}$  é a média dos resultados de uma mesma amostra;  $\sigma$  é o desvio padrão das medidas.

## 5. Resultado e discussão

### 5.1 Caracterização das culturas

Uma vez determinadas as concentrações dos analitos (B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, S e Zn) nas amostras de soja, soja com pecíolo e milho, e com a utilização do Excel, foram criadas três matrizes (amostras x concentrações) para cada cultura. As matrizes obtidas foram:

- Matriz soja (923 amostras x 11 analitos determinados);
- Matriz soja com pecíolo (1780 amostras x 11 analitos determinados);
- Matriz milho (275 amostras x 11 analitos determinados);

A partir disto, foram selecionadas aproximadamente um terço das amostras para análise das culturas e preparo das pastilhas. As matrizes originais foram organizadas em ordem crescente de concentração dos analitos e foram selecionadas amostras de baixa, média e alta concentração dos analitos.

Com isso, foi possível realizar uma análise não supervisionada na tentativa de encontrar padrões entre elas e avaliar como estas amostras deveriam ser agrupadas na preposição dos modelos via LIBS.

Para tanto, entre as ferramentas de análises não supervisionada, a PCA foi utilizada. A FIGURA 5.1.1 ilustra os *scores* obtidos, levando em consideração dois componentes principais (PC1 e PC2) que juntos possuem uma variância explicada de 38,9%. É notável perceber que a cultura de milho, representada pelo triângulo verde na imagem, apresenta comportamento diferente quando comparado as amostras de soja e soja com pecíolo.

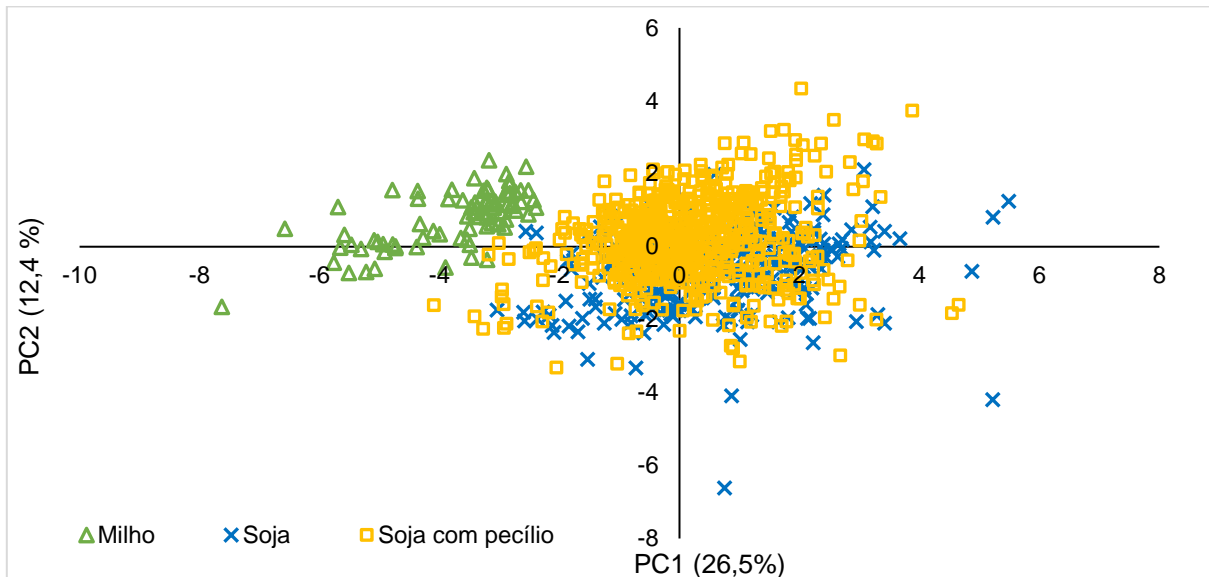


FIGURA 5.1.1. Scores da PC1 E PC2, obtidos pela PCA com as concentrações dos analitos determinadas por ICP OES nas culturas de milho, soja e soja com pecíolo.

As FIGURAS 5.1.2 e 5.1.3 representam os *loadings* obtidos para cada variável nas PCs 1 e 2, respectivamente. Nota-se que as concentrações que mais influenciaram positivamente a PC1 foram N, P, Ca, Mg, S, B e Zn, enquanto na PC2, foram N e S.

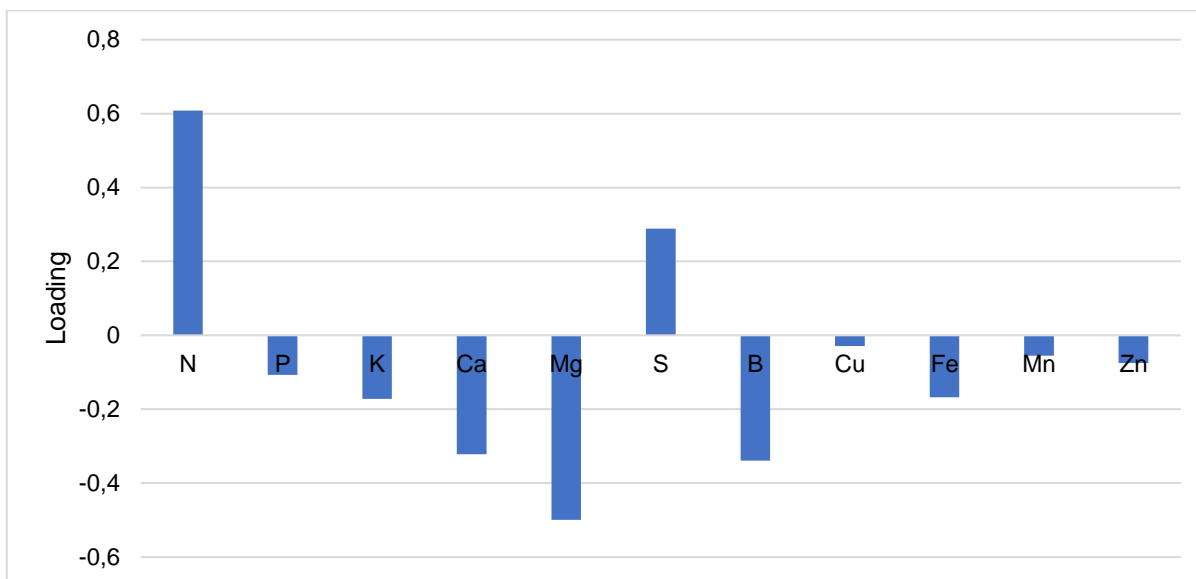


FIGURA 5.1.2. *Loadings* obtidos para cada variável referente à PC1 da PCA das culturas de soja, soja com pecíolo e milho.

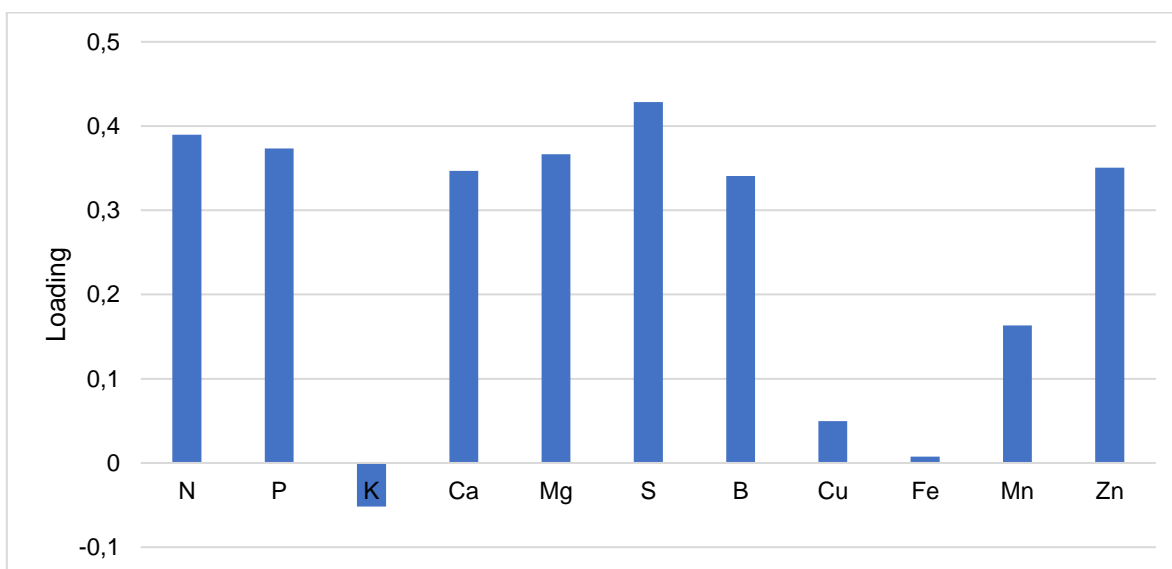


FIGURA 5.1.3. *Loadings* obtidos para cada variável referente ao PC2 da PCA das culturas de soja, soja com pecíolo e milho.

Com a PCA, nota-se que as amostras de soja (com ou sem pecíolo) possuem, na sua maioria, valores positivos de scores na PC1 (FIGURA 5.1.1). Com o gráfico de loadings da PC1 (FIGURA 5.1.2), tem-se que os elementos com valores positivos de loadings apresentam as maiores concentrações nas amostras de soja.

Tais conclusões corroboram com os dados da TABELA 4.1.1, em que, por exemplo, as concentrações de N na soja são praticamente duas vezes maiores que aquelas do milho. Por estes motivos, descartou-se a possibilidade de desenvolver modelos com as três culturas juntas.

No que se refere as culturas de soja e soja com pecíolo, foi observado que, apesar de estarem próximas na projeção das duas componentes principais, há um padrão de distribuição distinto entre elas, levando a hipótese de que não poderiam ser agrupadas quando fossem propostos os modelos. Para avaliar esta hipótese, uma outra PCA somente com os dados da soja e soja com pecíolo foi realizada.

A FIGURA 5.1.4 representa a projeção da PCA com dois componentes principais com variância explicada de 34,1%. As FIGURAS 5.1.5 e 5.1.6 representam os *loadings* obtidos para cada variável nos PCs 1 e 2, respectivamente. Nota-se certa semelhança entre os *loadings* obtidos com a PCA de todas as culturas. Porém, é observado que a concentração de K tem relação positiva para PC1 com soja e soja pecíolo, o que não foi visto considerando todas as culturas.

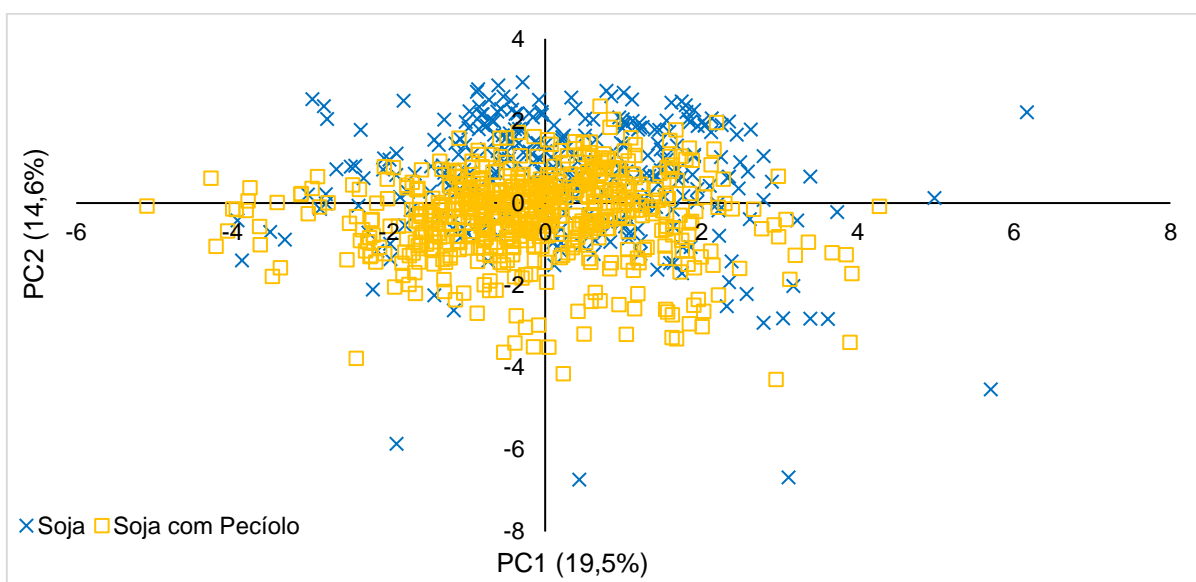


FIGURA 5.1.4. Scores obtidos para dois componentes principais, obtidos pela PCA com as concentrações dos analitos determinadas por ICP OES nas culturas de soja e soja com pecíolo.

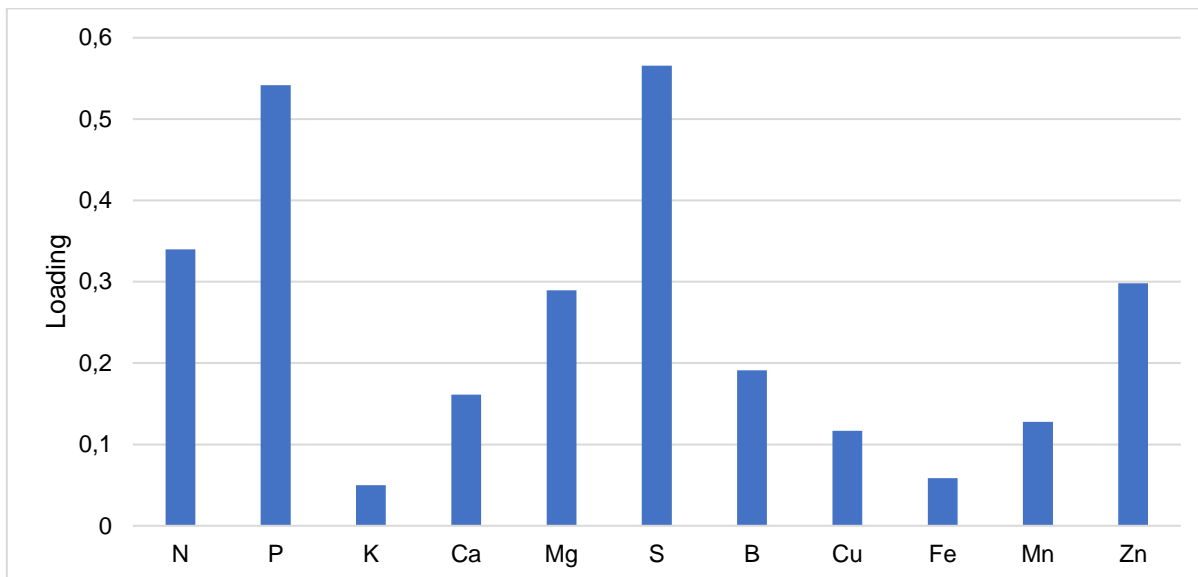


FIGURA 5.1.5. *Loadings* obtidos para cada variável referente à PC1 da PCA das culturas de soja e soja com pecíolo.

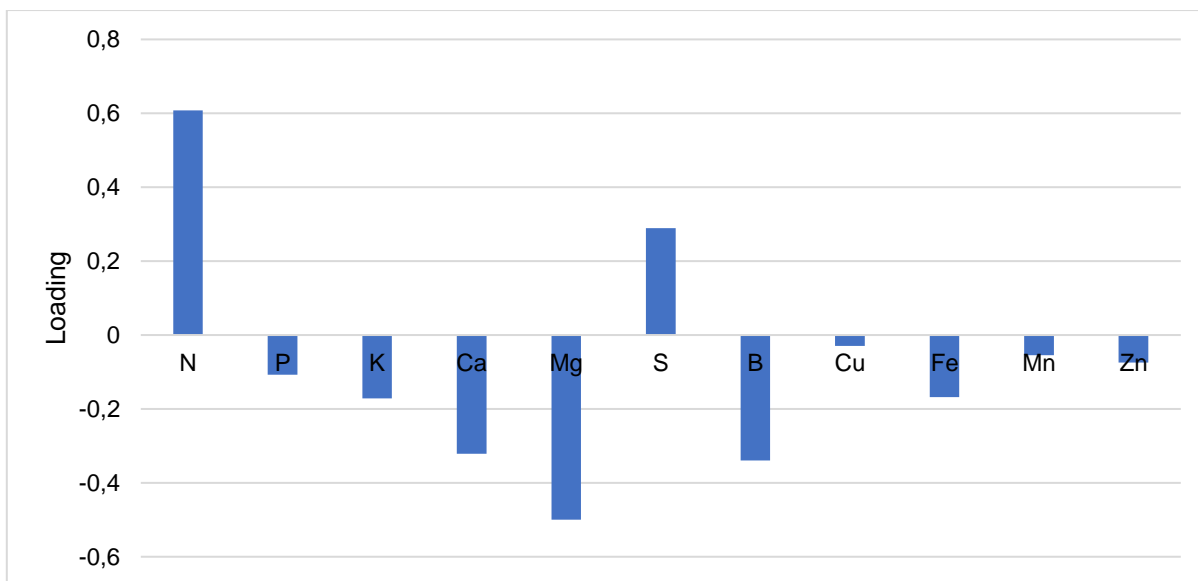


FIGURA 5.1.6. *Loadings* obtidos para cada variável referente à PC2 da PCA das culturas de soja e soja com pecíolo.

Pela análise deste conjunto de dados da PCA, observa-se que a cultura de soja sem pecíolo apresenta mais valores positivos para PC2 com relação a soja com pecíolo. Pelo *loading* da PC2 (FIGURA 5.1.6.), nota-se que os elementos N e S contribuem positivamente para esta PC. Isto leva a hipótese de haver maiores



teores de N e S na lâmina foliar do que no pecíolo. Tal observação pode ser comprovada analisando as concentrações obtidas via ICP OES relatadas na TABELA 4.1.1., em que as amostras de soja sem pecíolo apresentam maiores concentrações destes elementos em relação a soja com pecíolo. Assim, ao analisar este conjunto de dados, optou-se por construir modelos de calibração separados para estas culturas também.

Após a etapa de prensagem, as amostras foram analisadas pelo laser no LIBS, obtendo cerca de 300 espectros por amostra com 12.288 variáveis (faixa de comprimento de onda do equipamento – 186 nm a 1042 nm). Os espectros médios obtidos para a cultura de milho, soja e soja com pecíolo estão representados nas FIGURAS 5.1.7, 5.1.8 e 5.1.9, respectivamente. Nota-se que os espectros são bem semelhantes entre si, contendo as principais linhas, diferenciando apenas na intensidade, o que pode ser justificado pela variação das concentrações entre os analitos.

