

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

**“EMPREGO DE TÉCNICAS ESPECTROANALÍTICAS PARA
A ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SOLOS E DE
COPRÓLITOS: ANÁLISE DE TEXTURA E
EXPLORATÓRIA”**

Marco Aurélio Sperança*

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

Orientador: Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho

*** bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S749e Sperança, Marco Aurélio
Emprego de técnicas espectroanalíticas para a
análise de amostras de solos e de coprólitos :
análise de textura e exploratória / Marco Aurélio
Sperança. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
66 p.

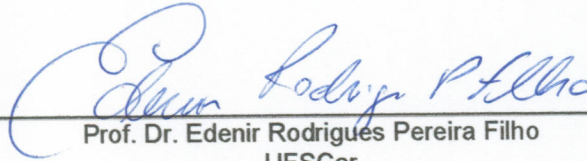
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2015.

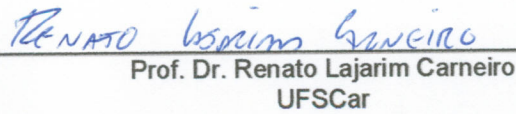
1. Coprólitos. 2. Solos. 3. Quimiometria. I. Título.

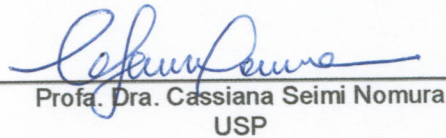


Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Marco Aurelio Sperança, realizada em 21/08/2015:


Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho
UFSCar


Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro
UFSCar


Prof.ª. Dra. Cassiana Seimi Nomura
USP

“Se tens dificuldade em cumprir um intento, não penses logo que seja impossível para o homem; pensa quanto é possível e natural para ele, e que também pode ser alcançado por ti.”
Imperador Marco Aurélio

“Tudo posso naquele que me fortalece”
Filipenses 4:13

**Dedico este trabalho principalmente
aos meus pais, José Maria e Nelcy,
e à minha esposa, Gabriela.**

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por tudo que tem feito em minha vida. Toda provisão, saúde e discernimento que tenho devo à Ele.

À minha esposa Gabriela, por todo amor, paciência e dedicação nestes 7 anos em minha vida, por estar comigo nos momentos mais difíceis e naqueles de maior alegria.

Aos meus pais, José Maria e Nelcy, por toda educação e aprendizado, aprendizado este que não se aprende na escola. Sempre me espelhei em meu pai e tive minha mãe como exemplo de amor incondicional.

Aos meus irmãos Hugo Leonardo e Ana Carolina que, por serem mais velhos, sempre cuidaram bem de mim e sempre me aconselharam.

Ao professor Edenir, orientador e amigo que, durante este tempo, além da orientação, deu-me conselhos e transmitiu muita experiência.

Aos professores Joaquim e Ana Rita, pelas colaborações informais em nossas reuniões de grupo. Também ao professor Renato, pela grande contribuição.

Aos professores Marcelo e Alejandro, que contribuíram grandemente para o trabalho fornecendo, além das amostras, muito conhecimento na parte paleontológica.

Ao pesquisador Gilberto, pela co-orientação no desenvolvimento deste trabalho, e ao técnico Marcos Rogério, pela amizade de anos, desde a minha iniciação científica até o presente momento.

Ao Wendel pela amizade, ajuda durante todo o trabalho e pelos momentos descontraídos.

A todos os colegas do GAIA, que sempre procuram ajudar o próximo e também a meus colegas de graduação, Pedro, Laís, Alany, Mariana, Natália.

À UFSCar, pelo espaço e pela formação como químico e agora como mestre, ao DQ (Departamento de Química) pela estrutura fornecida, ao PPGQ (Programa de Pós-Graduação em Química) pela ajuda burocrática e financeira, e à Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), pelo espaço cedido.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal no Ensino Superior), pela bolsa de estudos durante todo o trabalho.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o trabalho.

OBRIGADO!

LISTA DE ACRÔNIMOS

BG – Bergamo
CA – Califórnia
CCD – *Charge-Coupled Device*
CMOS – *Complementary Metal-Oxide-Semiconductor*
DNA - *Deoxyribonucleic Acid*
DRIFTS – *Diffuse Reflectance Fourier Transformed Spectroscopy*
Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA – Estados Unidos da América
FAAS – *Flame Atomic Absorption Spectrometry*
GFAAS – *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*
HEPA – *High Efficiency Particulate Air*
IAC – Instituto Agrônomo de Campinas
ICP OES – *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*
ICP-MS – *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*
KNN – *k-Nearest Neighbor*
LA – *Laser Ablation*
LIBS – *Laser-induced breakdown spectroscopy*
LOD – *Limit of Detection*
MA – Massachusetts
NIRS – *Near-infrared spectroscopy*
PCA – *Principal Component Analysis*
PLS – *Partial Least Square*
PLS-DA – *Partial Least Square – Discriminant Analysis*
RJ – Rio de Janeiro
SIMCA – *Soft Independent Modeling of Class Analogy*
SP – São Paulo
USP – Universidade de São Paulo
UV – Ultravioleta
WA - Washington
WI – Wisconsin

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.4.1.1 - Amostras de coprólitos utilizadas no trabalho.....	10
TABELA 1.4.1.2 - Amostras de coprólitos utilizadas no trabalho, um fóssil e seus períodos e locais de coleta (continuação).....	11
TABELA 1.4.1.3 - Amostras de coprólitos utilizadas no trabalho, um fóssil e seus períodos e locais de coleta (continuação).....	12
TABELA 1.4.3.1 - Programa de aquecimento da digestão assistida por micro-ondas para a amostra de coprólito e de rocha.	13
TABELA 1.5.1.1 - Planejamento fatorial completo 2 ³ das condições operacionais do LIBS, visando à melhor condição de análise: maior intensidade até 60.000 unidades.....	15
TABELA 1.5.2.1 - Matrizes de dados e suas respectivas áreas.	17
TABELA 1.5.2.2 - Elementos estudados, linhas de emissão atômica (I) e iônica (II), e suas respectivas intensidades relativas obtidas no Aurora, software do fabricante.	18
TABELA 1.5.3.1 - Elementos estudados e suas respectivas linhas de emissão atômica (I) e iônica (II).	20
TABELA 1.5.3.2 - Concentração dos elementos estudados e seus respectivos desvios padrões para rocha e coprólito, analisados separadamente.....	21
TABELA 2.4.1.1 - Número de amostras cedidas ao trabalho por instituição de origem.	38
TABELA 2.4.1.2 - Número de amostra por classe textural	38
TABELA 2.5.1.1 - Resultado para o modelo de classificação KNN com 4 vizinhos mais próximos.....	43
TABELA 2.5.1.2 - Resultado para o modelo de classificação SIMCA.	44
TABELA 2.5.1.3 - Resultados para o 2 ^o modelo de classificação KNN com 4 vizinhos mais próximos.	45
TABELA 2.5.1.4 - Resultados para o 2 ^o modelo de classificação SIMCA.	46
TABELA 2.5.1.5 - Predições das amostras usada na criação do modelo e também das amostras do conjunto de validação para o modelo KNN.....	50
TABELA 2.5.1.6 - Figuras de mérito calculadas para o modelo KNN de classificação mostrado na tabela anterior.....	50
TABELA 2.5.1.7 - Predições das amostras usada na criação do modelo e também das amostras do conjunto de validação para o modelo SIMCA.....	51