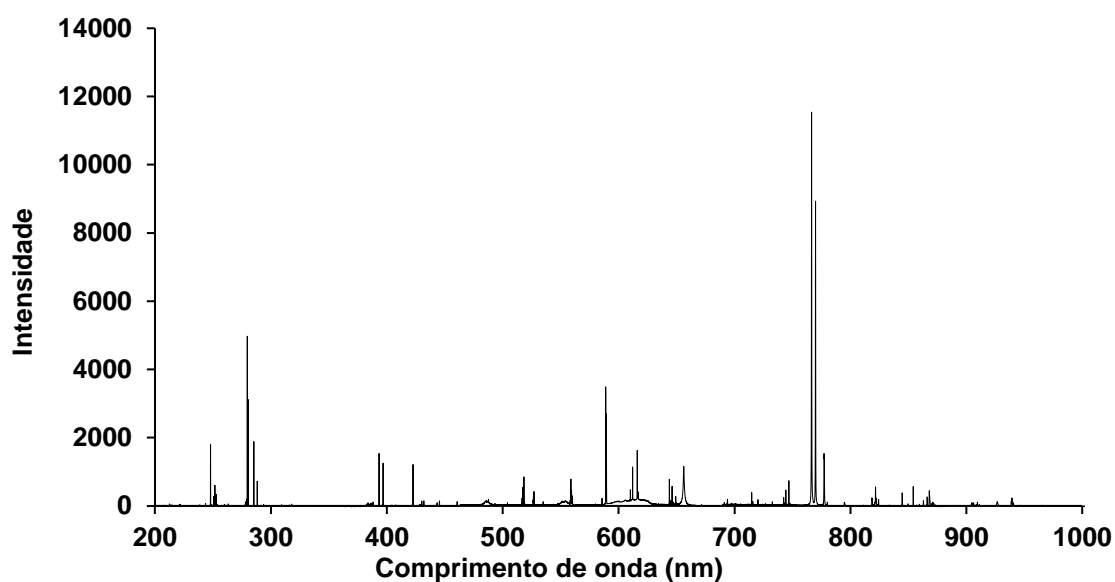


FIGURA 5.1.7. Espectro médio de emissão obtido via LIBS para cultura de milho.

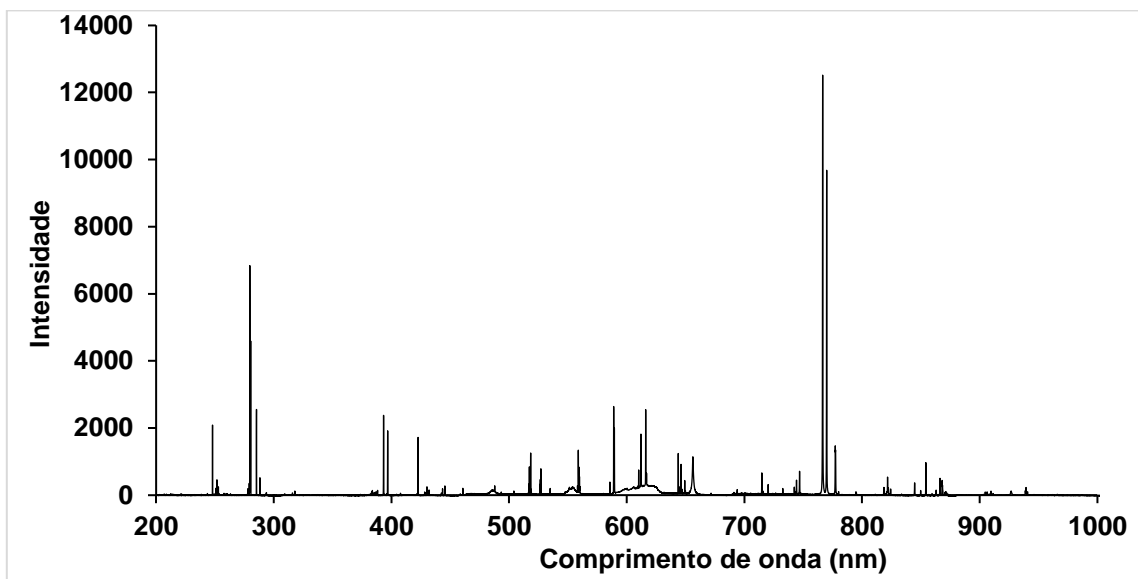


FIGURA 5.1.8. Espectro médio de emissão obtido via LIBS para cultura de soja.

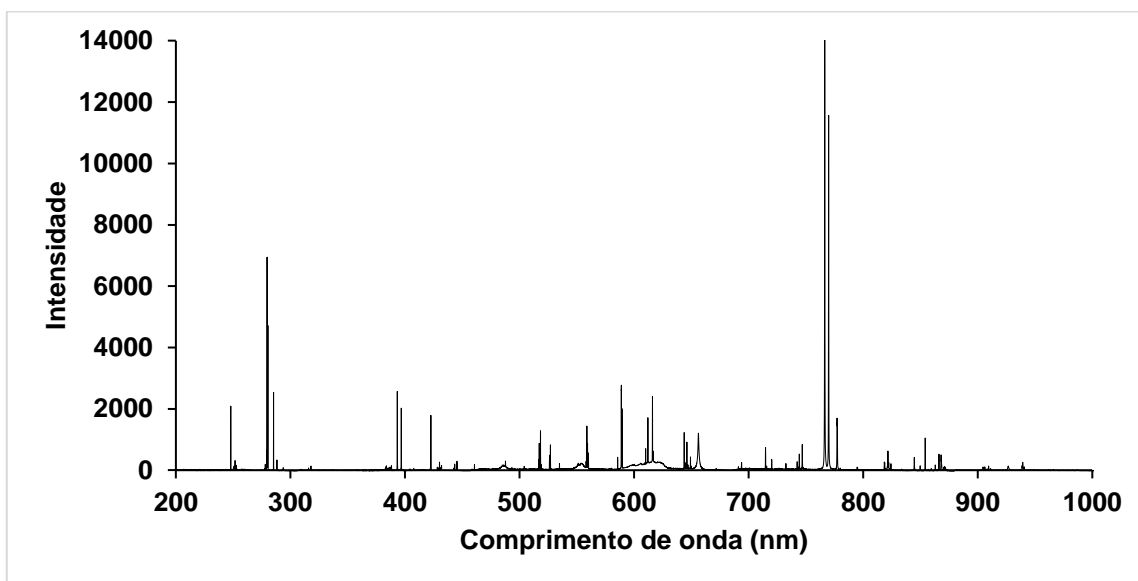


FIGURA 5.1.9. Espectro médio de emissão obtido via LIBS para cultura de soja com pecíolo.

Para uma análise qualitativa, selecionou-se o espectro médio obtido para cultura de soja com pecíolo e as linhas mais intensas foram identificadas de acordo com os dados da NIST. A FIGURA 5.1.10 representa o espectro de emissão

com as principais linhas identificadas. Vale destacar que a notação “I” e “II” nos analitos refere-se as linhas de emissão atômica e iônica, respectivamente.

Observa-se que o espectro médio obtido confirma o esperado, isto é, as linhas dos macronutrientes apresentaram maior intensidade e destaque no espectro, haja vista que suas concentrações são maiores quando comparadas com as dos micronutrientes.

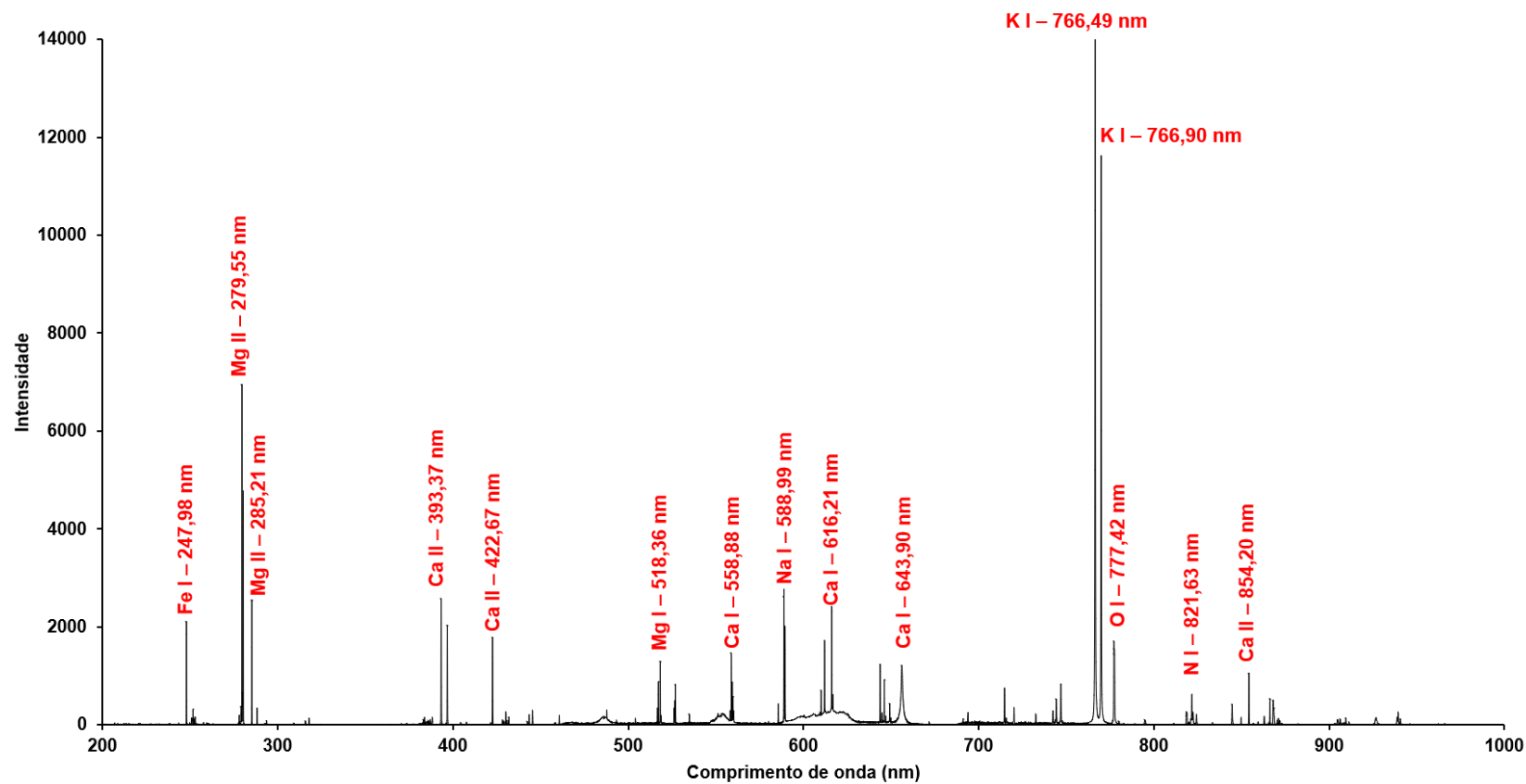


FIGURA 5.1.10. Espectro médio de emissão da soja com pecíolo e a identificação das principais linhas de emissão.

## 5.2 Modelos de calibração uni e multivariados

Após a obtenção dos espectros, 12 normalizações foram testadas. A avaliação da melhor normalização para cada analito para cada cultura foi baseada no menor SEC para modelos univariados preliminares. Após a seleção da melhor normalização, foram construídos modelos de calibração multivariada por meio da PLS. As TABELAS 5.2.1, 5.2.2 e 5.2.3 representam todos os dados obtidos tanto no modelo univariado quanto multivariado para as culturas de milho, soja e soja com pecíolo, respectivamente.

Por meio da avaliação dos dados, nota-se que nenhum analito para nenhuma cultura apresentou bons resultados numa calibração univariada – calibração utilizada na técnica de referência (ICP OES). Além disso, nenhum micronutriente (B, Cu, Fe, Mn e Zn) apresentou bons resultados na calibração multivariada. O que levou a estas conclusões foi que, além de altos valores de SEC para estes modelos, a porcentagem de amostras acima do EC ( $\% > EC$ ) ficaram abaixo de 50%, exceto para o Fe no milho. O modo de normalização notável para a maioria dos modelos foi a norma Euclidiana.

A FIGURA 5.2.1 ilustra um modelo com previsão não satisfatória, em que valores de referência (medidos por ICP OES) e os valores previstos (multivariado) são comparados. Este exemplo foi obtido com os resultados para o Cu na soja com pecíolo. É notável perceber que os valores previstos via LIBS não estão diretamente relacionados com os valores de referência obtidos pelo ICP OES.

É importante enfatizar que a calibração de micronutrientes é ainda um desafio, uma vez que fatores como homogeneidade das amostras, interação laser/amostra, interferência da matriz e sensibilidade do detector interferem na obtenção de bons modelos.

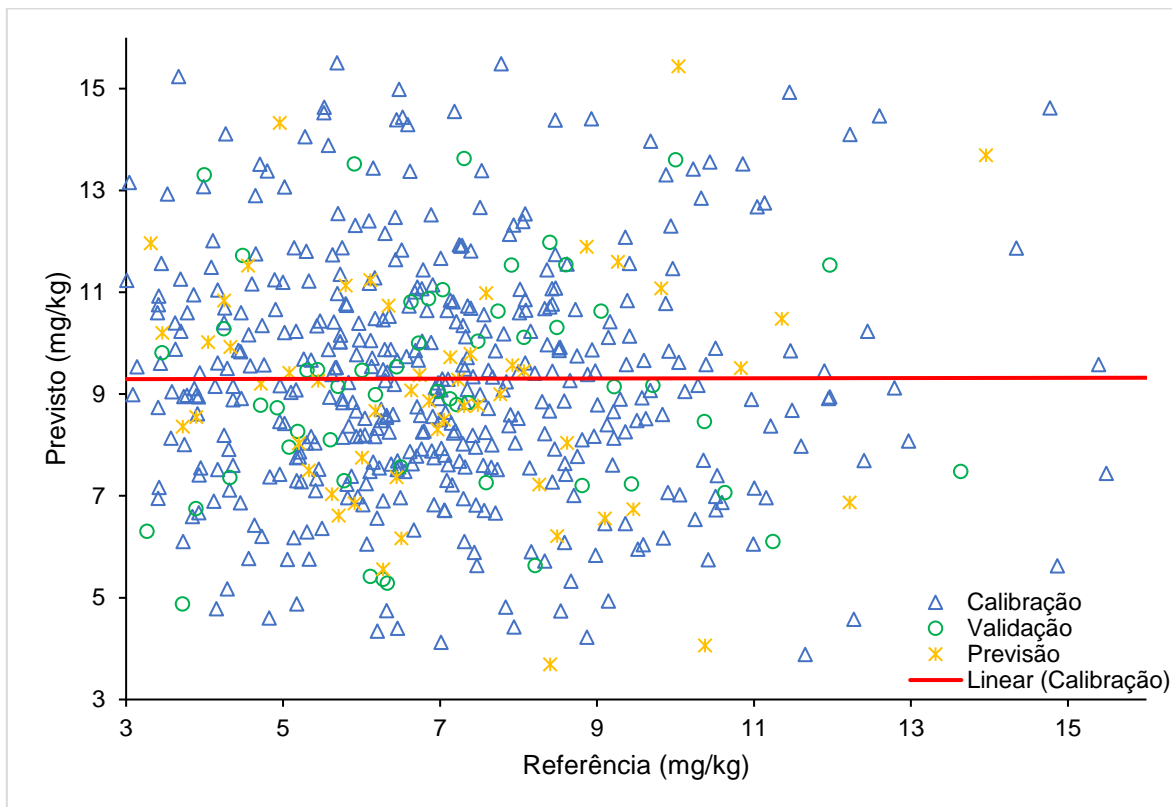


FIGURA 5.2.1. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o Cu na soja com pecíolo.

Ademais, não foi possível realizar calibrações para os macronutrientes P e S, haja vista que nenhuma linha de emissão satisfatória foi encontrada para estes elementos. Isso se deve ao fato da maioria das linhas de emissão do P e S estarem na região inicial do detector, UV (186 nm – 300 nm), o que dificulta suas seleções e tratamentos. Ademais, para o analito B, não foi possível realizar calibrações multivariadas, pois, das linhas testadas, apenas uma foi satisfatória.

TABELA 5.2.1. Resumo dos dados obtidos para os modelos uni e multivariado para cultura de milho.

	K*	K*	Ca*	Ca*	Mg*	Mg*	B	Cu	Cu	Fe	Fe	Mn	Mn	Zn	Zn
MODELO	UNI	PLS	UNI	PLS	UNI	PLS	UNI	UNI	PLS	UNI	PLS	UNI	PLS	UNI	PLS
Variáveis Latentes	-	1	-	2	-	2	-	-	2	-	4	-	4	-	1
Norma	2	2	1	1	2	2	5	8	8	1	1	5	5	11	11
% acumulado	-	99,6	-	81,1	-	82,6	-	-	63,6	-	71,8	-	79,6	-	42,5
SEC	8,3	3,8	3,5	0,7	0,6	0,5	17,9	13,5	4,6	94,3	36,6	16,5	9,8	29,7	5,5
SECV	-	3,9	-	0,8	-	0,5	-	-	4,9	-	42,2	-	10,9	-	5,7
SEV	-	2,7	-	0,9	0,5	0,5	-	-	5,4	-	31,2	-	12,2	-	8,6
Menor Concentração	9,1	9,1	2,1	2,1	0,9	0,9	1,9	1,5	1,5	46,2	46,2	6,5	6,5	7,1	7,1
EC	27,8	12,7	11,5	2,4	2,0	1,5	59,7	45,0	15,3	314,3	122,0	54,9	32,7	99,0	18,4
% > EC	14,5	96,4	0,0	96,7	79,3	93,8	0,0	0,0	20,4	1,5	78,5	8,7	37,1	0,0	48,7
Linhas de emissão	766,5 nm	393,4 nm	393,4 nm	11 linhas	279,6 nm	13 linhas	249,7 nm	250,6 nm	6 linhas	259,9 nm	13 linhas	257,6 nm	8 linhas	275,6 nm	2 linhas

Legenda: \* g/kg e os demais estão em mg/kg; n<sub>total</sub> = 275 amostras; n<sub>calibração</sub> = 65 amostras; n<sub>validação</sub> = 16 amostras;

TABELA 5.2.2. Resumo dos dados obtidos para os modelos uni e multivariado para cultura de soja.