TABELA 2.5.1.8 - Figuras de mérito calculadas para o modelo SIMCA de classificação mostrado na tabela anterior.....	51
TABELA 2.5.1.9 - Matriz de confusão e figuras de mérito para modelo KNN calculado com amostras do conjunto de calibração apenas com os intervalos 2 e 5 do espectro, sem pré-tratamento, com 4 vizinhos.	53
TABELA 2.5.1.10 - Matriz de confusão e figuras de mérito para modelo SIMCA calculado com amostras do conjunto de calibração apenas com os intervalos 2 e 5 do espectro, sem pré-tratamento.	53
TABELA 2.5.1.11 - Matriz de confusão e figuras de mérito para modelo KNN calculado com amostras do conjunto de calibração apenas com a parte 2 e 5 do espectro, com 1ª derivada e normalização, com 4 vizinhos.....	54
TABELA 2.5.1.12 - Matriz de confusão e figuras de mérito para modelo SIMCA calculado com amostras do conjunto de calibração apenas com a parte 2 e 5 do espectro, com 1ª derivada e normalização.	54
TABELA 2.5.1.13 - Matriz de confusão e figuras de mérito para as predições do modelo KNN apenas com os intervalos 2 e 5 do espectro, sem pré-tratamento, com 4 vizinhos.	55
TABELA 2.5.1.14 - Matriz de confusão e figuras de mérito para as predições do modelo SIMCA apenas com os intervalos 2 e 5 do espectro, sem pré-tratamento.....	55
TABELA 2.5.1.15 - Matriz de confusão e figuras de mérito para as predições do modelo KNN apenas com os intervalos 2 e 5 do espectro, com 1ª derivada e normalização, com 4 vizinhos.	55
TABELA 2.5.1.16 - Matriz de confusão e figuras de mérito para as predições do modelo SIMCA apenas com os intervalos 2 e 5 do espectro, com 1ª derivada e normalização.	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.2.1 - Número de publicações por ano utilizando a palavra-chave <i>coprolites</i> na principal coleção do <i>Web of Science</i>	4
FIGURA 1.2.2 - Número de publicações por ano utilizando as palavras-chave LIBS e <i>archaeological</i> na principal coleção do <i>Web of Science</i>	6
FIGURA 1.5.2.1 - Escores correspondentes à PCA realizada com as médias dos espectros coletados por camada apenas para os coprólitos.....	19
FIGURA 1.5.2.2 - <i>Loadings</i> correspondentes à PCA realizada com as médias dos espectros coletados por camada apenas para os coprólitos.....	19
FIGURA 1.5.3.1 - (a) Digestão no coprólito. (b) Digestão na rocha. É possível visualizar um corpo de fundo em (b), referente aos silicatos insolúveis.....	22
FIGURA 1.5.4.1 - Criação da imagem hiperespectral.	23
FIGURA 1.5.4.2 - Variação dos pulsos de 1 a 10 para o coprólito do período Permiano.	24
FIGURA 1.5.4.3 - Imagem real do coprólito do período Oligo-Mioceno acompanhada dos mapas de escores da PC1, PC2 e PC3 para o pulso 2 e seus respectivos <i>loadings</i>	26
FIGURA 1.5.4.4 - Imagem real do fóssil do período Permiano acompanhada dos mapas de escores da PC1, PC2 e PC3 para o pulso 2 e seus respectivos <i>loadings</i>	28
FIGURA 1.5.4.5 - Imagem real do coprólito do período Permiano acompanhada dos mapas de escores da PC1, PC2 e PC3 para o pulso 2 e seus respectivos <i>loadings</i>	29
FIGURA 1.5.4.6 - Imagem real do coprólito do período Permiano acompanhada dos mapas de escores da PC1, PC2 e PC3 para o pulso 2 e seus respectivos <i>loadings</i>	30
FIGURA 2.2.1 - Número de publicações por ano com as palavras-chave <i>near-infrared spectroscopy</i> e <i>NIRS</i>	34
FIGURA 2.2.2 - Número de publicações por ano com as palavras-chave <i>near-infrared spectroscopy</i> , <i>NIRS</i> e <i>soils</i>	35
FIGURA 2.4.3.1 - Resultado final do preparo das amostras de solo por encapsulamento em polímero para análise em LIBS.	40
FIGURA 2.5.1.1 - Espectro de infravermelho próximo para algumas amostras de solo.	41

FIGURA 2.5.1.2 - Gráfico de escores (PC1xPC2). Círculos compreendem amostras apenas de USP - Pirassununga enquanto que os quadrados representam amostras das outras instituições.....	42
FIGURA 2.5.1.3 - Região do gráfico ternário referente à classe arenosa.	45
FIGURA 2.5.1.4 - Exatidão, sensibilidade, taxa de falso positivo e especificidade calculadas para os modelos KNN e SIMCA, antes e depois da seleção de amostras. ...	47
FIGURA 2.5.1.5 - Cada combinação possível com as 5 partes do espectro com sua respectiva exatidão.	48
FIGURA 2.5.1.6 - (a) Triângulo das classes texturais com as 5 principais classes delimitadas (adaptado de referência 26) e (b) gráfico ternário com todas as amostras plotadas. Os símbolos preenchidos representam a média para a classe.	49
FIGURA 2.5.3.1 - Imagens hiperespectrais de solos. (a) arenosa, (b) argilosa, (c) muito argilosa e (d) média. Todas as imagens estão na mesma escala e são para a PC1 do pulso 2.....	58

RESUMO

EMPREGO DE TÉCNICAS ESPECTROANALÍTICAS PARA A ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SOLOS E DE COPRÓLITOS: ANÁLISE TEXTURIAL E EXPLORATÓRIA. No presente trabalho, amostras de coprólitos (fezes fossilizadas) foram submetidas à análise em LIBS (*Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*) para avaliar o perfil químico destas amostras através de imagens hiperespectrais, que nos possibilitam avaliar a diferença de concentração de vários elementos em apenas uma imagem. Uma destas amostras foi submetida à análise por ICP OES (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*) separadamente (rocha e coprólito), para avaliar a concentração real de cada elemento em cada uma das matrizes. Através dos resultados de ambas as técnicas foi possível inferir características da dieta dos animais que geraram os coprólitos cujas amostras correspondem aos períodos Oligo-Mioceno, Cretáceo e Permiano (28, 85 e 260 milhões de anos, respectivamente). Amostras de coprólitos apresentaram correlação positiva entre os elementos Ca e P, o que indica a presença de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, composto geralmente presente em resíduos de animais carnívoros. Já nas amostras de rocha, os elementos predominantes foram Al, K, Na e Si. Através de uma análise de PCA (*Principal Component Analysis*), identificou-se que os elementos que caracterizavam as amostras mudavam conforme a Era. Através da análise do gráfico de escores, foi possível identificar os agrupamentos das amostras em ordem cronológica. As amostras de solos foram submetidas à análise por NIRS (*Near-Infrared Spectroscopy*) na tentativa de criar modelos de classificação para textura do solo, que é caracterizada pelas frações de areia, argila e silte do solo. Estes, por sua vez, são diferenciados pelo tamanho de partícula. Várias estratégias foram adotadas na tentativa de se melhorar os modelos criados e várias ferramentas quimiométricas foram utilizadas, como SIMCA, KNN e PLS-DA para classificação, obtendo-se resultados satisfatórios com exatidão de 83 a 100% para o conjunto de calibração. PLS para quantificação dos teores também foi testada, porém sem sucesso. As amostras foram submetidas também à análise por LIBS e uma estratégia de encapsulamento do solo com um polímero foi testada, também sem sucesso, visto que o LIBS gera o perfil espectral de elementos e não diferencia tamanho de partícula.

ABSTRACT

USE OF SPECTROANALYTICAL TECHNIQUES FOR THE ANALYSIS OF SOIL SAMPLES AND COPROLITES: TEXTURAL AND EXPLORATORY ANALYSIS. In this study, samples of coprolites (fossilized feces) were analyzed in LIBS (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy) to evaluate the chemical profile in these samples using hyperspectral images, which enable us to assess the different concentration of several elements in the same image. One of these samples was submitted to analysis by ICP OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy) separately (rock and coprolites) to assess the actual concentration of each element in both of the arrays. Through the results of both techniques, it was possible to infer the diet of animals that generated the coprolites. The samples correspond to the Oligo-Miocene, Cretaceous, and Permian periods (28, 85 and 260 million years, respectively). Coprolites samples showed positive correlation between the Ca and P elements, indicating the presence of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, compound generally present in carnivorous animal waste. In rock samples, the predominant elements were Al, K, Na and Si. Through a PCA analysis (Principal Component Analysis), it was found that the elements that characterized the samples changed as the age. Through scores graph analysis, it is possible to identify groups of samples in chronological order. The soil samples were analyzed by NIRS (Near-Infrared Spectroscopy) in an attempt to create classification models for soil texture, which is characterized by sand fractions, clay and silt soil. These are differentiated by particle size. Various strategies have been adopted in an attempt to improve the created models and several chemometric tools were utilized, such as SIMCA, KNN and PLS-DA for classification, giving satisfactory results as accuracy 83-100% for the calibration set. PLS to quantify the levels was also tested, but without success. The samples were also subjected to analysis by LIBS and soil encapsulation strategy with a polymer was tested, also without success, since the LIBS generates the spectral profile elements and does not distinguish particle size.

SUMÁRIO

1 – Capítulo 1 – Coprólitos	2
1.1 – Introdução.....	2
1.2 – Revisão Bibliográfica	4
1.3 – Objetivos.....	8
1.4 – Material e Métodos	9
1.4.1 – Amostras.....	9
1.4.2 – Reagentes.....	12
1.4.3 – Preparo de Amostra	13
1.4.4 – Equipamentos	13
1.5 – Resultados e Discussão	15
1.5.1 – Condições LIBS	15
1.5.2 – Análises LIBS.....	16
1.5.3 – Análises ICP OES	20
1.5.4 – Imagens hiperespectrais	22
1.6 – Conclusões Parciais	31
2 – Capítulo 2 – Solos	33
2.1 – Introdução.....	33

2.2 – Revisão Bibliográfica	34
2.3 – Objetivos.....	37
2.4 – Materiais e Métodos.....	38
2.4.1 – Amostras.....	38
2.4.2 – Reagentes.....	39
2.4.3 – Preparo de Amostra	39
2.4.4 – Equipamentos	40
2.5 – Resultados e Discussão	41
2.5.1 – Análises NIRS.....	41
2.5.2 – Análises LIBS.....	56
2.5.3 – Imagens hiperespectrais	57
2.6 – Conclusões Parciais	59
3 – Conclusões Finais.....	61
4 – Sugestões para Trabalhos Futuros.....	63
Referências Bibliográficas.....	65

Capítulo 1

Coprólitos

1 – Capítulo 1 – Coprólitos

1.1 – Introdução

O avanço da tecnologia permitiu o desenvolvimento da técnica espectroscopia de emissão induzida por laser, LIBS (*Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*), que possui como algumas características alta frequência de amostragem e análises isentas ou com mínimo preparo de amostras. A LIBS tem se configurado como uma técnica que possibilita o oferecimento de métodos de análise rápida e eficiente, permitindo a utilização de amostras na forma sólida. Essa técnica consiste em pulsos de laser de alta potência concentrado em um alvo muito pequeno na amostra. Na maioria das vezes, a amostra pode ser utilizada na forma sólida, possibilitando a ablação da superfície, seguida da vaporização e, finalmente, a geração do plasma. Posteriormente, um espectrômetro apropriado procede a aquisição dos sinais de emissão provenientes do relaxamento dos átomos e íons no plasma. Esses sinais de emissão correspondem à faixa do ultravioleta (UV) até o início do infravermelho próximo (NIR) do espectro¹.

A LIBS reduz, quase que por completo, o uso de reagentes e o tempo que seria empregado no preparo de amostra. Desta forma, no que se refere ao preparo de amostras, a LIBS apresenta superioridade quando comparada com, por exemplo, à FAAS (*Flame Atomic Absorption Spectrometry*), à GFAAS (*Graphite Furnace AAS*) e às técnicas baseadas em plasma acoplado indutivamente: ICP OES (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) e ICP-MS (*ICP – Mass Spectrometry*). Com algumas destas técnicas citadas, é possível análises sem preparo de amostra, como no caso do LA-ICP OES/-MS (*Laser Ablation – ICP OES/-MS*), porém a LIBS também apresenta a possibilidade de miniaturização, ou seja, equipamentos portáteis, o que significa um grande avanço no que se refere às análises *in situ*.

Apesar das muitas vantagens apresentadas pela LIBS, há limitações em relação às outras técnicas espectroanalíticas mencionadas, como altos limites de detecção (LOD) e carência de padrões adequados para calibração, o que confere à técnica um caráter semi-quantitativo.

Entretanto, em diversas aplicações analíticas o experimentador deseja obter apenas uma visão geral dos elementos que estão presentes na amostra, ou seja, o objetivo é adquirir uma impressão digital da amostra (*fingerprint*). Amostras de coprólitos são bons exemplos dessa prática, pois são de difícil obtenção e de disponibilidade bastante restrita. Os coprólitos, (do Grego *copros* = fezes; *lithos* = pedra), são fezes mineralizadas ou preservadas por dessecação. Quando interações predador-presa não são observadas diretamente, os coprólitos podem constituir importante fonte de informações, além de apenas forma e tamanho dos mesmos, podendo-se obter, com a ferramenta certa, informações importantes sobre o paleoclima e a paleoecologia do local onde foram encontrados. É possível compreender algumas culturas da antiguidade pela simples análise de resíduos encontrados nos coprólitos².

1.2 – Revisão Bibliográfica

Os coprólitos são materiais muito pouco conhecidos analiticamente, portanto, uma pesquisa bibliográfica na principal coleção da *Web of Science* com as palavras-chaves *coprolites* e *analytical chemistry* não reporta nenhum trabalho. Com a palavra-chave *coprolite* são retornados 304 trabalhos, com o primeiro trabalho datado de 1961³. O número de publicações por ano pode ser visto na FIGURA 1.2.1.

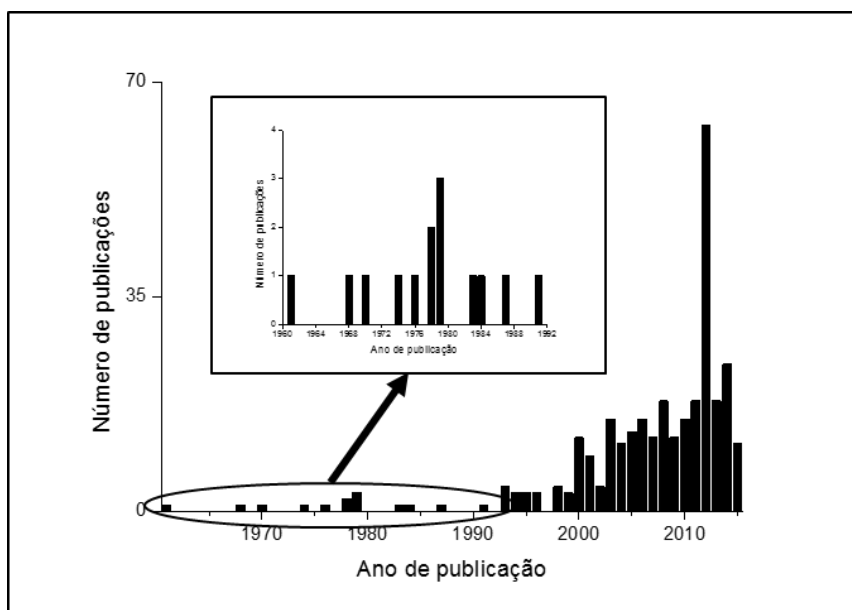


FIGURA 1.2.1 - Número de publicações por ano utilizando a palavra-chave *coprolites*, na principal coleção do *Web of Science*.

Destes 304 trabalhos, a maioria deles em revistas de cunho biológico, trata os coprólitos como fonte de informações biológicas. POINAR *et al.*⁴ obtiveram 7 tipos diferentes de DNA (*deoxyribonucleic acid*) de plantas através de coprólitos de um animal extinto (preguiça da era Cenozóica) e descobriram que uma das plantas ainda existe nos dias atuais.

Em um trabalho similar, HOFREITER *et al.*⁵ extraíram DNA mitocondrial de 5 coprólitos diferentes, datados de 11.000 até 28.500 anos, e identificaram todos como iguais a um osso da preguiça (*ground sloth*), que é a mesma mencionada no trabalho

anterior (POINAR *et al.*⁴). Além disso, os autores deste conseguiram sequenciar DNA de 99 espécies de plantas que ainda ocorrem na caverna *Gypsum*, em Nevada (EUA).