	K*	K*	Ca*	Ca*	Mg*	Mg*	B	Cu	Cu	Fe	Fe	Mn	Mn	Zn	Zn
MODELO	UNI	PLS	UNI	PLS	UNI	PLS	UNI	UNI	PLS	UNI	PLS	UNI	PLS	UNI	PLS
Variáveis Latentes	-	2	-	2	-	2	-	-	1	-	1	-	3	-	1
Norma	2	2	4	4	6	6	2	3	3	1	1	6	6	8	8
% acumulado	-	100	-	89,7	-	90	-	-	33,3		12,8		60,4	-	30
SEC	4,9	3,3	3,8	2,3	1,2	0,8	22,0	68,3	6,2	860,0	307,0	50,4	33,9	128,0	16,0
SECV	-	3,4	-	2,3	-	0,8	-	-	6,2	-	312	-	35,8	-	16,3
SEV	-	3,1	-	2,8	-	0,8	-	-	3,0	-	73,0	-	37,2	-	16,3
Menor Concentração	2,5	2,5	5,8	5,8	1,7	1,7	20,2	1,0	1,0	50,2	50,2	8,5	8,5	12,6	12,6
EC	16,4	11,0	12,6	7,6	3,9	2,6	73,5	227,8	20,5	2866,7	1023,3	168,0	113,0	426,7	53,3
% > EC	50,1	91,8	18,1	86,9	55,0	98,8	2,5	0,0	1,5	0,1	0,5	4,8	12,6	0,0	29,2
Linhas de emissão	769,89 nm	2 linhas	558,88 nm	10 linhas	516,73 nm	12 linhas	249,68 nm	250,63 nm	5 linhas	252,91 nm	10 linhas	257,61 nm	6 linhas	208,73 nm	2 linhas

Legenda: \* g/kg e os demais estão em mg/kg; n<sub>total</sub> = 923 amostras; n<sub>calibração</sub> = 245 amostras; n<sub>validação</sub> = 60 amostras;



TABELA 5.2.3. Resumo dos dados obtidos para os modelos uni e multivariado para cultura de soja com pecíolo.

	K	K	Ca	Ca	Mg	Mg	B	Cu	Cu	Fe	Fe	Mn	Mn	Zn	Zn
MODELO	UNI	PLS	UNI	PLS	UNI	PLS	UNI	UNI	PLS	UNI	PLS	UNI	PLS	UNI	PLS
Variáveis Latentes	-	2	-	2	-	3	-	-	1	-	2	-	2	-	1
Norma	1	1	1	1	8	8	2	1	1	6	6	5	5	7	7
% acumulado	-	100	-	85	-	91,5	-	-	58,7	-	35	-	66,8	-	50,6
SEC	11,8	5,0	3,4	2,0	1,0	0,6	37,3	136,5	21,8	315,0	48,0	54,4	40,1	205,0	14,1
SECV	-	5,2	-	2,0	-	0,6	-	-	21,9	-	49,0	-	44,1	-	14,3
SEV	-	5,3	-	2,0	-	0,7	-	-	23,5	-	51,7	-	32,1	-	15,1
SEP	-	4,8	-	2,0	-	0,7	-	-	35,7	-	79,6	-	33,1	-	16,7
Menor Concentração	6,6	6,6	4,6	4,6	1,6	1,6	13,1	0,8	0,8	48,5	48,5	15,7	15,7	6,2	6,2
EC	39,4	16,6	11,5	2,4	3,3	2,0	124,3	455,0	72,7	1050,0	160,0	181,3	133,7	683,3	47,0
% > EC	0,3	90,4	21,3	100,0	91,5	99,9	1,1	0	2,0	0	6,2	3,4	8,4	0	31,9
Linhas de emissão	769,89 nm	2 linhas	558,88 nm	10 linhas	518,61 nm	13 linhas	249,68 nm	250,63 nm	5 linhas	252,91 nm	10 linhas	257,61 nm	6 linhas	208,73 nm	2 linhas

Legenda:  $n_{\text{total}} = 1780$  amostras;  $n_{\text{calibração}} = 473$  amostras;  $n_{\text{validação}} = 59$  amostras;  $n_{\text{previsão}} = 59$  amostras

Já os macronutrientes Ca, K e Mg apresentaram resultados satisfatórios quanto as calibrações multivariadas, sendo possível determiná-los com confiança em análises via LIBS, uma vez que, além de apresentarem baixos valores de SEC, SECV e SEV, a % > EC foram todos acima de 87%.

Os valores de SEC para Ca, K e Mg no milho foram 0,7, 3,8 e 0,5 g/kg; já na soja foram 2,3, 3,3 e 0,8 g/kg; e na soja com pecíolo, 2,0, 5,0 e 0,6 g/kg, respectivamente. Quando comparados com o trabalho de ANDRADE et al. (2017), por exemplo, cujos SECs obtidos foram 1, 4 e 0,7 g/kg para Ca, K e Mg, respectivamente, observa-se que os resultados obtidos apresentaram SEC ainda menores do que o trabalho destes autores, possivelmente explicados pela maior quantidade de amostras utilizada na construção dos modelos.

As FIGURAS 5.2.2, 5.2.3 e 5.2.4; 5.2.5, 5.2.6 e 5.2.7 e 5.2.8, 5.2.9 e 5.2.10 representam gráficos entre os valores previstos pelos modelos PLS e os valores obtidos pela técnica de referência (ICP OES) para Ca, K e Mg nas culturas de milho, soja e soja com pecíolo, respectivamente.

Por meio da análise das figuras, observa-se que existe uma boa correlação entre os valores previstos e de referência, evidenciando a possibilidade da utilização da técnica LIBS para determinação destes analitos nestas culturas.

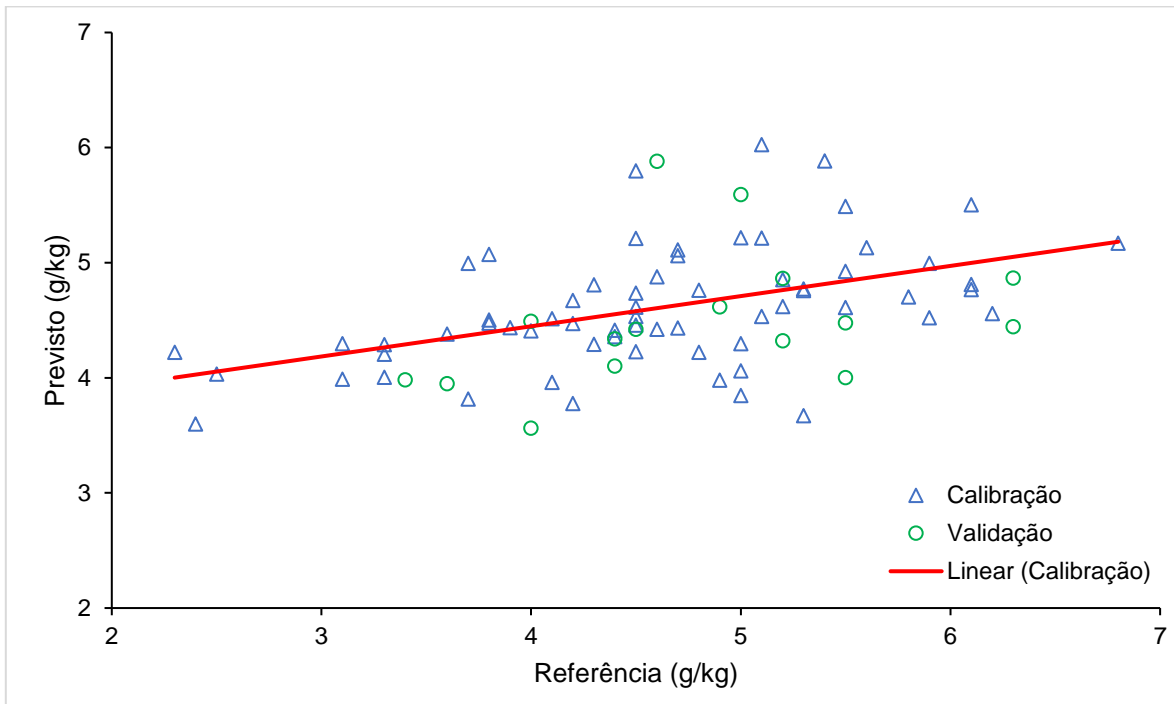


FIGURA 5.2.2. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o Ca no milho.

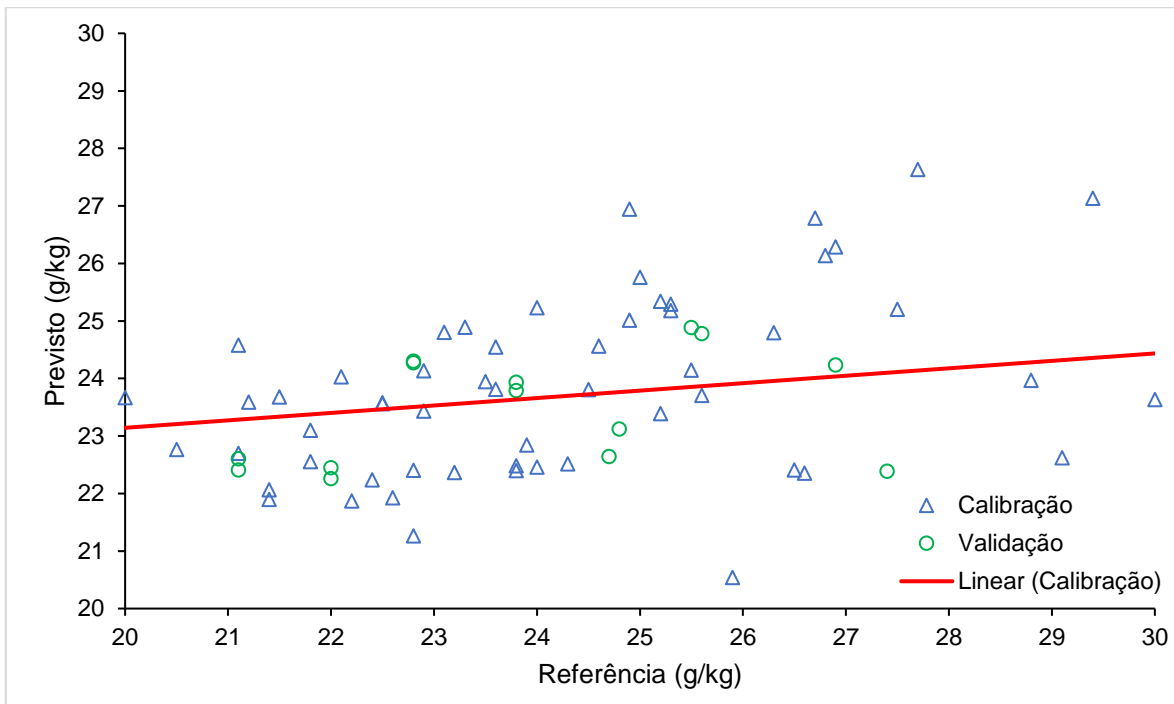


FIGURA 5.2.3. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o K no milho.

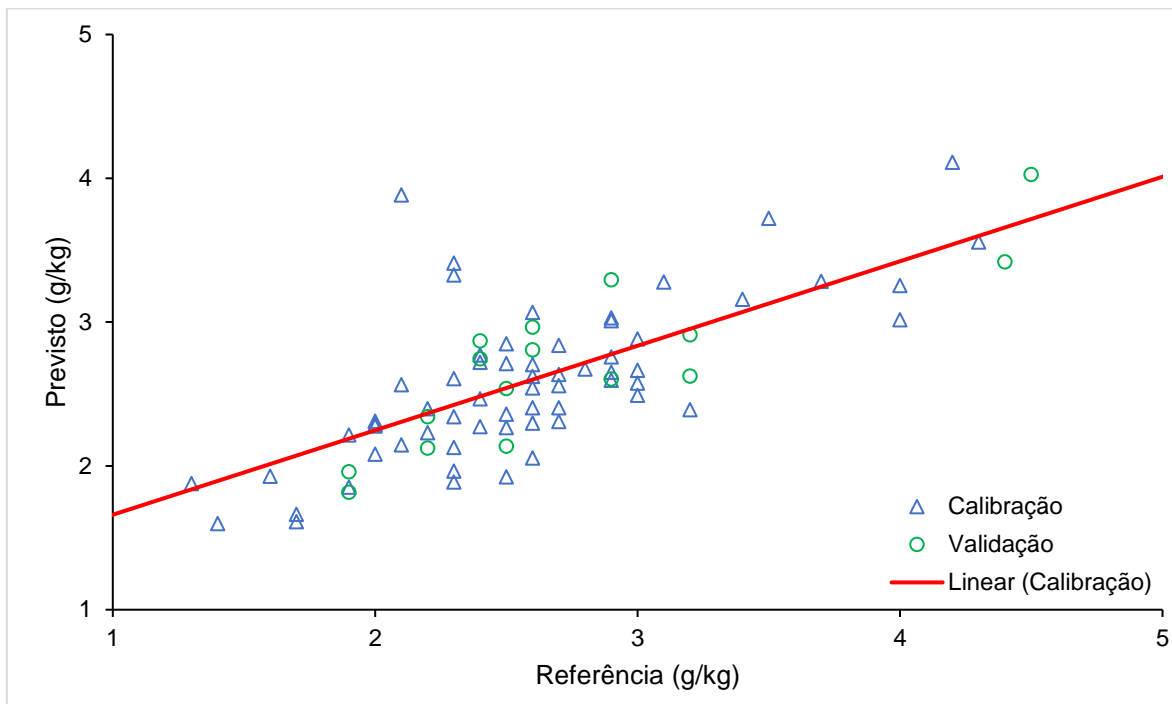


FIGURA 5.2.4. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o Mg no milho.

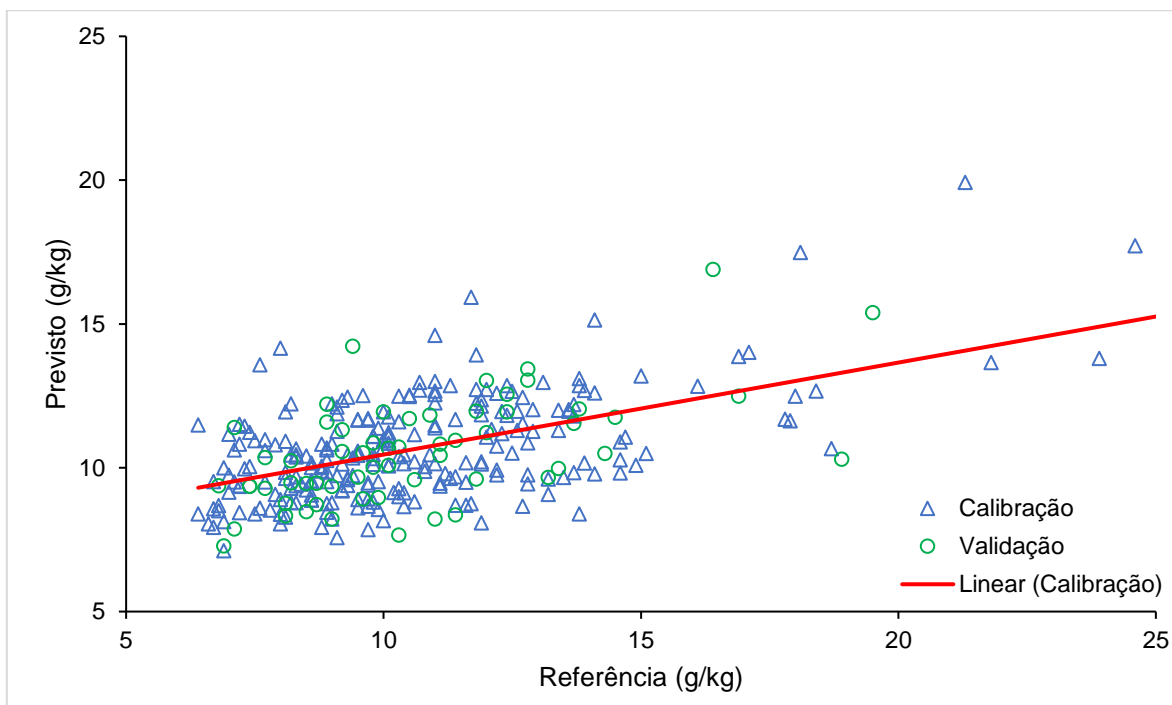


FIGURA 5.2.5. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o Ca na soja.

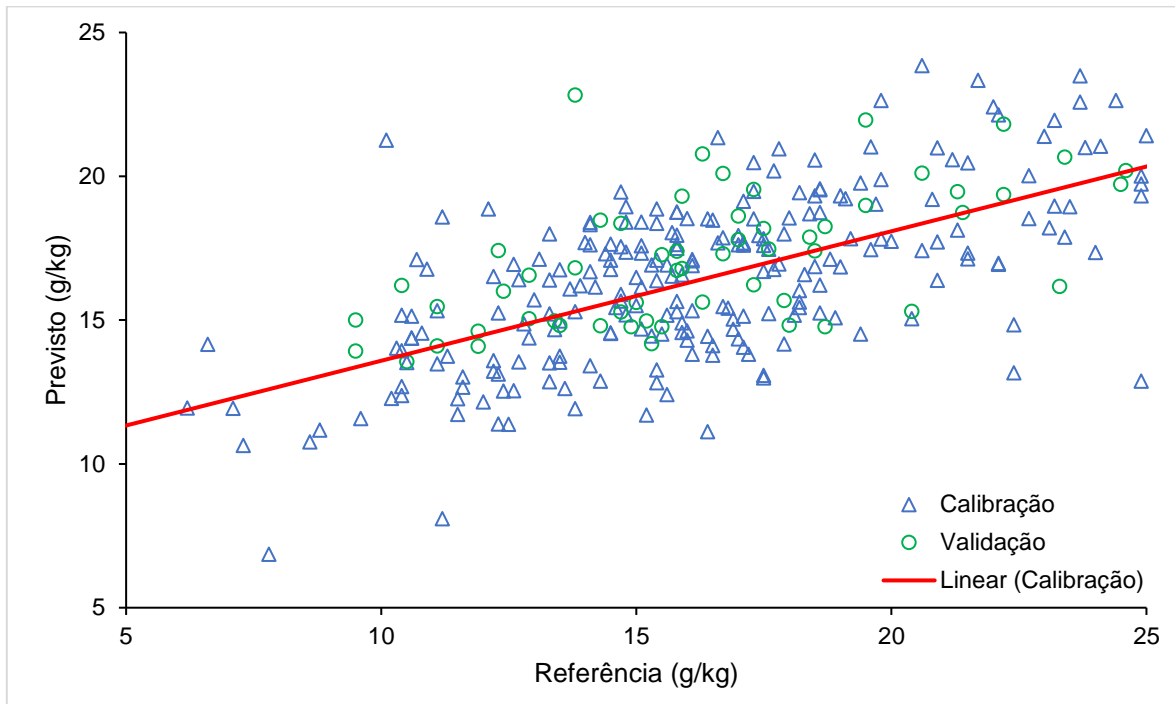


FIGURA 5.2.6. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o K na soja.