Além de serem utilizados para identificação de padrões de dieta ou também identificação de DNA, a análise de coprólitos traz informações importantes sobre possíveis doenças parasitárias, como mencionado por GONLÇALVES *et al.*². LOREILLE *et al.*⁶ identificaram, por meio de abordagens moleculares, ovos bem preservados identificados como *Ascaris*, um parasita helminto, após apurada análise de DNA. Os autores concluíram que a identificação de DNA parasitário em coprólitos é importante, pois pode trazer informações sobre doenças infecciosas contemporâneas.

No trabalho mais recente publicado sobre coprólitos na pesquisa mostrada na FIGURA 1.2.1, ARGUELLES *et al.*⁷, em uma aplicação forense, identificaram material polínico em um coprólito de uma múmia coreana que possivelmente era um general de alta patente do século XVI ou XVII. Eles conseguiram recuperar 20 tipos diferentes de pólen, entre eles de arroz, de trigo, da família da mostarda e da família de tomate/pimenta. Como polens residem no organismo de 7 a 21 dias, os autores sugerem, com estudos modernos de aeropalinologia na Coreia, que este general tenha falecido entre Novembro e Fevereiro, no inverno. Os autores ainda sugerem que a grande quantidade de polens relacionados com a água indica que a dieta deste general antes de sua morte era composta por chá, sopas ou caldos.

Apesar de não haver publicações com este material e Química Analítica, a técnica LIBS já é amplamente utilizada em aplicações arqueológicas, dentre outras. Uma pesquisa feita, também na base de dados do *Web of Science*, com as palavras-chaves *LIBS* e *archaeological*, reporta 91 trabalhos. Na FIGURA 1.2.2 é possível ver o número de publicações por ano com estas palavras-chaves.

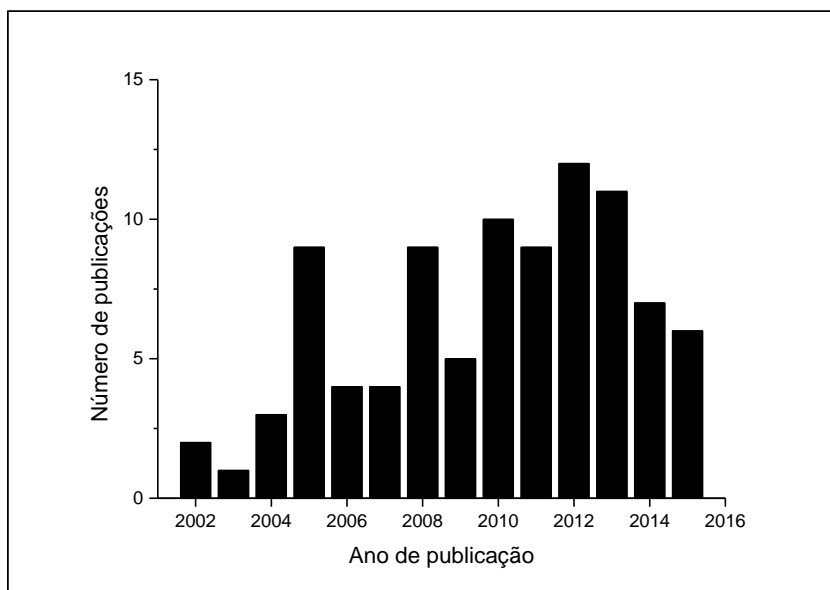


FIGURA 1.2.2 - Número de publicações por ano utilizando as palavras-chave LIBS e *archaeological* na principal coleção do *Web of Science*.

No trabalho mais antigo reportado pela pesquisa, ANZANO *et al.*⁸ analisaram amostras de materiais de cerâmica datados do final do primeiro século na Roma antiga. Os autores simplesmente compararam os espectros de emissão por LIBS das amostras arqueológicas com espectros de referência de materiais cerâmicos atuais, no intuito de classificar e comparar estas amostras. Eles concluíram que a taxa de correlação correta está em torno de 80 a 100%. Tais amostras, de difícil preparo por serem muito refratárias, e que pelo seu valor histórico não permitem destruição, necessitam de técnicas que são isentas de preparo de amostra e não destrutivas. Por este trabalho pode-se constatar que a obtenção de um *fingerprint* da amostra possibilitou conclusões interessantes e importantes.

BRYLSBAERT *et al.*⁹ analisaram amostras de pinturas em gesso da Era do Bronze obtidas em alguns locais do Egeu e Mediterrâneo Oriental. Os autores conseguiram identificar a pigmentação utilizada na maioria dos casos a partir do teor dos elementos estudados (Ca, Mg, Na, Fe, dentre outros), que também foram determinados por técnicas mais consolidadas. Os autores dissertaram sobre a importância da técnica LIBS no rastreamento de diferentes tipos de produtos, em que não existe a possibilidade de preparo de amostras devido aos seus valores históricos.

ANZANO *et al.*¹⁰, em trabalho mais recente, analisaram qualitativa e quantitativamente amostras arqueológicas de cerâmica. Os autores descreveram um protocolo para determinação de Fe por interpolação gráfica de calibração e também por adição de padrão. Com isso, determinaram Fe em amostras reais.

O uso da técnica LIBS para amostras de difícil preparo e que não podem ser destruídas tem crescido ao longo do tempo. A técnica também está em ascensão devido à rapidez de suas medidas, o que se tornou um grande atrativo. Apesar de sua maior aplicação em amostras sólidas, encontramos também aplicações em amostras líquidas, não apenas pela passagem desta amostra para um substrato sólido, mas pela análise direta das mesmas^{11,12}.

Diante do que foi mostrado neste tópico, visualiza-se uma oportunidade de desenvolvimento e exploração de uma matriz que carrega informações importantes sobre a vida no passado.

1.3 – Objetivos

O presente trabalho teve por objetivos:

- Realizar uma análise exploratória de amostras de coprólitos buscando-se identificar, através do monitoramento de alguns elementos, dietas e comportamentos dos animais que produziram os mesmos.
- Desenvolvimento da técnica LIBS aliada a ferramentas quimiométricas e imagens hiperespectrais.
- Utilização de ICP OES como fonte de informações quantitativas sobre alguns elementos monitorados, a fim de embasar as inferências realizadas com as imagens hiperespectrais.

1.4 – Material e Métodos

1.4.1 – Amostras

As amostras de coprólitos utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Adorna Fernandes (Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da UFSCar) e pelo Prof. Dr. Alejandro Lopez Castillo (Departamento de Química da UFSCar). As amostras são divididas em três períodos pré-históricos: Oligo-Mioceno, compreendendo uma idade de aproximadamente 28 milhões de anos, Cretáceo, compreendendo uma idade de aproximadamente 85 milhões de anos, e período Permiano, compreendendo uma idade de aproximadamente 260 milhões de anos. As amostras estão dispostas na TABELA 1.4.1.1.

TABELA 1.4.1.1 - Amostras de coprólitos utilizadas no trabalho.

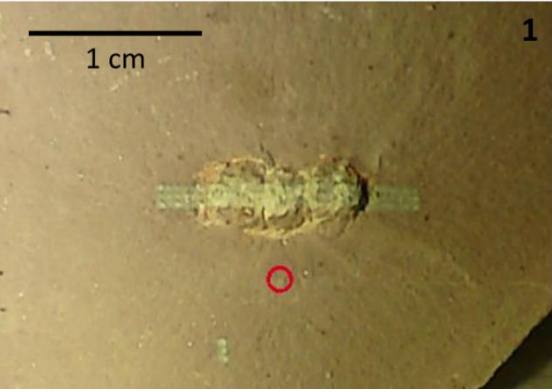
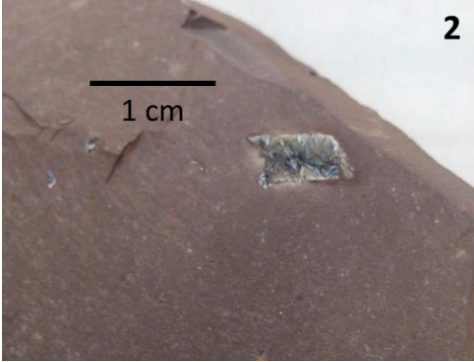
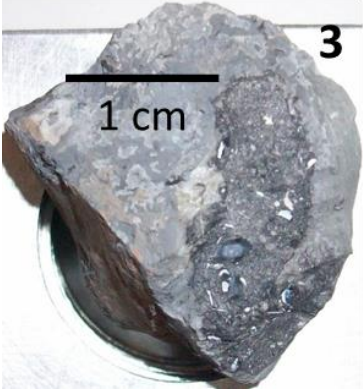
<i>Amostra</i>	<i>Período</i>	<i>Local</i>
	Permiano	Coprólito de peixe em uma rocha. Formação Corumbataí, Rio Claro, São Paulo.
	Permiano	Coprólito de peixe em uma rocha. Formação Corumbataí, Rio Claro, São Paulo.
	Permiano	Coprólito de peixe em uma rocha. Formação Irati, Rio Claro, São Paulo.

TABELA 1.4.1.2 - Amostras de coprólitos utilizadas no trabalho, um fóssil e seus períodos e locais de coleta (continuação).

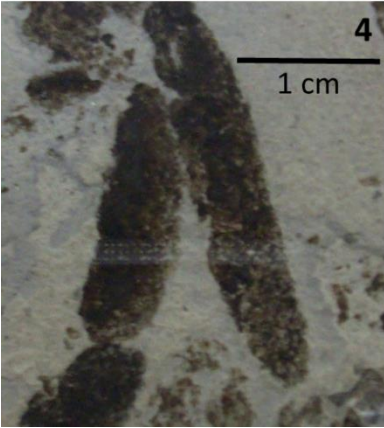
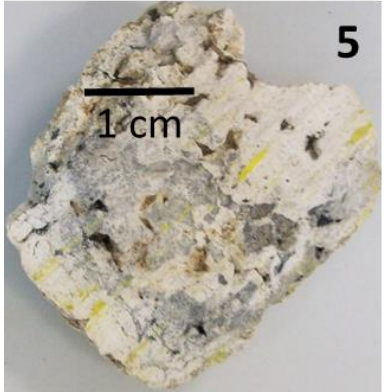
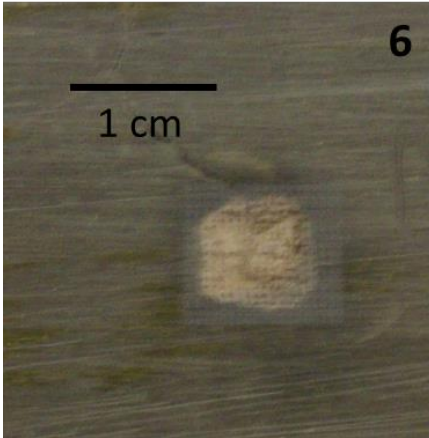

 <p>4 1 cm</p>	Permiano	Coprólito de réptil em uma rocha calcária. Formação Irati, Rio Claro, São Paulo
 <p>5 1 cm</p>	Cretáceo	Coprólito isolado de réptil. Formação Ibirá, São José do Rio Preto, São Paulo.
 <p>6 1 cm</p>	Oligo- Mioceno	Coprólito de ave em uma rocha. Bacia Taubaté, Formação Tremembé, Taubaté, São Paulo.

TABELA 1.4.1.3 - Amostras de coprólitos utilizadas no trabalho, um fóssil e seus períodos e locais de coleta (continuação).

	Permiano	<p>Fóssil de um réptil na mesma rocha calcária da amostra 4. Provavelmente o gerador do coprólito. Formação Irati, Rio Claro, São Paulo.</p>
---	-----------------	--

1.4.2 – Reagentes

Em todas as etapas nas quais foi necessário uso de água, utilizou-se água destilada-deionizada com resistividade de $18,2 \Omega \text{ cm}^{-1}$ produzida, utilizando equipamento Milli-Q® Plus Total Water System (Millipore Corp., Bedford, MA, EUA).

Para a digestão assistida por micro-ondas das amostras de coprólitos, foram utilizados os seguintes reagentes:

- Ácido nítrico (HNO_3 , 65 % m/m, M.M. 63 g mol^{-1} , Synth, Diadema, SP, Brasil).
- Peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 30 % m/m, 34 g mol^{-1} , Synth, Diadema, SP, Brasil).

Toda a frascaria/vidraria foi lavada com detergente e descontaminada em banho ácido (HNO_3 10 % v/v) durante 24 horas, e novamente lavados, agora com água destilada-deionizada. O processo de secagem ocorreu em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, SP, Brasil).

1.4.3 – Preparo de Amostra

O preparo de amostras de coprólitos para análises em LIBS foi mínimo, compreendendo apenas a adequação das amostras ao tamanho do porta-amostra do equipamento, sendo necessário, apenas em algumas amostras, processos de redução de tamanho, como por exemplo, a utilização de uma serra. Na maioria dos casos, não houve a necessidade deste processo.

Para a análise das amostras de rocha e coprólito em ICP OES, o preparo de amostra se deu da seguinte maneira: primeiramente, a separação física de rocha e coprólito com a utilização de uma espátula. Como a massa das amostras foi limitada, pesou-se massa adequada para se obter uma triplicata, sendo 0,2000 g para rocha e 0,1000 para coprólito. Digeriu-se então as amostras em forno de micro-ondas com cavidade, com 3 mL de HNO₃ concentrado, 3 mL de H₂O destilada-deionizada e 2 mL de H₂O₂. O programa de aquecimento pode ser visto na TABELA 1.4.3.1. Após a digestão, o digerido foi transferido quantitativamente para tubos falcon de 50 mL e o volume final ajustado com água para 30 mL.

TABELA 1.4.3.1 - Programa de aquecimento da digestão assistida por micro-ondas para a amostra de coprólito e de rocha.

<i>Etapa</i>	<i>Potência (W)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tempo (min)</i>
Rampa	1000	200	20
Patamar	1000	200	20
Resfriamento	0	0	10

1.4.4 – Equipamentos

Os espectros LIBS foram coletados usando o sistema LIBS J200 (Applied Spectra, Fremont, CA, EUA) equipado com um laser de Nd-YAG 1064 nm. O equipamento ainda conta com uma câmara de ablação com um filtro HEPA para purgar partículas ablatadas. A amostra se movimenta por um sistema automatizado XYZ e uma câmera 1280x1024 CMOS. Após o tempo de atraso escolhido pelo analista, a aquisição

do sinal emissão se deu por 1,05 ms, valor este fixado pelo fabricante, por um espectrômetro CCD de 6 canais. A coleta do espectro se inicia em 186,872 nm e finaliza em 1024,026 nm, compreendendo no total 12.288 comprimentos de onda.

Os sinais de emissão por plasma acoplado indutivamente, para as análises de rocha e coprólito, foram obtidos pelo iCAP 6000 ICP OES (*Thermo Fischer Scientific*, Madison, WI, EUA). O gás utilizado para a purga e geração do plasma foi o argônio 99,996 % (White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brasil).

As amostras de rocha e coprólito analisadas em ICP OES foram digeridas assistidas pelo equipamento micro-ondas Ethos 1600 (Milestone, Sorisole, BG, Itália).

1.5 – Resultados e Discussão

1.5.1 – Condições LIBS

O equipamento conta com um software padrão que permite o ajuste de alguns parâmetros, bem como a movimentação da amostra e a criação de padrões de análises nas superfícies das mesmas. Os parâmetros ajustados foram: tempo de atraso (*gate delay*), área de incidência do laser (*spot size*) e energia do pulso. Realizou-se um planejamento fatorial com todas as amostras de coprólitos variando-se estes fatores em dois níveis. A resposta analisada foi apenas a saturação do sinal, buscando-se o máximo sinal até 60.000 de intensidade. A TABELA 1.5.1.1 mostra os níveis e o planejamento fatorial completo 2³.