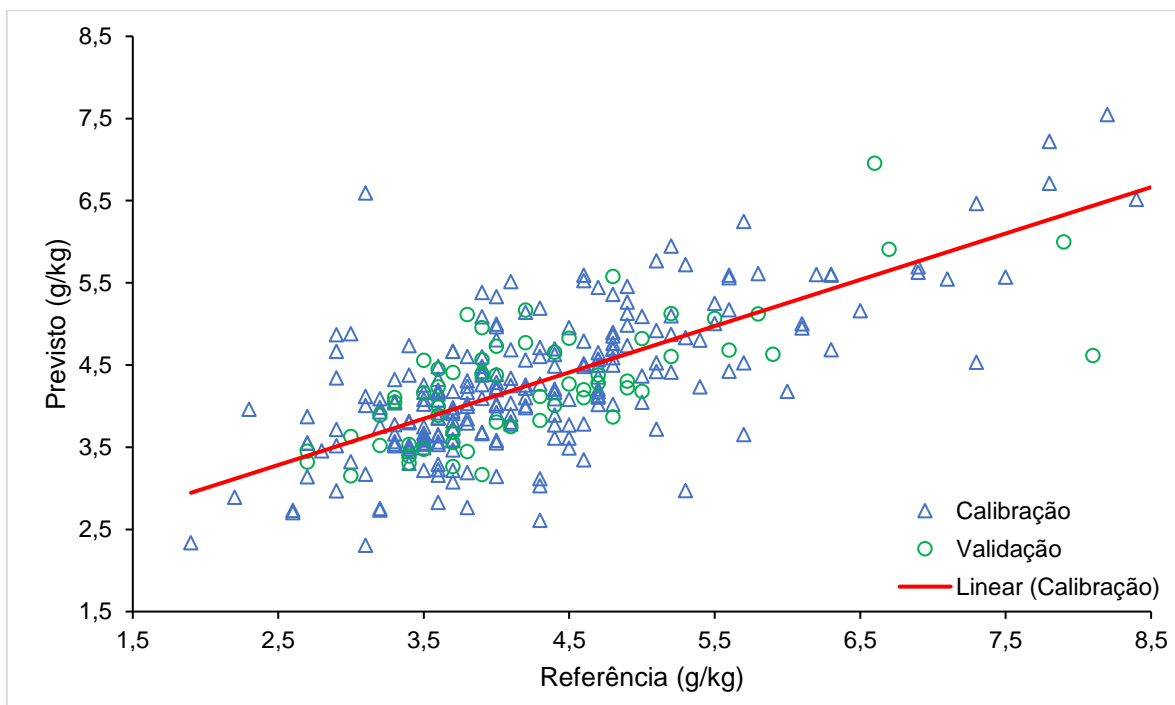


FIGURA 5.2.7. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o Mg na soja.

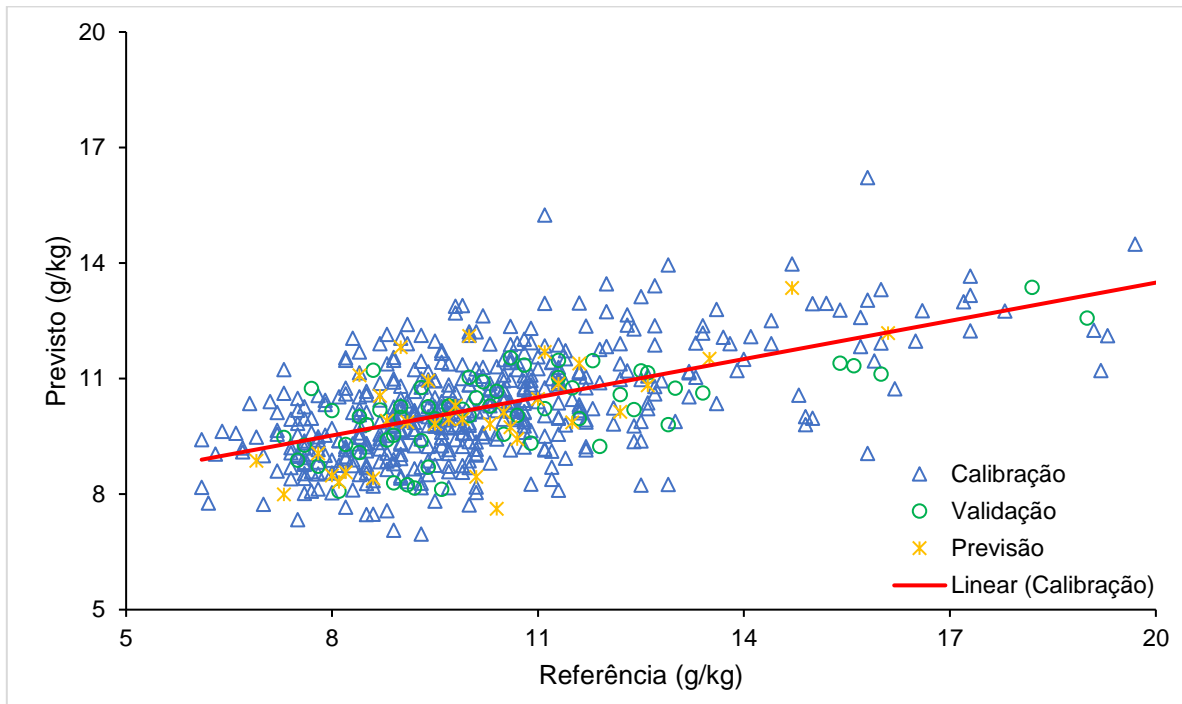


FIGURA 5.2.8. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o Ca na soja com pecíolo.

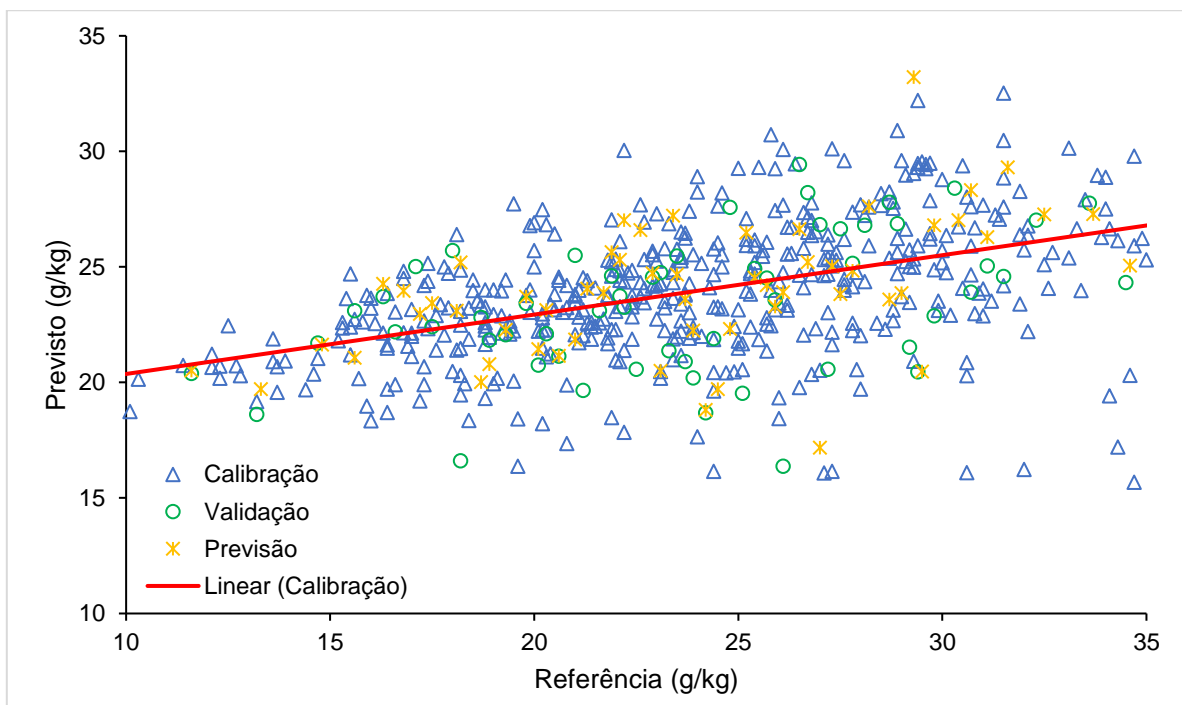


FIGURA 5.2.9. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o K na soja com pecíolo.

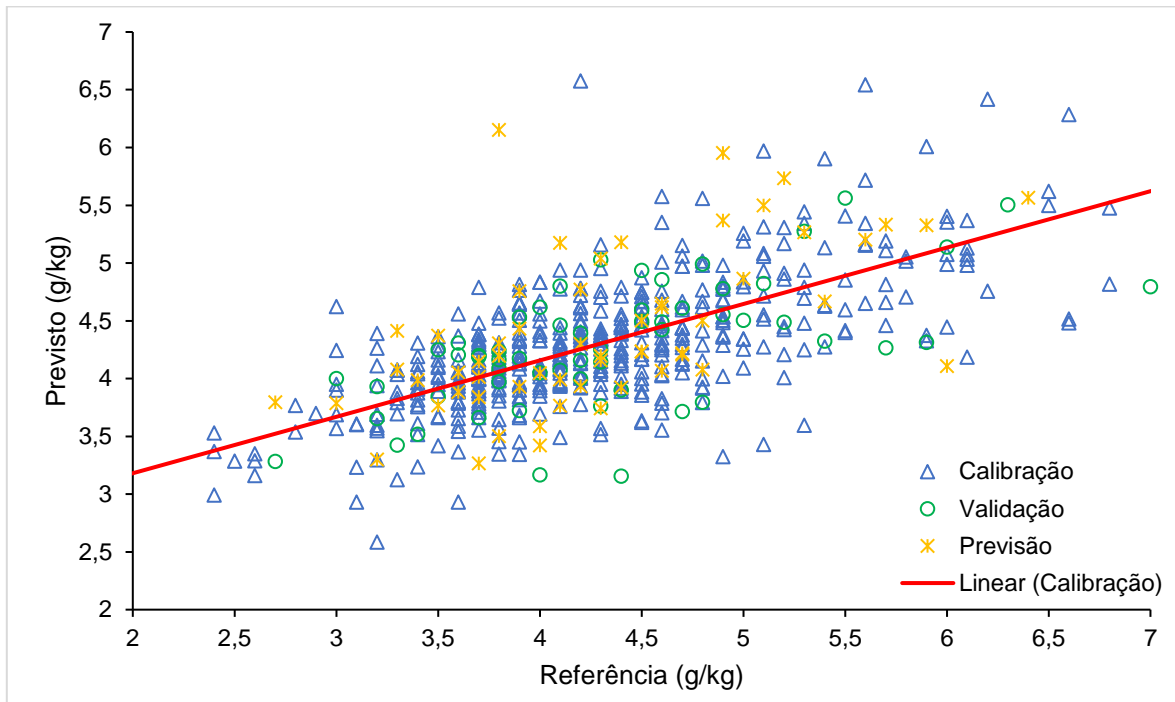


FIGURA 5.2.10. Valores de referência (medido) e os valores previstos (multivariado) para o Mg na soja com pecíolo.

Como mencionado, para a construção de cada modelo multivariado de calibração, foram selecionados um conjunto de linhas de emissão de cada elemento com as melhores respostas (menores erros de predição). A FIGURA 5.2.11 ilustra a representação dos comprimentos de onda selecionados do Mg para construção do modelo de calibração para cultura de soja como exemplo. As linhas utilizadas para os elementos Ca foram: 315,89; 317,93; 393,37; 396,85; 422,67; 430,25; 443,50; 445,48; 527,03; 558,88 e 559,45 nm. E para o K: 766,49 e 769,90 nm.

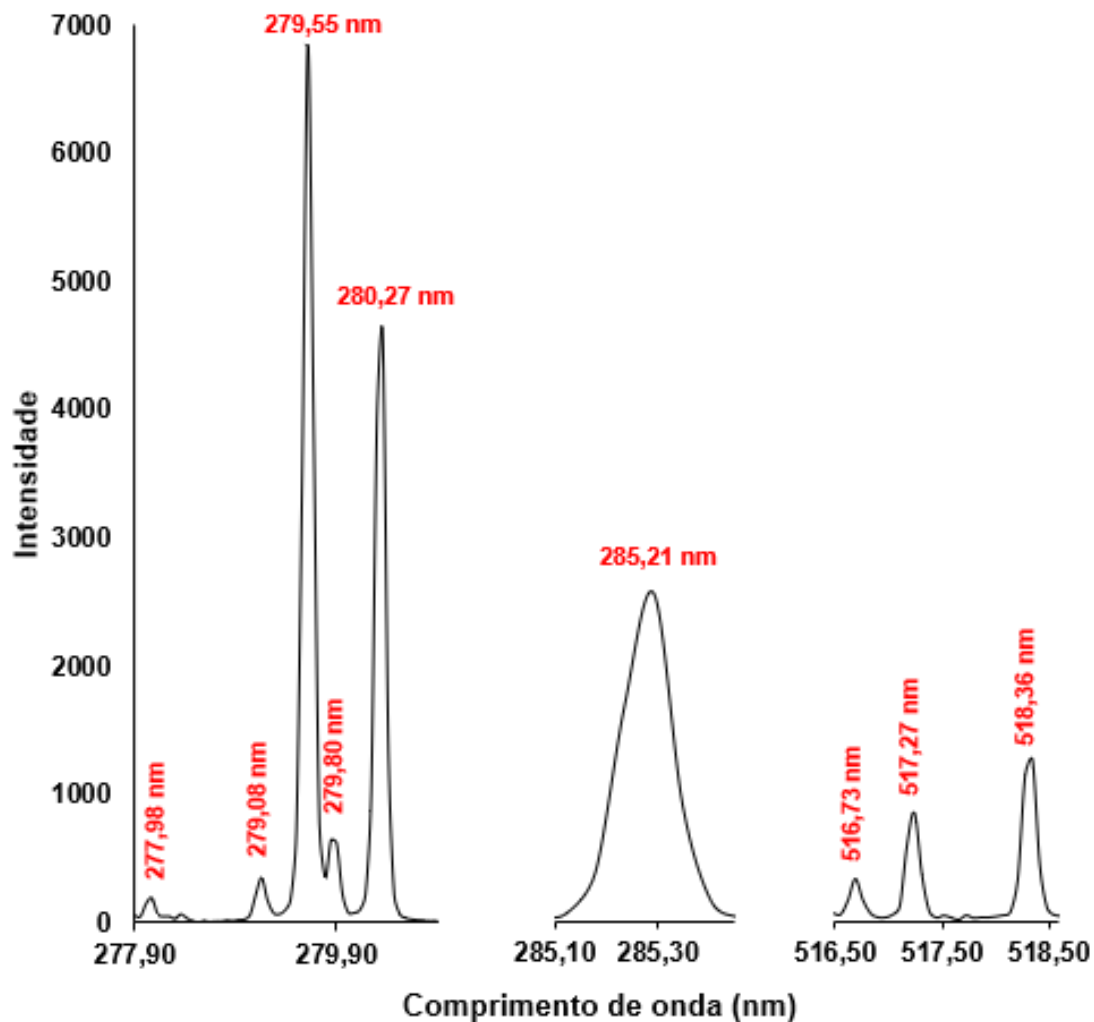


FIGURA 5.2.11. Comprimentos de onda de emissão do elemento Mg, selecionados para construção do modelo de calibração multivariada para cultura de soja.



### 5.3 Comparativo da precisão entre as metodologias

O método utilizado para determinação de macro e micronutrientes em plantas pelo Grupo Exata Brasil está validado segundo as normas da ISO 17025. Com o objetivo de comparar as precisões dos métodos (ICP OES e LIBS), um conjunto de 50 amostras de soja com pecíolo foram avaliadas em duplicata e o desvio padrão relativo – DPR (%) calculado. A TABELA 5.3.1 traz o comparativo entre os valores de incertezas percentuais do método via ICP OES e o DPR médio (%) pelo método LIBS para os analitos Ca, K e Mg.

Tabela 5.3.1. Comparativo da precisão entre as metodologias.

	<b>Incerteza da Precisão (%) – ICP OES</b>	<b>DPR (%) – LIBS</b>
<b>Ca</b>	2,69	6,4
<b>K</b>	2,03	11,1
<b>Mg</b>	4,18	7,2

Para obtenção de melhores comparações, foram construídos histogramas para avaliar as faixas de DPR obtidos e suas frequências ao longo das 50 amostras analisadas. As FIGURAS 5.3.1, 5.3.2 e 5.3.3 representam os histogramas obtidos para os analitos Ca, K e Mg, respectivamente.

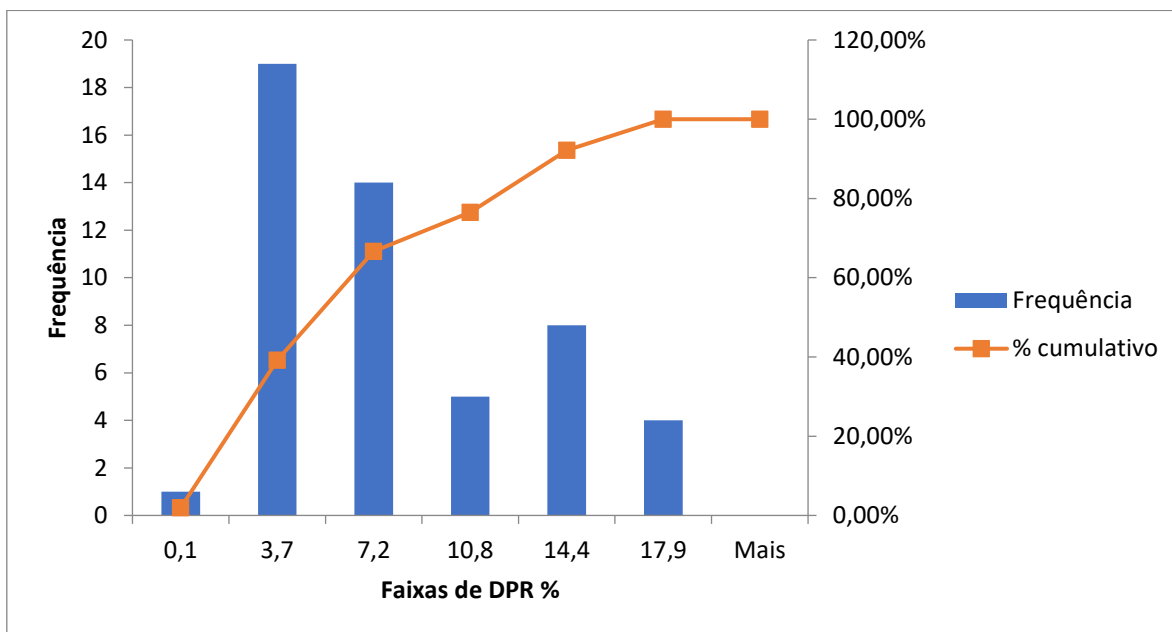


FIGURA 5.3.1. Histograma de distribuição de DPR para o analito Ca.

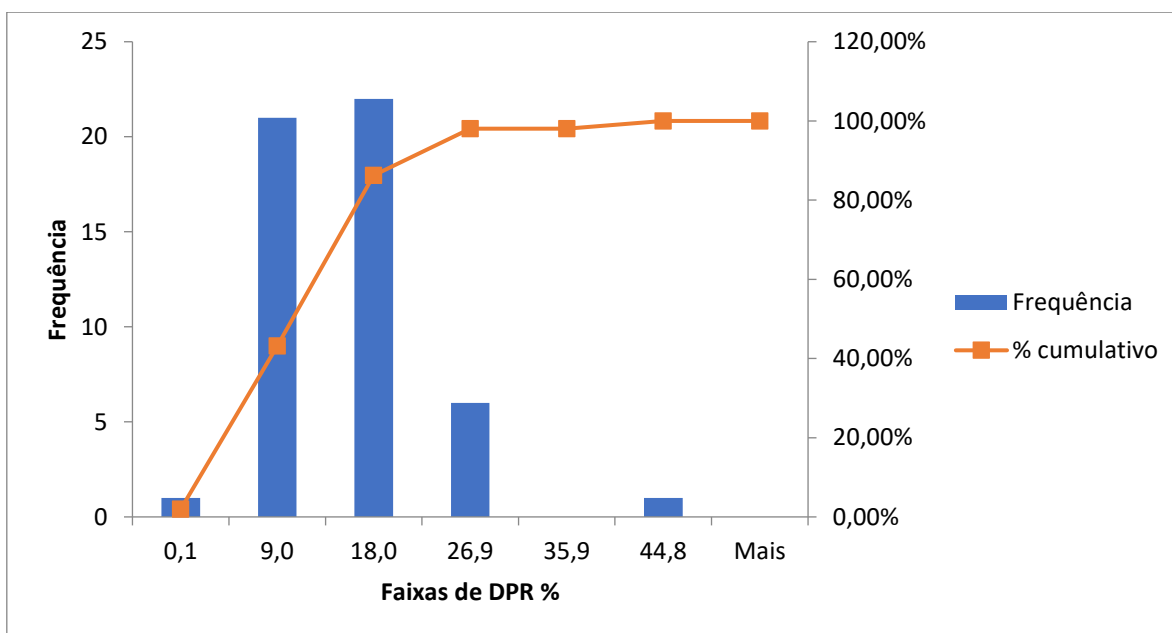


FIGURA 5.3.2. Histograma de distribuição de DPR para o analito K.

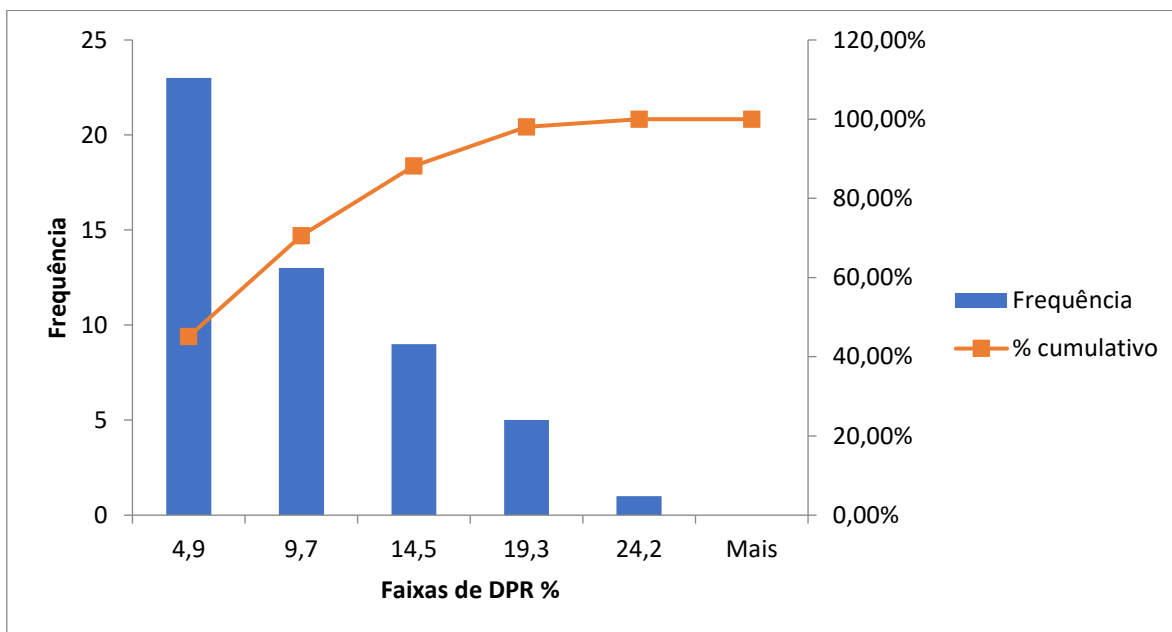


FIGURA 5.3.3. Histograma de distribuição de DPR para o analito Mg.

Ao avaliar os dados da TABELA 5.3.1 e as distribuições do DPR representados nas figuras, observa-se valores ligeiramente maiores para o método via LIBS quando comparado com ICP OES. Este fato era esperado, haja vista que a calibração utilizada via LIBS foi baseada em valores de referências obtidos por meio da ICP OES.

Ademais, para o analito Ca, foi observado que aproximadamente 67% das amostras analisadas apresentaram resultados de DPR iguais ou menores do que 7,2%. Para o analito K, foi observado que aproximadamente 86% das amostras analisadas apresentaram resultados de DPR iguais ou menores do que 18%. Já para o analito Mg, foi observado que aproximadamente 70% das amostras analisadas apresentaram resultados de DPR iguais ou menores do que 9,7%.

Em suma, estes resultados mostram que a ordem de grandeza da precisão do método via LIBS é similar a ordem de grandeza do método via ICP OES.

## 6. Conclusão

Com essa dissertação de mestrado profissional, concluiu-se que a combinação da LIBS com estratégias quimiométricas foi uma boa alternativa para propor modelos de regressão confiáveis. Por meio da utilização desta técnica, foram observados bons resultados para as determinações de Ca, K e Mg em milho, soja e soja com pecíolo.

A análise via LIBS quando comparada com as determinações por ICP OES, gera uma economia considerável na determinação dos analitos, uma vez que utilizando a LIBS não há necessidade de digestão da amostra via micro-ondas; não é utilizado nenhum tipo de gás (Ar ou He); e não há necessidade de transportar a amostra ao plasma, pois este é formado sobre a amostra pela utilização de um feixe de laser focalizado.

Essa dissertação também mostrou a aplicação de diferentes normalizações de sinal, as quais foram úteis para minimizar as diferenças entre as matrizes das amostras. Os modelos de calibração multivariado foram mais eficientes quando comparados com os multivariados.

Foi observado que ainda é um desafio na calibração por meio da LIBS para elementos cujas concentrações sejam muito baixas (na ordem de mg/kg). Estas limitações possivelmente se devem ao fato da interação laser/amostra; homogeneidade da amostra; interferência da matriz; limites do detector, entre outros. Porém, foi visto que a técnica é satisfatória quando as concentrações dos analitos estão acima da ordem de 1% m/m.

Parte dos resultados desta dissertação foram submetidos para possível publicação e o manuscrito preparado está no Apêndice 1.

## 7. Referências

- ABIOVE - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em: <https://abiove.org.br/>. Acesso em: 24 agosto 2022.
- ABNT/INMETRO. Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (GUM). Língua portuguesa, tradução de 1995, revisão 2008.
- ANDRADE, D. F.; PEREIRA-FILHO, E. R.; KONIECZYNSKI, P. Comparison of ICP OES and LIBS Analysis of Medicinal Herbs Rich in Flavonoids from Eastern Europe. *J. Braz. Chem. Soc.*, 28, 2017. p. 838-847.
- 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.* 2010, 65, 66-74.
- CASTRO, J. P.; PEREIRA-FILHO, E. R. Twelve different types of data normalization for the proposition of classification, univariate and multivariate regression models for the direct analyses of alloys by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, 31. p. 2005-2014.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Boletim Logístico. Brasília, Fevereiro 2022, 1-17.
- COSTA, V. C.; AUGUSTO, A. S.; CASTRO, J. P.; MACHADO, R. C.; ANDRADE, D. F.; BABOS, D. V.; SPERANÇA, M. A.; GAMELA, R. R.; PEREIRA-FILHO, E. R. LASER INDUCED-BREAKDOWN SPECTROSCOPY (LIBS): Histórico, Fundamentos, Aplicações e Potencialidades. *Quim. Nova.* 2019, 42, p. 527-545.

EXATA BRASIL. Disponível em: <http://www.exatabrasil.com.br/>. Acesso em: 02 maio 2022.

FERREIRA, M. M. C. Quimiometria. Conceitos, Métodos e Aplicações. 1ª ed. Campinas: UNICAMP, 2015.

GALBÁCS, G. Laser-induced breakdown spectroscopy in biological, forensic and materials sciences. Berlin: Springer. 2022. DOI: 10.1007/978-3-031-14502-5.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. Evolução e perspectiva de desempenho econômico associados com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro. Embrapa Soja, Londrina, 2011.

HUSTED, S.; PERSSON, D. P.; LAURSEN, K. H; HANSEN, T. H.; PEDAS, P.; SCHILLER, M.; HEGELUND, J. N.; SCHJOERRINGA, J. K. Review: The role of atomic spectrometry in plant science. J. Anal. At. Spectrom. 2011, 26, p. 52–79.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. Métodos de preparo de amostras para análise elementar. 2ª ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química. 2019.

MAATHUIS, F. J. M. E. A. Plant mineral nutrients: methods and protocols. Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, 2013.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Projeções do Agronegócio - Brasil 2016/2017 a 2026/27 - Projeções de Longo Prazo., Brasília, DF, 2017. Disponível em: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/banner\\_site-03-03-1.png/@\\_@download/file/projecoes-do-agronegocio-2018.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/banner_site-03-03-1.png/@_@download/file/projecoes-do-agronegocio-2018.pdf). Acesso em: 26 setembro 2022.

MARSCHNER, H. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Vol. 89, Academic Press, London, 2012. p. 651.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. Principles of plant nutrition. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, n. 5 ed, 2001. p. 829.

MEYERS, R. A. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. [S.l.]: Ed. Chichester: Wiley, 2011. 2188 p.

NUNES, L. C.; BRAGA, J. W. B.; TREVIZAN, L. C.; SOUZA, P. F.; CARVALHO, G. G. A.; JÚNIOR, D. S.; POPPI, R. J.; KRUG, F. J. Optimization and validation of a LIBS method for the Determination of Macro and Micronutrients in Sugar Cane Leaves. J. Anal. At. Spectrom. 2010, 25. p. 1453-1460.

OLIVEIRA, E. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 14, No. 2, 174-182, 2003.

PEREIRA-FILHO, E. R. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): aplicações e estratégias de calibração = Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): applications and calibration strategies [livro eletrônico]. Bauru, SP : Editora Iberoamericana de Educação, 2021.

PEREIRA-FILHO, E. R. Planejamento Fatorial em Química. 1ª ed. São Carlos: EdUSCar, 2015.

SANTOS JR., D.; NUNES, L. C.; CARVALHO, G. G. A.; GOMES, M. S.; SOUZA, P. F.; LEME, F. O.; SANTOS, L. G. C.; KRUG, F. J. Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: A review. Spectrochimica Acta Part B. 2012. 71–72, p. 3 – 13.

SINGH, J. P.; THAKUR, S. N. Laser-induced breakdown spectroscopy. 2<sup>a</sup> ed. Amsterdam: Elsevier, 2020.

SUN Q.; M. TRAN; 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. Spectros.*, 1999.

TREVIZAN, L.C.; SANTOS JR, D.; SAMAD, R. E.; VIEIRA JR, N. D; NOMURAD, C. S.; NUNESE, L. C.; RUFINIA, I. A.; KRUG, F. J. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of macronutrients in plant materials. *Spectrochimica Acta Part B* 63. 2008. p. 1151–1158.



## Anexos

### Anexo 1 – Função no Matlab para o cálculo dos 12 modos de normalização.

```

function [X_out]=libs_treat(data);
% Function [data_out]=libs_treat(data);
% What to do before:
% Right click in the txt file and "import data"
% or
% open('nome.xlsx'). If you have an Excel file;
% What to do after:
% xlswrite('nome_final',data_out);
% clear data
% clear textdata
% output order: X_out (raw data)
% mean raw data
% mean after normalization by norm, area and maximum
% sum data
% sum after normalization by norm, area and maximum
% output order: X_outC193
% mean raw normalized by C193 data
% sum data
% output order: X_outC247
% mean raw normalized by C247 data
% sum data

%var_name=data(11:end,1); % Works with Excel only.
%var_name = textdata(11:end,1); % Work with txt files only.

X=data(11:end,1:end);

```

```

[m,n]=size(X);

teste3=std(X'); % teste3 has the standard deviation of the data

% Normalization by norm
X_n_n=normr(X);

% Normalization by area
teste=(sum(X,2))*ones(1,n); %matrix with areas.

X_n_a=X./teste;

% Normalization by maximum
teste2=max(X');
teste2=teste2';
teste2=teste2*ones(1,n);

X_n_m=X./teste2; % normalization by maximum
for i =1:m;
teste4(i)=norm(X(i,:));%teste4 has the individual norms
teste4=teste4';
end

figure
subplot(2,2,1)
plot (teste3,'-ob') % Graphic of the standard deviation
title('Standard Deviation')
xlabel('Samples');
ylabel('Standard deviation');
subplot (2,2,2)
plot (teste,'-or') % Graphic of the sum

```

```
title('Area')
xlabel('Samples');
ylabel('Area');
subplot(2,2,3)
plot (teste2, '-ok') % Graphic of the maximum
title('Maximum')
xlabel('Samples');
ylabel('Maximum');
subplot(2,2,4)
plot (teste4, '-og') % Graphic of the maximum
title('Norm')
xlabel('Samples');
ylabel('Norm');
```

```
% Finding the maximum for C 193 nm
carbon193_raw=max(X(:,91:95));
carbon193_raw=carbon193_raw';
carbon193_raw=carbon193_raw*ones(1,n);
X_r_C193=X./carbon193_raw;
```

```
% Finding the maximum for C 247 nm
carbon247_raw=max(X(:,935:937));
carbon247_raw=carbon247_raw';
carbon247_raw=carbon247_raw*ones(1,n);
X_r_C247=X./carbon247_raw;
```

```
% Output1
X_out(1,:)=mean(X);
X_out(2,:)=mean(X_n_n);
X_out(3,:)=mean(X_n_a);
X_out(4,:)=mean(X_n_m);
```

```
X_out(5,:)=sum(X,1);  
X_out(6,:)=sum(X_n_n);  
X_out(7,:)=sum(X_n_a);  
X_out(8,:)=sum(X_n_m);  
X_out(9,:)=mean(X_r_C193);  
X_out(10,:)=sum(X_r_C193,1);  
X_out(11,:)=mean(X_r_C247);  
X_out(12,:)=sum(X_r_C247,1);  
X_out=X_out';
```

## **Apêndices**

**Apêndice 1 – Manuscrito enviado para publicação.**

# Direct determination of macronutrients (Ca, K and Mg) in soy leaves samples with and without petiole by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS)

João Victor Borges Assis<sup>1,2</sup>, Dennis da Silva Ferreira<sup>1</sup>, Daniela de Assis Bócoli<sup>2</sup>,

Carlos Henrique Hoff Brait<sup>2</sup>, Edenir R. Pereira-Filho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Group of Analytical Instrumental Analysis (GAIA), Chemistry Department, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos-São Paulo, 13565-905, Brazil

<sup>2</sup>Exata Brasil, Jataí-Goiás, 75802-005, Brazil.

\*Corresponding author: [erpf@ufscar.br](mailto:erpf@ufscar.br)

**ABSTRACT:** This study was dedicated to the development of analytical methods for the determination of macronutrients (P, K, Ca, Mg) and micronutrients (B, Cu, Fe, Mn, S and Zn) in soy leaf samples with and without petiole. The main purpose of the study was to present Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) as a viable alternative for the direct analysis of leaf samples using chemometric tools to interpret the data obtained. The usage condition chosen for LIBS was 70 mJ of energy, 1.0  $\mu$ s of delay time and 100  $\mu$ m of spot size, which was applied to 871 samples, 305 of soy without petiole and 566 of soy with petiole. The reference values of the analytes for the construction of calibration models were obtained using the Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP OES) technique. To minimize signal variations and sample matrix differences, twelve normalization modes and two calibration strategies were tested. The following were studied: multivariate calibration using Partial Least Squares (PLS) and univariate calibration using area and height of several emission lines. The notable normalization mode for most models

was the Euclidean norm. No analyte showed good results for univariate calibrations. Multivariate models for P, S and micronutrients did not show satisfactory results. The models obtained for Ca, K and Mg showed good results, the standard error of calibration (SEC) ranged from 0.7 g/kg, for Ca in soy leaves without petioles with 2 latent variables, up to 5.0 g/kg, for K in soy leaves with petiole with 2 latent variables.