TABELA 1.5.1.1 - Planejamento fatorial completo 2³ das condições operacionais do LIBS, visando à melhor condição de análise: maior intensidade até 60.000 unidades.

Experimento	<i>Gate Delay</i>		<i>Spot Size</i>		<i>Energia do pulso</i>	
	Real (µs)	Codificado	Real (µm)	Codificado	Real (mJ)	Codificado
1	0,8	-1	75	-1	60	-1
2	0,8	-1	75	-1	80	1
3	0,8	-1	100	1	60	-1
4	0,8	-1	100	1	80	1
5	1,0	1	75	-1	60	-1
6	1,0	1	75	-1	80	1
7	1,0	1	100	1	60	-1
8	1,0	1	100	1	80	1

Após a avaliação da resposta, em que visualmente se observaram as condições em que o detector saturava, escolheram-se as condições do experimento 1 como sendo as melhores: *gate delay* ajustado em 0,8 µs, *spot size* ajustado em 75 µm e a energia do pulso ajustada em 60 mJ. Sendo assim, a potência do pulso do laser, visto

que a duração média do pulso é de 8 ns, foi de aproximadamente 7,5 MW, a fluência foi de aproximadamente 1,4 kJ/cm² e a irradiância do laser foi 1,7x10¹¹ W/cm². Observa-se que as condições não são as mais favoráveis para a obtenção dos sinais, visto que se poderiam obter sinais mais intensos utilizando-se maior energia do pulso; porém, devido ao interesse em obter-se um perfil espectral e também à alta intensidade relativa do elemento Mg, foi necessária a utilização desta condição.

1.5.2 – Análises LIBS

Inicialmente, criaram-se padrões para as análises dos coprólitos, visando a analisar tanto rocha quanto coprólito. Assim, foram estabelecidos padrões que se iniciavam na rocha, passavam pelos coprólitos e terminavam novamente na rocha em que o mesmo estava inserido. Esses padrões geralmente eram compostos por 3 linhas e um número de colunas necessárias para cobrir toda a área mencionada. A distância entre os pontos era de 0,5 mm. Apenas na amostra do período Oligo-Mioceno (amostra 6) o padrão foi diferente, englobando o coprólito tanto pelas laterais quanto pelas partes superior e inferior. Em todos os casos foram dados 10 pulsos por ponto. As matrizes que se formaram nas amostras são mostradas na TABELA 1.5.2.1. Todas as análises foram realizadas seguindo os parâmetros escolhidos no planejamento fatorial discutido no item 1.5.1.

TABELA 1.5.2.1 - Matrizes de dados e suas respectivas áreas.

Amostra	Matriz (Linha x Coluna)	Área estudada (mm²)	Nº de espectros gerados
1	3 x 26	78	780
2	3 x 19	57	570
3	3 x 15	45	450
4	3 x 31	93	930
5	3 x 13	39	390
6	17 x 19	323	3230
7	3 x 28	84	840
		Total	7190

Os dados obtidos das análises foram todos tratados da mesma maneira, em software Matlab 2009a (The Mathworks, Natick, EUA).

As 12.288 linhas de emissão, agora tratadas como variáveis, foram normalizadas (norma = 1) e em seguida centradas na média. Os dados então foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) para observar se haveria formação de agrupamentos no gráfico de escores e também analisar quais linhas de emissão, e qual o elemento correspondente, tiveram mais peso no agrupamento, a partir do gráfico de *loadings*. Por essa análise, encontram-se na TABELA 1.5.2.2 os elementos selecionados e suas respectivas linhas de emissão monitoradas.

TABELA 1.5.2.2 - Elementos estudados, linhas de emissão atômica (I) e iônica (II), e suas respectivas intensidades relativas obtidas no Aurora, software do fabricante.

Elemento	Linha de Emissão (nm)	Intensidade Relativa
Al I	393,40	33.214
Ca II	393,37	37.542
Cr I	357,87	1.670
Fe II	274,65	16.103
K I	766,50	3.054
Mg II	279,55	335.173
Mn II	257,61	4.306
Na I	589,60	10.000
Ni I	361,94	14.900
P I	213,62	271
Si I	288,16	14.058

O software Aurora conta com uma base de dados chamada TRULIBS®, na qual é possível encontrar os valores de intensidade relativa dos elementos. Essas intensidades são específicas para o equipamento LIBS utilizado. Elas foram determinadas utilizando um *Laser Ablation* (LA) e os sinais dos elementos foram coletados por espectrômetros UV de alta sensibilidade.

Após a seleção de variáveis e a normalização, agora pela intensidade relativa dos elementos, selecionaram-se apenas espectros correspondentes aos coprólitos, calculou-se a média dos espectros coletados por camada (1 a 10 referente aos 10 pulsos emitidos em cada ponto) e calculou-se então uma PCA. Na FIGURA 1.5.2.1 observa-se o gráfico de escores (PC1xPC2) e verifica-se, pelos agrupamentos, que as amostras são nitidamente diferentes em sua composição, com relação aos elementos selecionados. Logo em seguida, na FIGURA 1.5.2.2, é possível observar o gráfico de *loadings* que mostra como os analitos estudados influenciaram na separação e, conseqüentemente, quais caracterizam mais a amostra a que se refere.

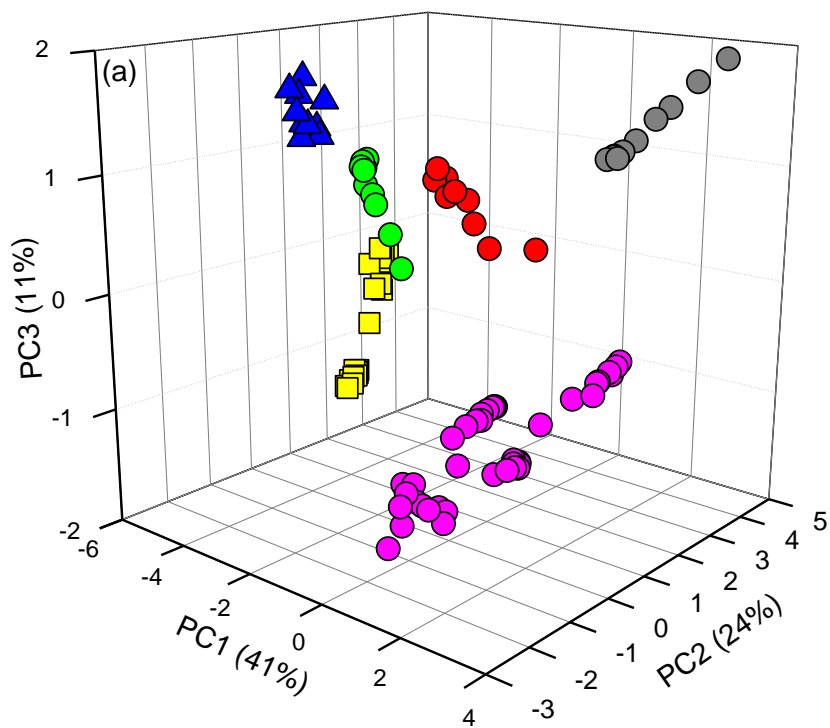


FIGURA 1.5.2.1 - Escores correspondentes à PCA realizada com as médias dos espectros coletados por camada apenas para os coprólitos.