**KEYWORDS:** *LIBS, soy, chemometrics, analysis of solid samples.*

## 1. INTRODUCTION

Soy (*Glycine max* L.) is the main oilseed cultivated in the world, being one of the most relevant commercial crops. In Brazil, it was the crop that grew the most in the last three decades. In 2022, soy in grains registered 2.45 million tons in exports, representing revenues of US\$ 1.24 billion, a record value for the month of January.<sup>1</sup> The increase in soy production is related to several factors, including: considerable protein (~ 40%) and oil (~ 20%) contents, since they are favorable for food, biofuel production, among other sectors; standardized and uniform commercial parameters, which favor production and negotiation; there was a significant expansion of areas and productivity of the oleaginous plant, with the growing supply of production technologies.<sup>2</sup>

The analysis of plant tissue is essential for proper growth, high yield, and productivity, and assurance of product quality.<sup>3</sup> Within this perspective, the sample preparation of leaf samples *via* microwave-assisted acid mineralization in closed vessels and determination of analytes by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP OES) have been widely used in routine laboratory analysis.<sup>4-6</sup>

On the other hand, the direct analysis of leaf samples pellets using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) has aroused the interest of the scientific community in recent years.<sup>7-10</sup> Analysis using pellets promotes a decrease in the steps of the analytical

sequence, simplifying the analysis process when compared to conventional methods that require sample decomposition to obtain a homogeneous aqueous solution.<sup>11-15</sup> In a study performed by Andrade *et al.*, the authors compared LIBS and ICP OES analyzes of samples of medicinal herbs rich in flavonoids from Eastern Europe. The authors obtained a strong correlation of LIBS results when compared to those obtained by ICP OES for Ca, K and Mg through a univariate calibration. The LoD (limit of detection) obtained were 1, 4 and 0.7 g/kg for Ca, K and Mg, respectively.<sup>16</sup>

The goal of this study was to explore the results after the determination of macronutrients (Ca, K, Mg, and P) and micronutrients (B, Cu, Fe, Mn, S, and Zn) in soy leaf samples with and without petiole and the main purpose was the comparison of results obtained with the use of ICP OES (mineralization) with those obtained by the LIBS technique (direct solid analysis of samples). These samples were collected by the Exata Brazil company. For this, two chemometric techniques were applied, such as principal component analysis (PCA)<sup>17</sup> for exploratory analysis and partial least squares (PLS)<sup>18</sup> to calculate multivariate regression models.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

**2.1 Samples.** In this study, a total of 2,703 samples of leaves were used, 923 of soy leaves without petioles and 1,780 with petioles. All selected samples were received from several Exata Brazil Group customers spread throughout the Brazilian national territory. The analyzed samples were received from the 2<sup>nd</sup> semester of 2021 to October 2022.

**2.2 Reagents, instrumentation, solutions and reference concentration of analytes.** All leaf samples were dried and ground using an oven model TE-394/5 (Tecnal, Brazil), and a Willey mill model TE-650/1 (Tecnal, Brazil), respectively. For determinations using ICP OES, the samples were mineralized according to the following procedure: the samples were kept in an oven for 24 h at  $65 \pm 5$  °C. And then, they were ground in a Willey-type mill. After



these steps, an aliquot of 250 mg of each dried and ground sample was weighed in TFM® vessel. In the mineralization process, dried and ground samples were mixed with 4 mL of 4 mol/L HNO<sub>3</sub> P.A. (Synth, Brazil) and 2 mL of 30% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> P.A. (Synth, Brazil). The samples were accommodated in the appropriate rotor for the microwave and then the digestion program was applied, the description of which is found in Table 1S at the Supplementary Material (SM). A microwave model MARS 5 (CEM, USA) was used. Then, the samples were diluted to 25 mL with deionized water. Thus, the analytes were determined *via* ICP OES model Optima 8300 (PerkinElmer, USA), the mineralized samples, blanks and standards were placed in an autosampler SC-14 (ESI, USA). The ICP OES instrumental parameters to determine the analytes are presented in Table 2S at the SM. Element concentration determinations were performed by graphic interpolation after the calculation of calibration curves with solutions containing 0.05, 0.2, 0.5, 1 and 5 mg/L for B, Cu, Fe, Mn and Zn; 5, 10, 20, 50 and 100 mg/L for Mg, S and P, and 10, 50, 100, 250 and 500 mg/L for Ca and K. The multielement solution for the calibration curve was prepared from stock solutions of 1000 mg/L monoelement standards (NSI Lab Solutions, USA). For the determination of nitrogen, the Kjeldahl method was used. A portion of 0.2 g of the ground sample was weighed into digestion vessel. Approximately 1.6 g of a catalytic mixture (10:1 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) were added, plus, 5 mL of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> P.A.. The samples were taken to the digester block and digested at 400°C until complete solubilization. After digestion, the samples were distilled with 40% (m/v) NaOH P.A. and collected in an Erlenmeyer containing a 4% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> P.A. solution. Finally, the distilled samples were titrated with a 0.1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> P.A. solution.

**2.3 Preparation of samples for analysis *via* LIBS.** For LIBS analyzes, it was necessary to prepare pellets following the procedure: samples that were already dry and ground were selected according to the concentrations determined by the reference

technique. Samples with low, average and high concentration of analytes were selected. For LIBS analyses, it was necessary to prepare sample pellets. For this procedure, a hydraulic press model SL-10 (Solab, Brazil) was used. Approximately 0.5 g of each ground material selected was transferred to the pressing set, then a pressure of 12 ton cm<sup>-2</sup> was applied for 3 minutes. After this step, a commercial instrument, the J200 model from Applied Spectra (Fremont, USA) which has a Nd:YAG laser that emits a laser pulse at 1064 nm was used. The detector is a Charge Coupled Device (CCD) and the pulse duration is around 10 ns. The spectrometer has 6 channels, with a resolution of 0.08 – 0.1 nm on channels from 1 (186.940 to 311.195 nm) to 4 (591.426 to 693.690 nm) and resolution of 0.11 – 0.14 nm on channels 5 (693,807 to 884,407 nm) and 6 (884.509 to 1042.026 nm). Regarding the instrumental variables of the instrument, the maximum pulse energy is 100 mJ, the signal acquisition time is fixed at 1.05 ms, the delay time can be varied from 0 to 2 µs and the spot size of 50 to 250 µm. The operating conditions used in LIBS are shown in Table 3S at the SM. The conditions presented at Table 3S were selected from previous studies performed by the Brazilian research group.<sup>16</sup>

**2.4 Data evaluation.** With the concentrations determined by the reference technique, the Pirouette® software, version 4.5 (Infometrix, USA) was used for PCA, aiming to evaluate the patterns between soy cultures with and without petiole to propose the calibration models. After PCA, approximately 300 spectra were obtained for each sample by laser scanning *via* LIBS (see Table 3S). Then, 12 different normalization modes were tested to minimize signal variations and sample matrix differences using script prepared at Matlab 2019 software (Matworks, USA). A description of the normalization procedure was detailed by Castro and Pereira-Filho.<sup>19-21</sup> After the data processing, preliminary univariate models were calculated to evaluate the best normalization for each element in each type of sample. For this evaluation, the most intense emission lines of each analyte: Ca, K, Mg, P, S (macronutrients)

and B, Cu, Fe, Mn and Zn (micronutrients) were used, considering their area or height. This process was carried out using Excel software (Microsoft, USA) to organize the matrices and preliminary calculations of the univariate models, and the NIST database (National Institute of Standards and Technology) to select the emission lines of each element.<sup>20</sup> The normalizations and emission lines were ordered by the Standard Error of Calibration (SEC). After evaluating the best normalizations and lines, using the Pirouette® software, PLS models for each analyte were calculated. To evaluate the generated calibration models, for soy leaf cultures without petioles (n = 305), about 80% of the samples were used for calibration and 20% for validation. Given that the number of soy leaf samples with petiole was larger (n = 591), 80% were used for calibration, 10% for validation and 10% for prediction. Thus, PLS models were calculated with cross validation. The observed parameters were number of latent variables (LV), SEC, SE of cross validation (SECV), SE of validation (SEV), and SE of prediction (SEP).

### **3. RESULTS**

Once the concentration of the analytes (B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, N, P, S and Zn) were determined in the soy leaf samples with and without petioles, and using Excel, two matrices were created (samples x concentrations) for each type of sample. The matrices obtained were: Soy matrix without petiole (923 samples x 11 determined analytes) and Soy matrix with petiole (1780 samples x 11 determined analytes).

Table 1 shows the concentration range (minimum and maximum) of the analytes determined *via* ICP OES, as well as their respective averages and standard deviations (SD). Information about nitrogen (N) were added to perform a comparison and evaluation. From this, approximately 30% of the samples of each type of soy leaf were selected for analysis of the cultures and preparation of the pellets. The original matrices were organized in ascending order of analyte concentration and samples of low, average and high

concentration of analytes were randomly selected. There by, it performed an unsupervised analysis attempting to find patterns between them and to evaluate how these samples should be grouped for the construction of the models *via* LIBS. Therefore, among the unsupervised analysis tools, the PCA was used for this evaluation. Figures 1S and 2S (see SM) illustrates the scores and loadings obtained considering the first three principal components (PC1, PC2 and PC3), respectively. The data was autoscaled and these 3 PC's accounted 48% of explained variance. When analyzing it, it is possible to notice that the samples from different types (soy leaf without petiole, circle, and soy leaf with petiole, squares) are not clustered, but the soy leaf without petiole is more related to high concentrations of N (see Figures 1Sc and 2Sc and Table 1). In this case, the strategy used was to calculate calibration models for each type of sample separately.

**3.1 Analysis using LIBS.** After pressing process, the samples were scanned by the laser in the LIBS instrument, obtaining about 300 spectra *per* pellet with 12,288 variables (instrument wavelength range – 186 nm to 1042 nm). The average spectra obtained for the soy crop without and with petiole are very similar and Figure 1 shows a representative spectrum for soy leaves with petiole. Figure 2 shows some fragments of the spectrum with several identified emission lines. It is worth mentioning that the notation “I” and “II” that appear in the emission lines refer to the atomic and ionic emission lines, respectively. It is observed that the average spectrum obtained confirms the expected assumption which is the emission lines of macronutrients (Ca, K and Mg) showed greater intensity and prominence in the spectrum, given that their concentrations are higher when compared to those of micronutrients (see Table 1).

After obtaining the spectra, 12 normalizations were tested. The assessment of the best normalization for each analyte for each type of sample was based on the lowest SEC

for preliminary univariate models. The notable normalization mode for most models was the Euclidean norm<sup>21</sup>. After this evaluation, multivariate calibration models were built using PLS.

No type of sample showed good results in a univariate calibration. Furthermore, none of the micronutrients (B, Cu, Fe, Mn and Zn) showed good results in the multivariate calibration. The high SEC values for these models led the conclusion that they were not appropriate. It is important to emphasize that micronutrient calibration is still a challenge, since factors such as pellet homogeneity, laser/sample interaction, matrix interference and detector sensitivity interfere in obtaining good models. Yet, it was not possible to perform calibrations for the macronutrients N, P and S, given that no satisfactory emission lines were found for these elements. This is due the fact that most of the P and S emission lines are in the initial region (UV) of the detector (186 nm – 300 nm), which makes selection and treatment difficult. In addition, for the analyte B, it was not possible to perform multivariate calibrations, since, of the lines tested, only one was satisfactory.

**3.1 Calibration models proposition.** The macronutrients Ca, K and Mg, on the other hand, presented satisfactory results regarding the multivariate calibrations, making it possible to determine them with reliability in analyzes *via* LIBS with low SEC, SECV and SEV values. Tables 2 and 3 present all data obtained in the multivariate model for Ca, K and Mg in soy leaf crops without and with petiole, respectively. The emission lines (nm) selected for Ca were: 393.366, 396.847, 317.933, 315.887, 422.673, 430.253, 443.496, 445.478, 558.876, 559.447, and 527.027. For K, only two emission lines presented reliable results: 766.490, and 769.896. In the case of Mg the following emission lines were selected: 277.983, 279.078, 279.553, 279.799, 280.270, 285.213, 292.863, 293.651, 383.829, 516.732, 517.268, 518.361, and 552.840.

The results for soy leaves without petiole (Table 2) were presented SEC values for Ca, K and Mg of 2.3, 3.3 and 0.8 g/kg; and in soy leaves with petiole (Table 3), 2.0, 5.0 and

0.6 g/kg, respectively. When comparing with the results obtained by Andrade et al. (2017), for example, whose SECs were 1, 4 and 0.7 g/kg for Ca, K and Mg, respectively, it is observed that the results obtained in this study are in the same order of magnitude.<sup>16</sup> From Tables 2 and 3 it is also possible to observe that the lower concentrations were higher than the errors obtained for the models (SEC, SECV and SEV). The majority of the PLS models explained around 100% of the variance and the number of latent variables varied from 2 to 3 (Mg in soy with petiole, Table 3).

Figures 3 and 4 present plots between the values predicted by the PLS models and those obtained by the reference technique (ICP OES) for Ca, K and Mg in soy crops without (Figure 3) and with petioles (Figure 4). It is observed that there is a good correlation between the predicted and the reference values, evidencing the possibility of using the LIBS technique to determine these analytes concentrations, or its range, in these cultures.

#### **4. CONCLUSION**

With this study, it was possible to conclude that the combination of LIBS with chemometric strategies was an adequate alternative to propose reliable regression models. Using this technique, accurate results were observed for the determination of Ca, K and Mg in soy with and without petiole.

The analysis via LIBS, when compared to those by ICP OES, generates considerable resources savings in the determination of analytes, since using LIBS there is no need to digest the sample via microwave assisted system; no type of gas (Ar or He) is required; and there is no need to transport the sample to an energy source for ionization process, as the plasma is formed on the sample using a focused laser beam.

It was observed that calibration using LIBS is still a challenge for elements whose concentrations are low, in the order of mg/kg. These limitations are observed due to the laser/sample interaction; sample homogeneity; matrix interference; sensitivity, among

others. However, it was deserved that the technique is satisfactory when the analyte concentrations are above of 1 g/kg.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, grants 2019/24223-5 and 2023/03766-6) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 302719/2020-2, and 140867/2021-0). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. The authors are also grateful to the Professional Graduation Program in Chemistry for the support.

## REFERENCES

- (1) CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Boletim Logístico. Brasília, February **2022**, 1-17.
- (2) Hirakuri, M. H.; Lazzarotto, J. J. Evolução e perspectiva de desempenho econômico associados com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro. *Embrapa Soja*, Londrina, **2011**.
- (3) Maathuis, F. J. M. E. A. Plant mineral nutrients: methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ, **2013**.
- (4) Mengel, K.; Kirkby, E.A. Principles of plant nutrition. 5<sup>th</sup> ed, *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers*, **2001**, p. 829.
- (5) Krug, F. J.; Rocha, F. R. P. Métodos de preparo de amostras para análise elementar. 2<sup>a</sup>. Ed, *São Paulo: Sociedade Brasileira de Química*. **2019**.
- (6) Meyers, R.A. Encyclopedia of Analytical Chemistry. *Ed. Chichester: Wiley*. **2011**, p. 2188.
- (7) Costa, V. C.; Augusto, A. S.; Castro, J. P.; Machado, R. C.; Andrade, D. F.; Babos, D. V.; Sperança, M. A.; Gamela, R. R.; Pereira-Filho, E. R. LASER INDUCED-BREAKDOWN SPECTROSCOPY (LIBS): Histórico, Fundamentos, Aplicações e Potencialidades. *Quim. Nova*. **2019**, 42, 527-545.

- (8) Sun Q.; M. Tran; 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. *Canadian J. Anal. Sci. Spectrosc.* **1999**, 44, 164–170.
- (9) Trevizan, L.C.; Santos Jr, D.; Sama, R. E.; Vieira Jr, 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**. **2008**, 1151–1158.
- (10) Andrade, D. F.; Pereira-Filho, E. R. Direct Determination of Contaminants and Major and Minor Nutrients in Solid Fertilizers Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). *J. Agric. Food Chem.* **2016**, 64, 7890–7898
- (11) Gomes, M. S.; Santos Junior, D.; Nunes, L. C.; Carvalho, G. G. A.; Leme, F. O.; Krug, F. J. Evaluation of grinding methods for pellets preparation aiming at the analysis of plant materials by laser induced breakdown spectrometry. *Talanta*. **2011**, 85, 1744–1750
- (12) Gomes, M. S.; Schenk, E. R.; Santos Jr, D.; Krug, F. J.; Almirall J. R. Laser ablation inductively coupled plasma optical emission spectrometry for analysis of pellets of plant materials. *Spectrochim. Acta Part B*. **2014**, 94–95, 27–33
- (13) 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*. **2010**, 65, 66-74.
- (14) Nunes, L. C.; Braga, J. W. B.; Trevizan, L. C.; Souza, P. F.; Carvalho, G. G. A.; Júnior, D. S.; Poppi, R. J.; Krug, F. J. Optimization and validation of a LIBS method for the Determination of Macro and Micronutrients in Sugar Cane Leaves. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, 25, 1453-1460.
- (15) Kim, G.; Kwak, J.; Choi, J.; Park, K. Detection of Nutrient Elements and Contamination by Pesticides in Spinach and Rice Samples Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 3, 718–724.
- (16) Andrade, D.F.; Pereira-Filho, E.R.; Konieczynski, P. Comparison of ICP OES and LIBS Analysis of Medicinal Herbs Rich in Flavonoids from Eastern Europe. *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**, 28, 838-847.
- (17) Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P. Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. **1987**, 2, 37-52.
- (18) Wold, S.; Sjostrom, M.; Eriksson, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. **2001**, 58, 109-130.



- (19) Castro, J. P.; Pereira-Filho, E. R. Twelve different types of data normalization for the proposition of classification, univariate and multivariate regression models for the direct analyses of alloys by Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). *J. Anal. At. Spectrom.* **2016**, 31, 2005-2014.
- (20) Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): aplicações e estratégias de calibração = Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): applications and calibration strategies [ebook] / organized by Edenir Rodrigues Pereira Filho. Bauru, SP : *Editores Iberoamericana de Educação*, **2021**. <https://doi.org/10.47519/EIE.978-65-86839-05-0>
- (21) Galbács, G. Laser-induced breakdown spectroscopy in biological, forensic and materials sciences. *Berlin: Springer*. **2022**. DOI: 10.1007/978-3-031-14502-5.
- (22) National Institute of Standards and Technology (NIST). NIST atomic spectra database lines form; available at [http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines\\_form.html](http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html) (accessed May 12, 2023).