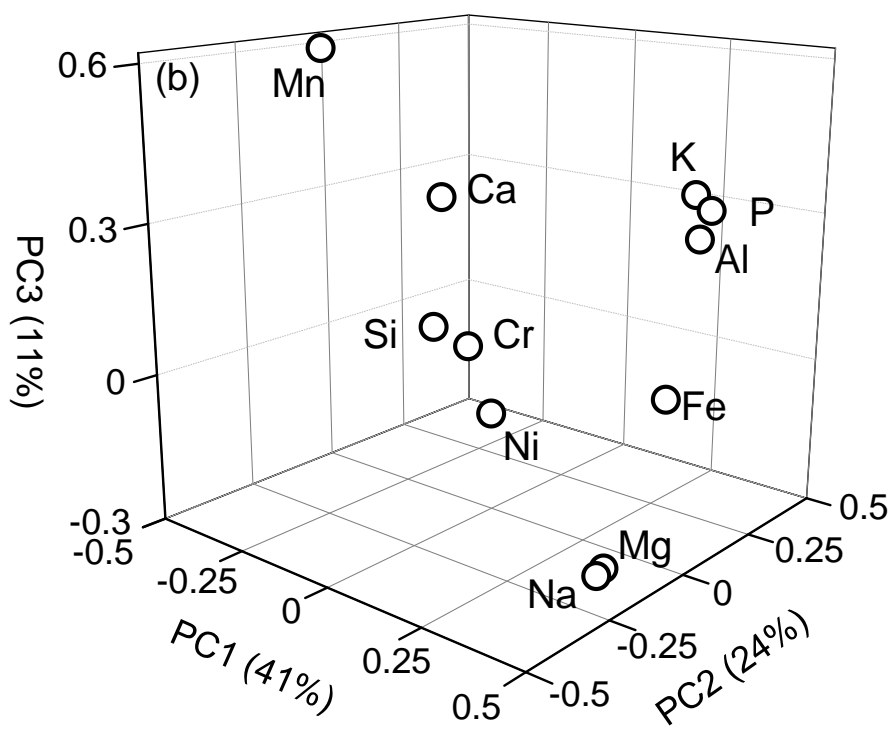


FIGURA 1.5.2.2 - Loadings correspondentes à PCA realizada com as médias dos espectros coletados por camada apenas para os coprólitos.

Como se pode observar nas figuras anteriores, elementos como o P têm peso alto na caracterização das amostras do período Oligo-Mioceno. Já os elementos Al, Ca, Fe, K, Mg, Na e Si caracterizam amostras do período Permiano. As amostras do período cretáceo não apresentam elementos característicos entre os analitos considerados nesta análise.

1.5.3 – Análises ICP OES

A análise de coprólito em ICP OES teve como objetivo determinar os elementos monitorados neste estudo, a fim de embasar as discussões sobre os resultados obtidos nas análises por LIBS. A amostra escolhida para o estudo foi a amostra do período Oligo-Mioceno (amostra 6 na TABELA 1.4.1.2), que foi preparada como descrito no item 1.4.3. As linhas de emissão escolhidas para os elementos monitorados podem ser vistas na TABELA 1.5.3.1

TABELA 1.5.3.1 - Elementos estudados e suas respectivas linhas de emissão atômica (I) e iônica (II).

Elemento	Linhas de Emissão (nm)
Al	167,0 (II) / 308,2 (I) / 309,2 (I)
Ca*	184,0 (II) / 317,9 (I) / 393,3 (II) / 396,8 (II) / 422,6 (I)
Cr	267,7 (II) / 283,5 (II) / 284,3 (II)
Fe	238,2 (II) / 239,5 (II) / 259,9 (II)
K*	583,1 (I) / 691,1 (I) / 766,4 (I) / 769,8 (I)
Mg*	279,5 (II) / 280,2 (II) / 285,2 (I)
Mn	257,6 (II) / 259,3 (II) / 260,5 (II)
Na*	588,9 (I) / 589,5 (I) / 818,3 (I)
Ni	221,6 (II) / 231,6 (II) / 341,4 (I)
P	177,4 (I) / 178,2 (I) / 178,7 (I)
Si	212,4 (I) / 250,6 (I) / 251,6 (I)

Todos os elementos foram determinados pela vista radial e os elementos com * foram analisados pelas vistas axial e radial. As concentrações em mg/kg, bem como os desvios padrões (SD), podem ser vistos na TABELA 1.5.3.2

TABELA 1.5.3.2 - Concentração dos elementos estudados e seus respectivos desvios padrões para rocha e coprólito, analisados separadamente.

Elemento	Rocha (n=4)		Coprólito (n=3)	
	Concentração (mg/kg)	SD (mg/kg)	Concentração (mg/kg)	SD (mg/kg)
Al	89943	5917	9494	529
Ca	5939	834	336175	75172
Cr	<LOD	-	<LOD	-
Fe	57297	3311	29050	529
K	17794	1957	2318	184
Mg	16530	1368	4621	490
Mn	1118	66	7793	131
Na	462	70	2419	52
Ni	<LOD	-	<LOD	-
P	960	45	184989	12537
Si	4498	271	9642	345

Observa-se que há uma diferença entre a concentração de alguns elementos na rocha e no coprólito. Elementos como Al, Fe, K, Mg aparecem com uma concentração maior na rocha, e elementos como Ca, Mn, Na e P apresentam maior concentração no coprólito.

Elementos como o Mn e o Si não apresentaram o mesmo comportamento concordante com a imagem; provavelmente, no caso do Mn, devido à contaminação na hora da serragem da amostra, e para o Si devido ao método de digestão utilizado, que não foi voltado para solubilização de silicatos insolúveis. É possível ver na FIGURA 1.5.3.1 que na digestão da rocha, um corpo de fundo permaneceu, provavelmente relacionado aos silicatos insolúveis.

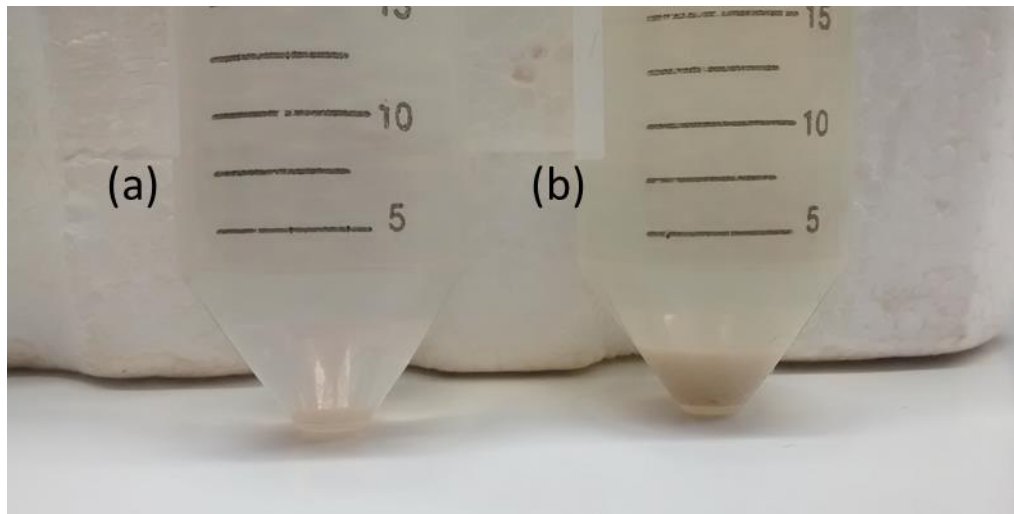


FIGURA 1.5.3.1 - (a) Digestão no coprólito. (b) Digestão na rocha. É possível visualizar um corpo de fundo em (b), referente aos silicatos insolúveis.

1.5.4 – Imagens hiperespectrais

As imagens hiperespectrais¹³ são imagens compostas por dados de natureza tridimensional, onde em cada *pixel* (menor unidade no sistema; no caso do presente trabalho, seria o pulso de análise)¹⁴ há um espectro. Na FIGURA 1.5.4.1 podemos observar a formação da matriz de dados.