**Table 1. Concentration range, average, and standard deviation (SD) of the analytes determined in the samples selected for this study.**

Results for soy without petiole (n = 923)											
Parameter	Analytes (g/kg)						Analytes (mg/kg)				
	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
Range	27.0 – 70.5	1.8 – 7.8	2.5 – 41.1	5.8 – 26.6	1.7 – 9.9	1.2 – 6.8	20.2 – 138.6	1.0 – 110.7	50.2 – 4668.4	8.5 – 477.4	12.6 – 135.7
Average	54.0	3.7	16.8	10.6	4.3	2.9	48.1	8.6	137.5	70.9	44.4
SD	8.2	0.8	4.7	3.1	1.2	0.5	12.7	6.2	187.0	47.6	17.5
Results for soy with petiole (n = 1,780)											
Parameter	Analytes (g/kg)						Analytes (mg/kg)				
	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
Range	23.0 – 71.1	1.3 – 6.1	6.6 – 42.4	4.6 – 24.5	1.6 – 8.2	1.5 – 4.3	13.1 – 281.4	0.8 – 415.6	48.5 – 780.9	15.7 – 1093.6	6.2 – 175.6
Average	48.0	3.6	24.2	10.2	4.3	2.7	58.6	10.8	109.6	65.2	44.4
SD	6.8	0.6	5.8	2.4	0.8	0.4	17.9	25.6	51.3	64.3	14.8

**Table 2. Summary of data obtained for univariate and multivariate models for soy crop without petiole.**

Results for soy without petiole			
	Analytes (g/kg)		
	Ca	K	Mg
Latent Variables	2	2	2
% accumulated variance	89.7	100	90
SEC	2.3	3.3	0.8
SECV	2.3	3.4	0.8
SEV	2.8	3.1	0.8
Lowest Concentration	5.8	2.5	1.7
Emission lines selected	10 lines	2 lines	12 lines
Samples for calibration	245	245	245
Samples for validation	60	60	60

**Table 3. Summary of data obtained for univariate and multivariate models for soy crop with petiole.**

Results for soy with petiole			
	Analytes (g/kg)		
	Ca	K	Mg
Latent Variables	2	2	3
% accumulated	84	85	91.5
SEC	2.0	5.0	0.6
SECV	2.0	5.2	0.6
SEV	2.0	5.3	0.7
SEP	2.0	4.8	0.7
Lowest Concentration	4.6	6.6	1.6
Emission lines selected	10 lines	2 lines	13 lines
Samples for calibration	473	473	473
Samples for validation	59	59	59
Samples for forecasting	59	59	59

## Caption for Figures

**Figure 1.** Average emission spectrum obtained using LIBS for soy with petiole crop.

**Figure 2.** Soy with petiole representative spectra fragments: (a) from 186 to 400 nm, (b) from 400 to 600 nm, and (c) from 600 to 800 nm.

**Figure 3.** Reference (measured) and predicted values (multivariate) for Ca (a), K (b) and Mg (c) in soy without petiole.

**Figure 4.** Reference (measured) and predicted values (multivariate) for Ca (a), K (b) and Mg (c) in soy with petiole.

Figure 1

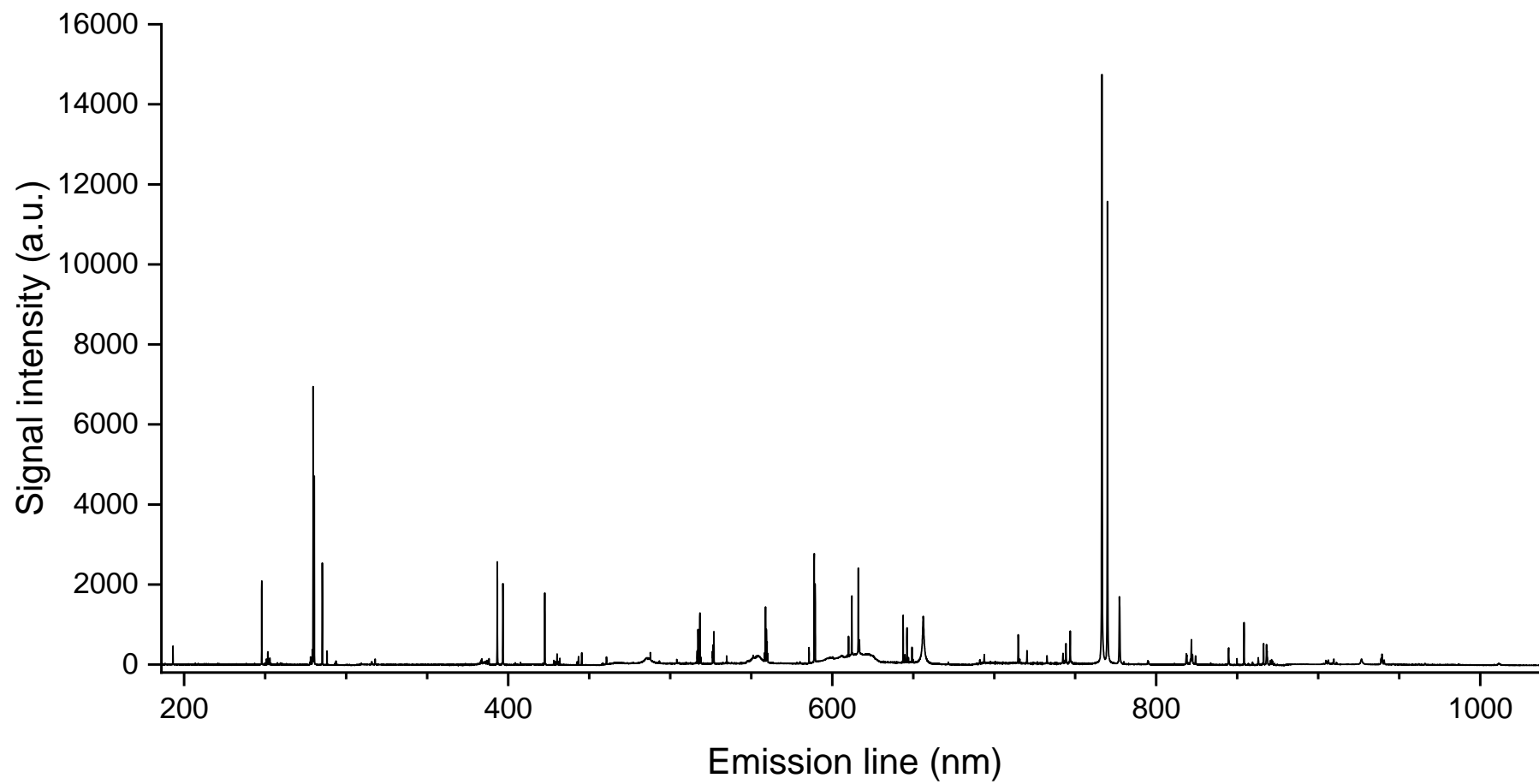


Figure 2a

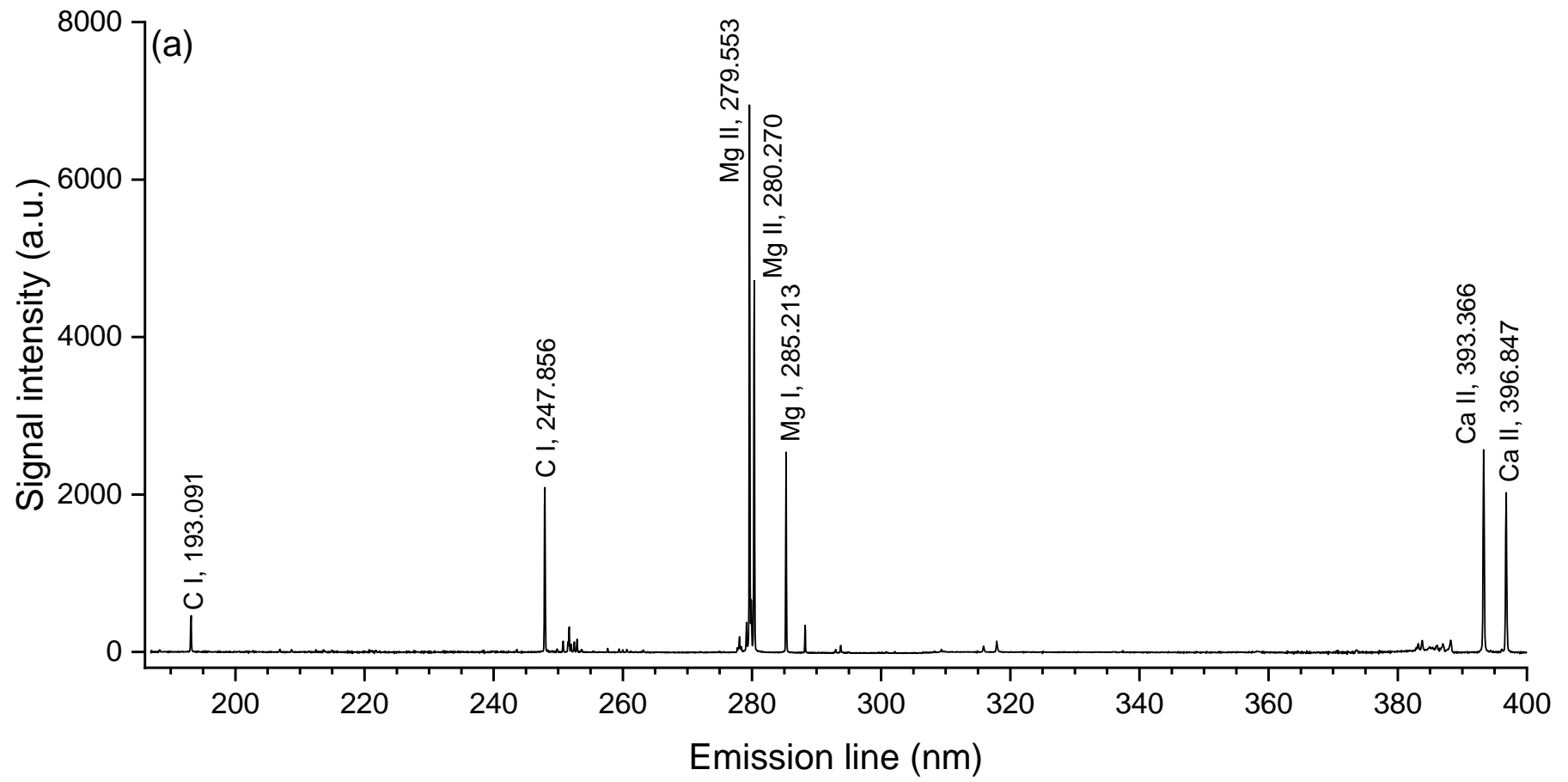


Figure 2b

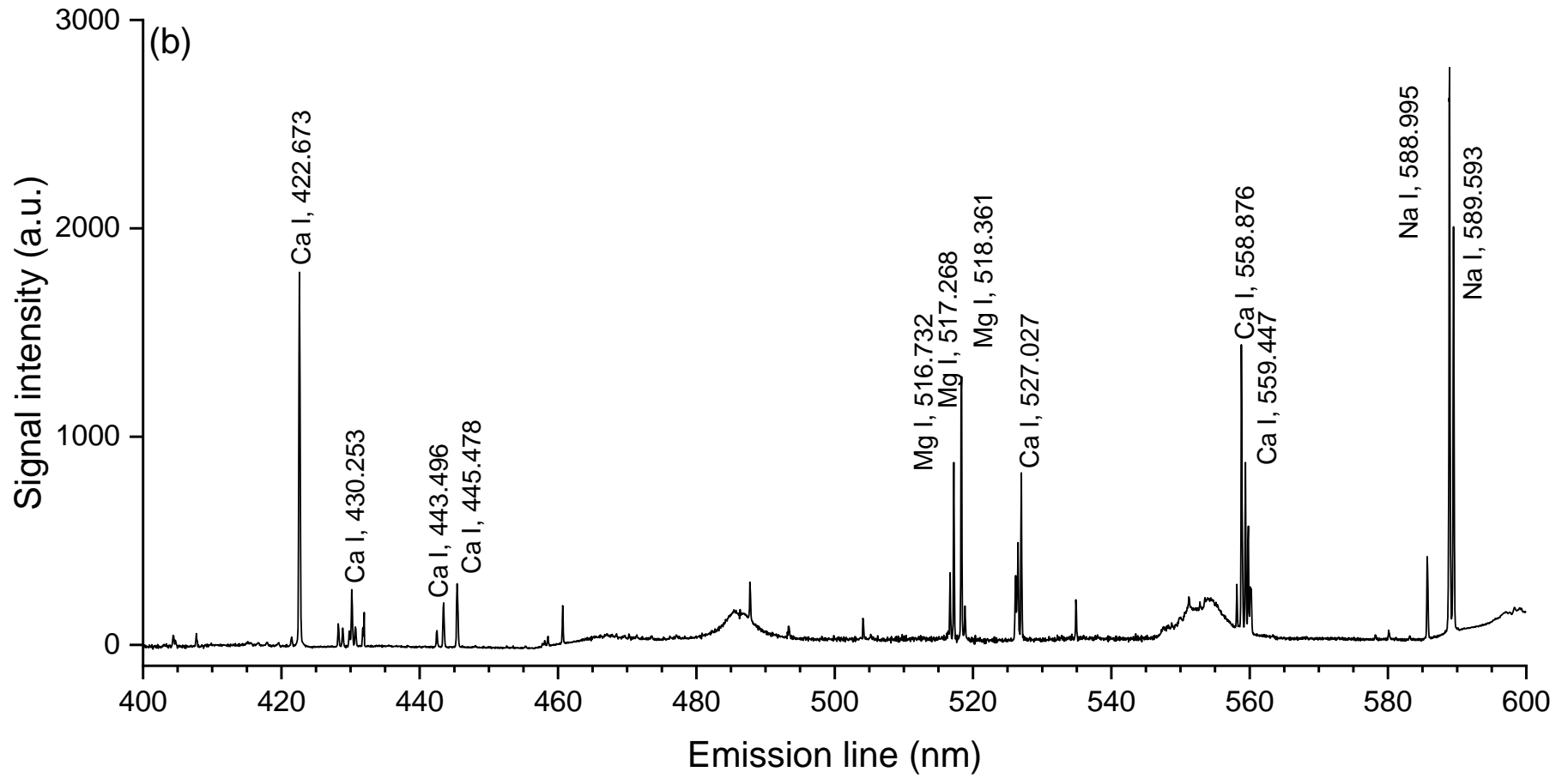




Figure 2c

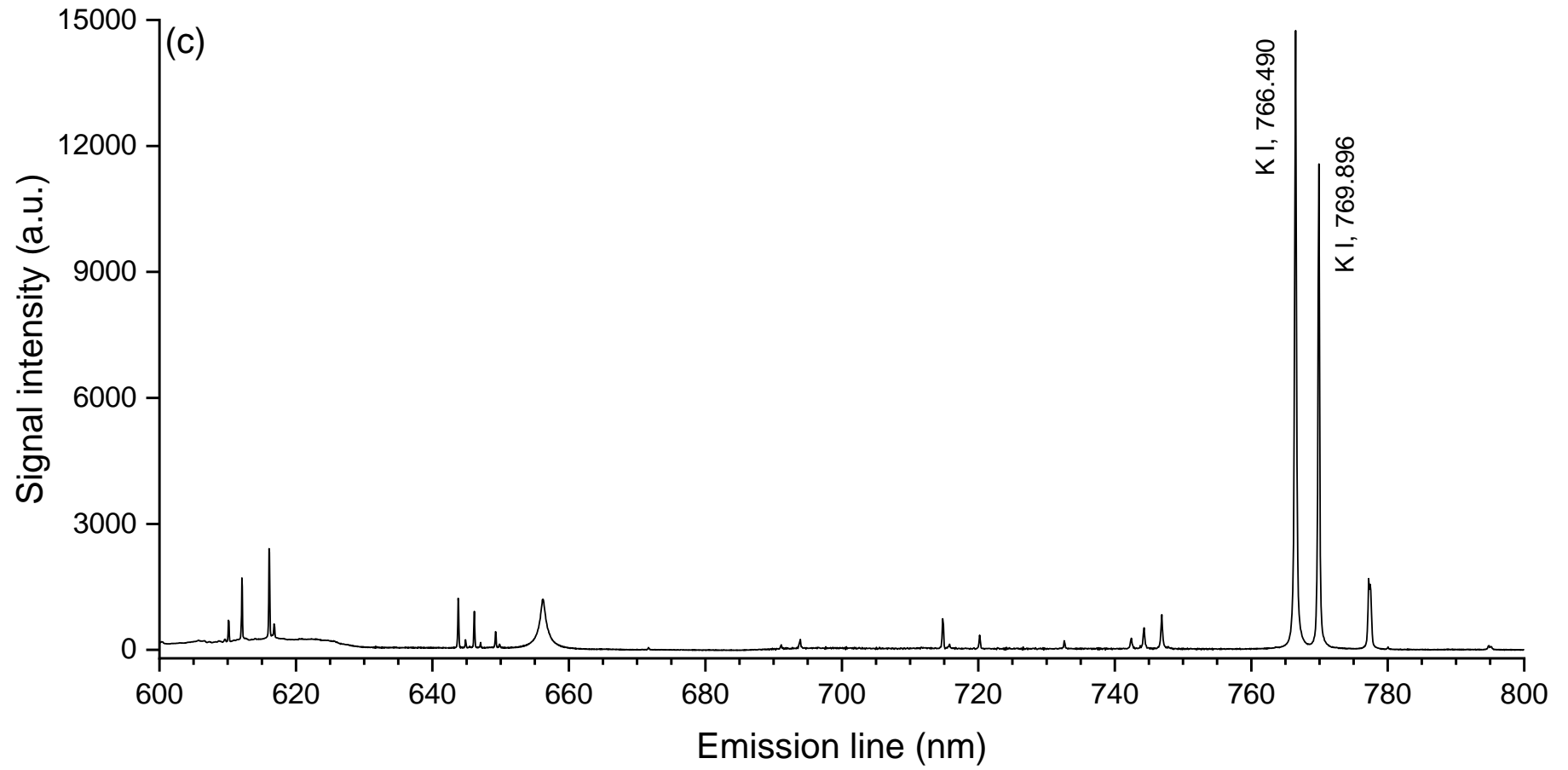


Figure 3a

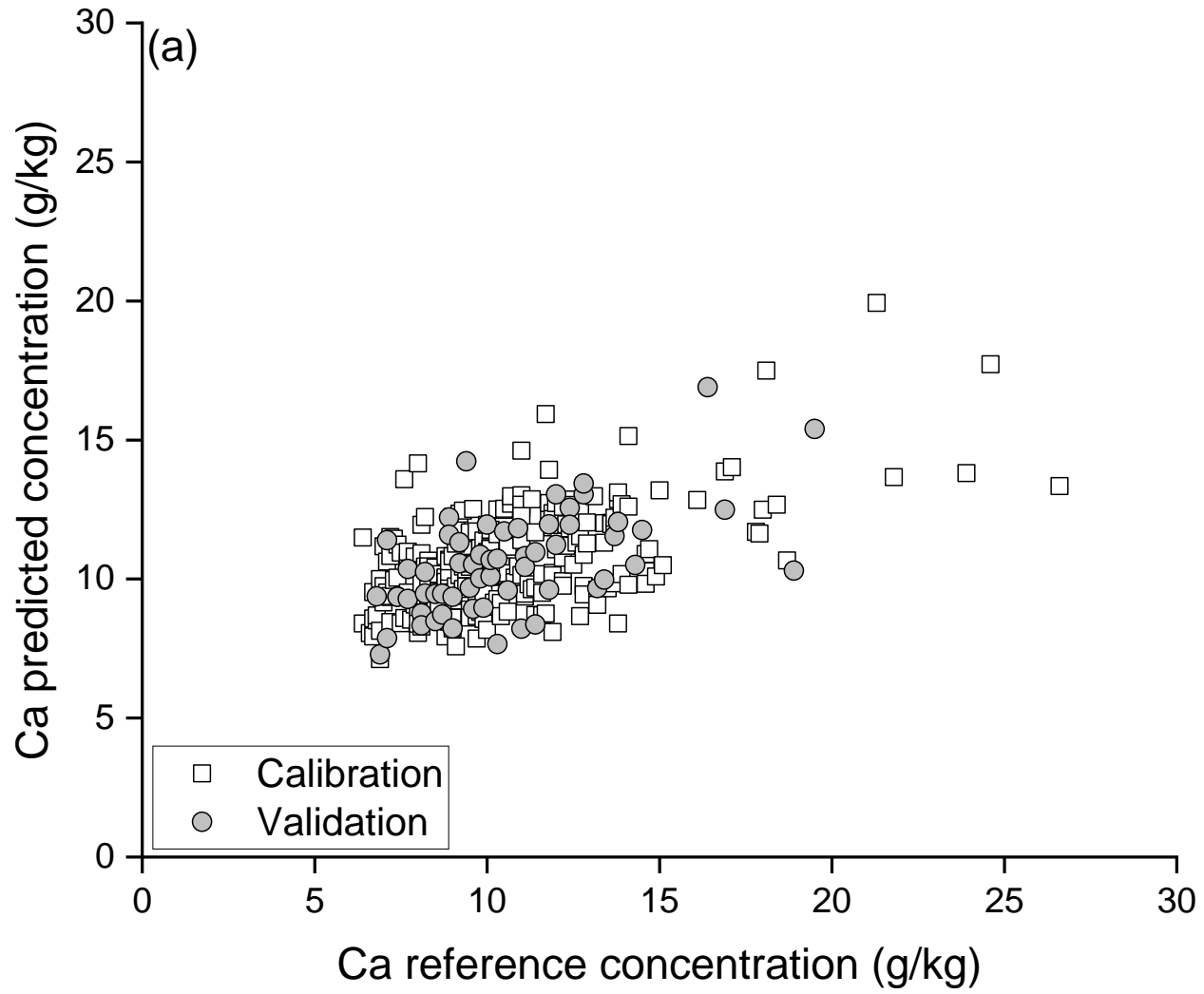


Figure 3b

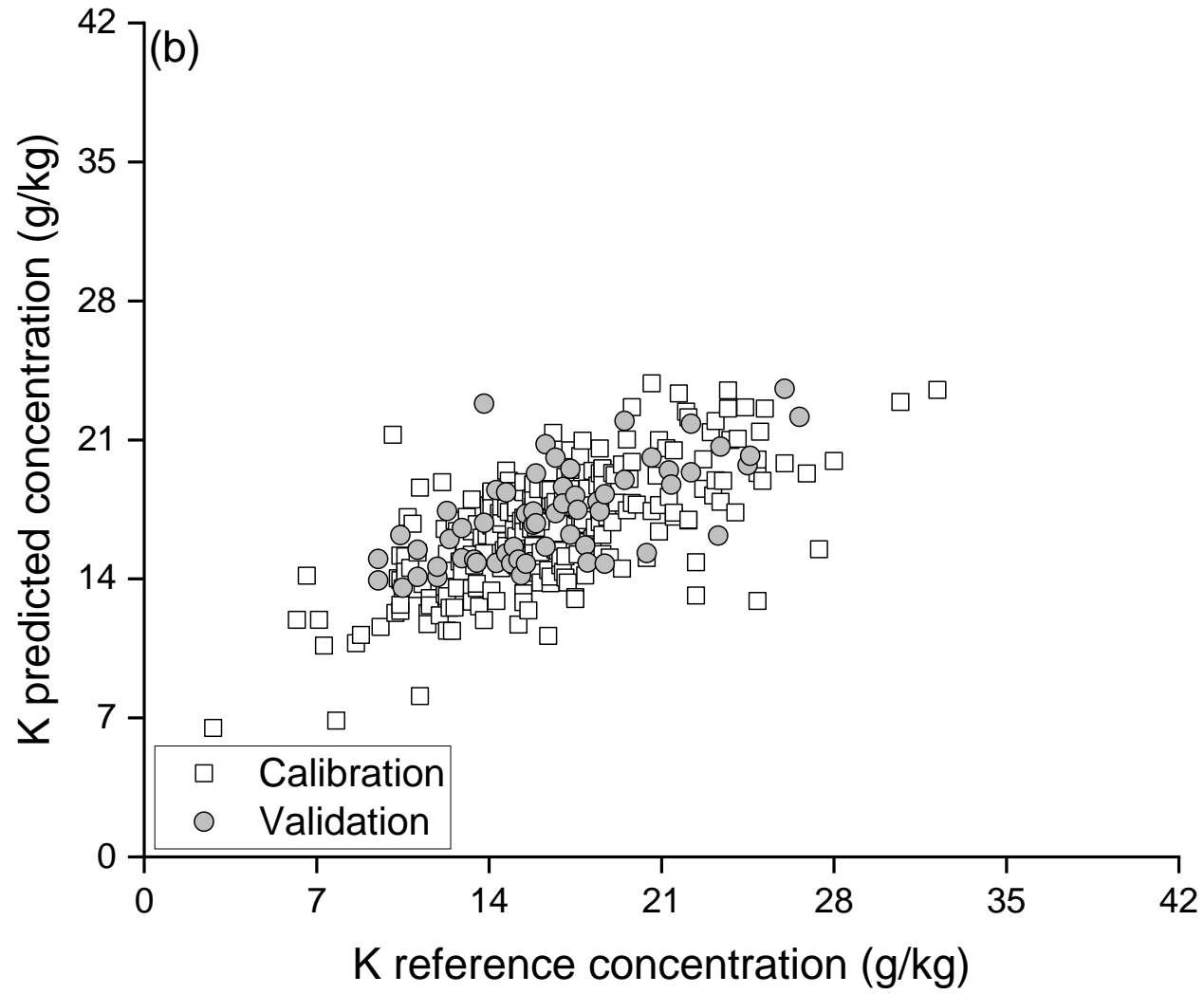


Figure 3c

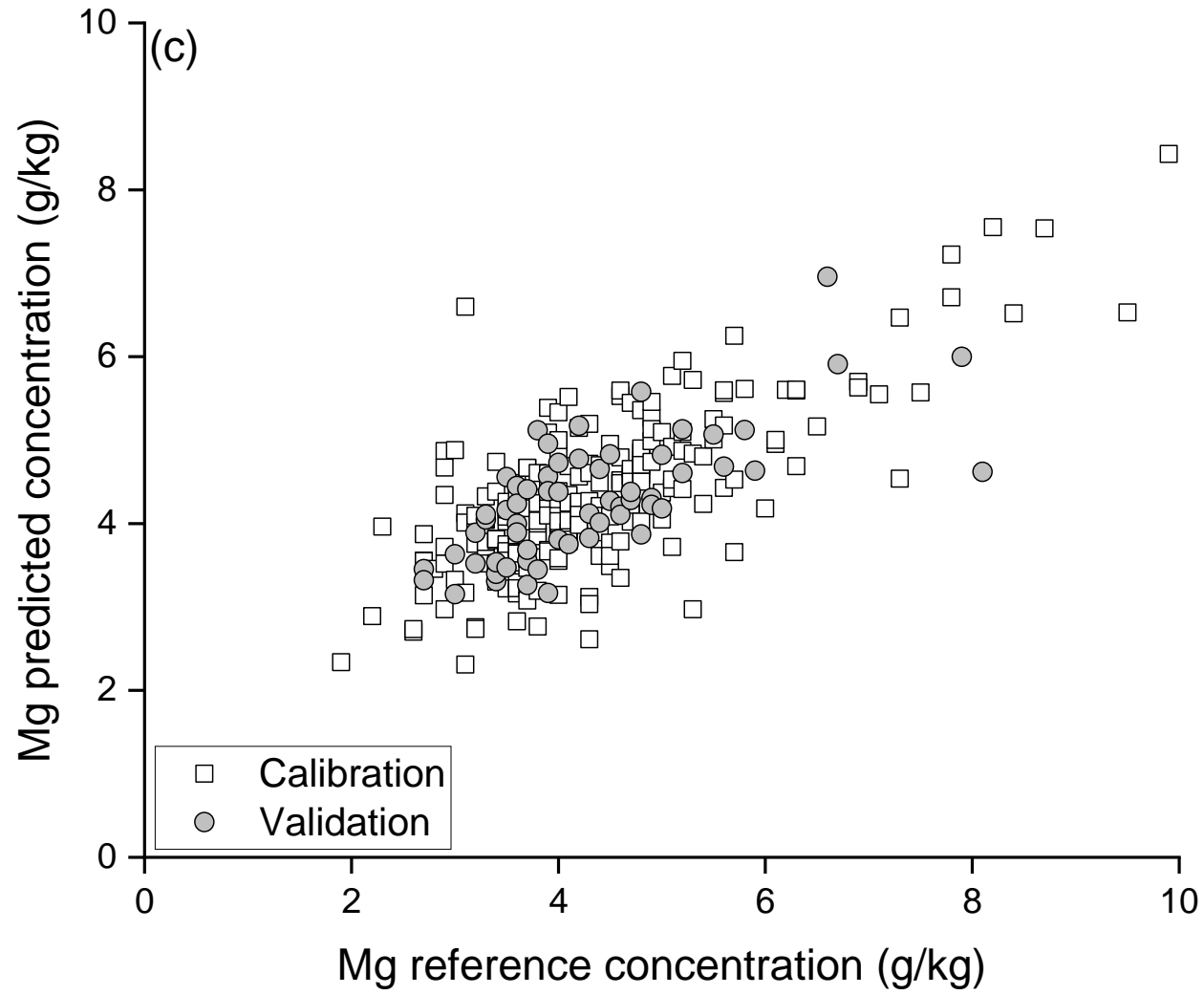


Figure 4a

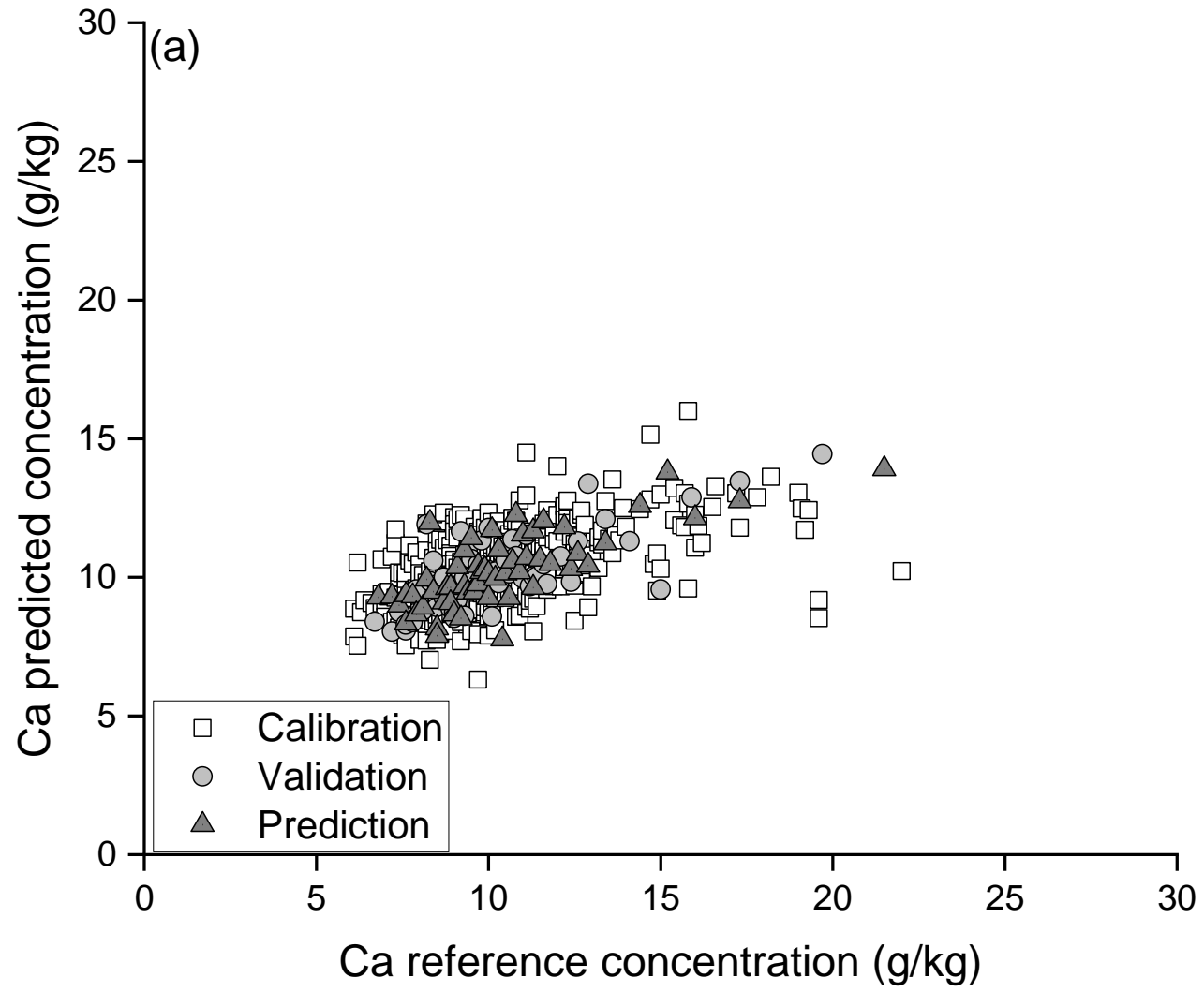


Figure 4b

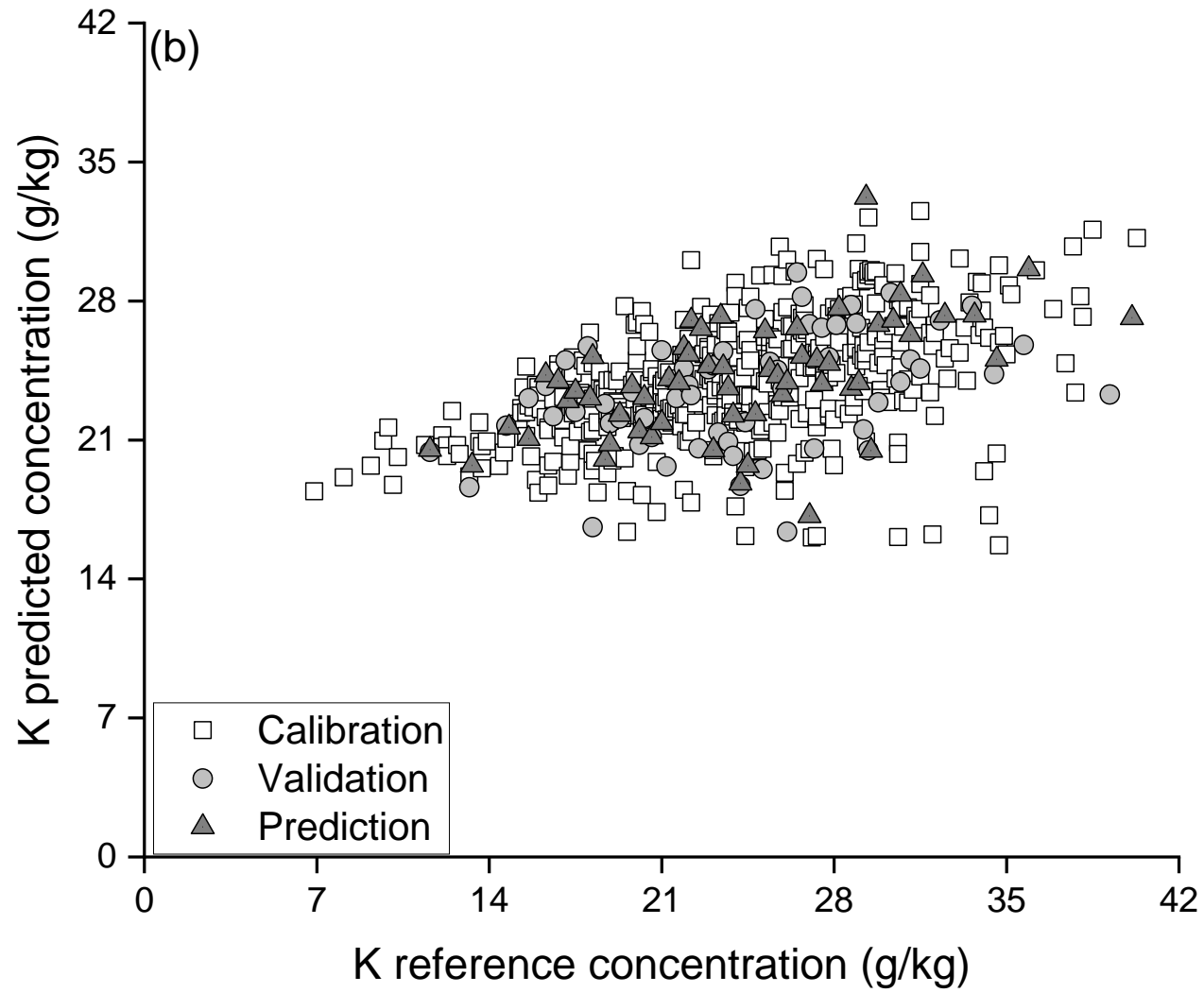


Figure 4c