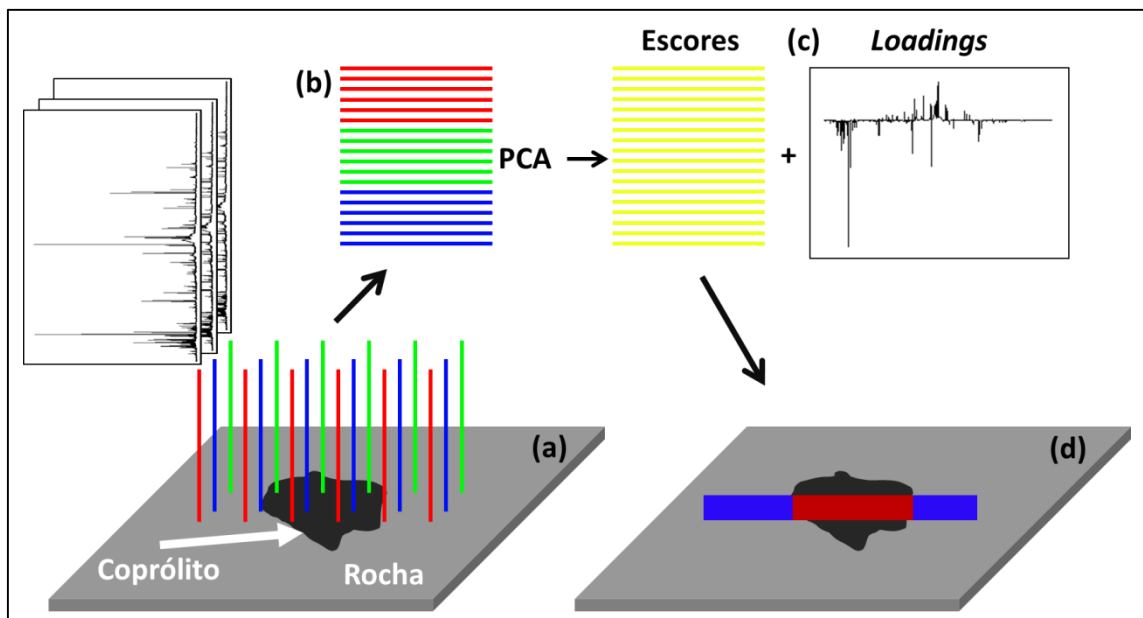


FIGURA 1.5.4.1 - Criação da imagem hiperespectral.

Em (a), as linhas verticais, nas cores vermelho, azul e verde, representam os espectros obtidos no local em que se encontram rocha e o coprólito. Após o desdobramento (b), as linhas (espectros) são organizadas em uma matriz, onde representam as amostras (pontos analisados), e as colunas representam o valor da intensidade no seu respectivo comprimento de onda. Em seguida, uma PCA é realizada e, como se pode observar em (c), são gerados valores de escores para cada posição inicial onde foi incidido um pulso, e *loadings* com todas as variáveis (comprimento de onda) e seus respectivos pesos. Por fim, para cada posição inicial antes do desdobramento é atribuído seu respectivo valor de escore que, de acordo com a sua intensidade gera uma cor, permitindo observar variações da composição da rocha e do coprólito de acordo com a variação da intensidade do sinal de emissão de elementos em seus comprimentos de ondas. O resultado final deste procedimento, pode ser observado na FIGURA 1.5.4.2.

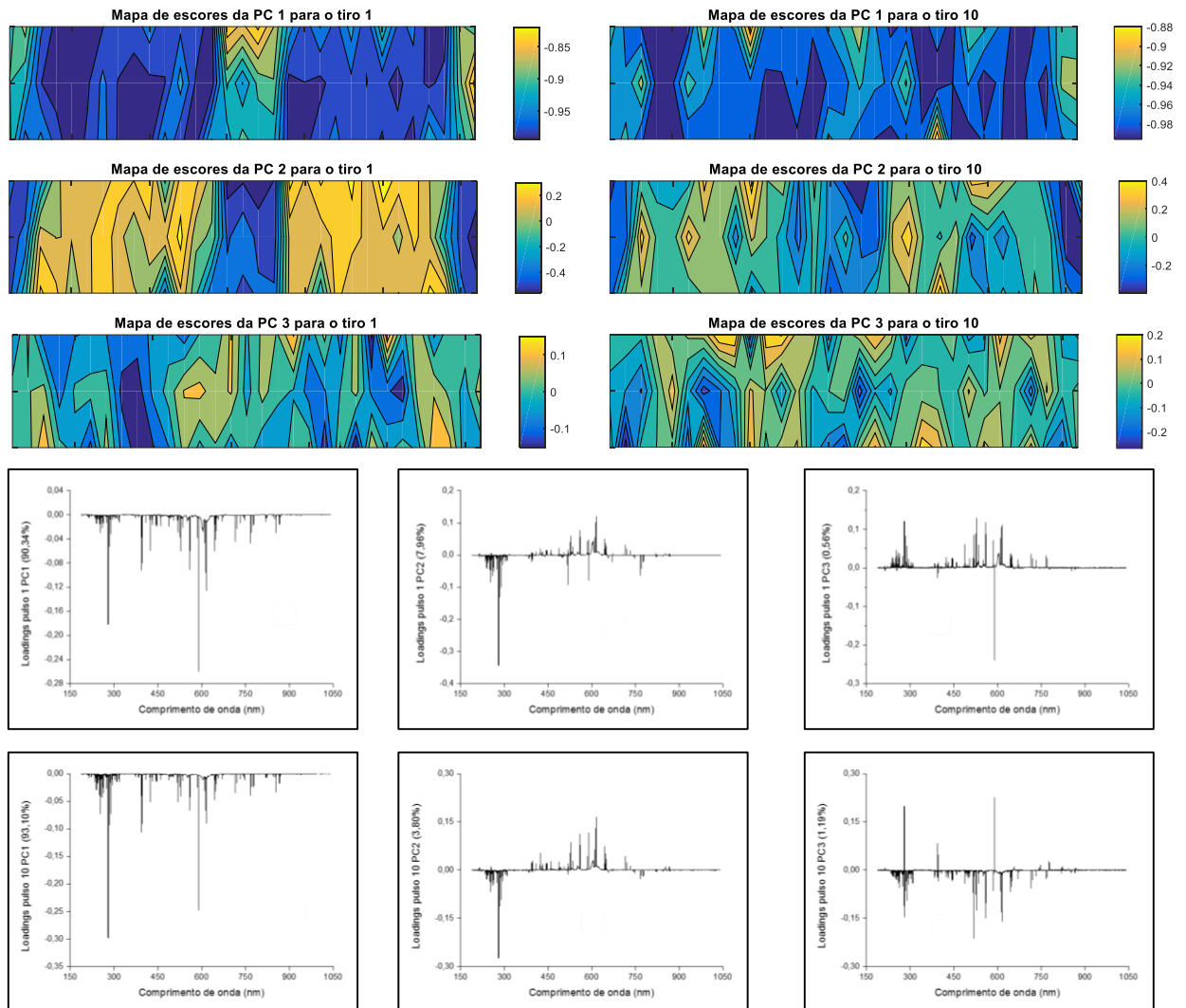
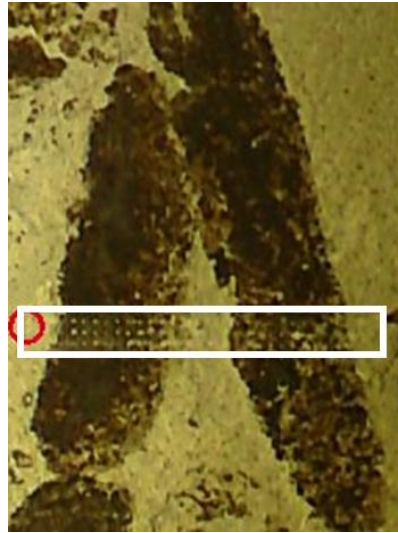


FIGURA 1.5.4.2 – Variação dos pulsos de 1 a 10 para o coprólito do período Permiano.

A coloração amarela (e derivados) mostrada na imagem hiperespectral representa escores positivos, enquanto a coloração azul (e derivados) representa escores negativos.

A estratégia inicial adotada foi calcular as imagens hiperespectrais para cada amostra e, pela análise dos *loadings*, buscamos identificar uma gama de elementos da tabela periódica. As linhas de emissão foram retiradas de base de dados própria do equipamento para a linha mais intensa de cada elemento. Os elementos procurados foram: Ag, Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Co, Cs, Cu, Fe, Ir, K, La, Mg, Mo, Mn, Na, Ni, P, Pb, Rb, S, Sb, Si, Sr, Th, Ti, V e Zn, porém, apenas os elementos mostrados na TABELA 1.5.3.2 foram considerados.

Sendo assim, houve uma seleção de variáveis que compreendeu a seleção da linha mais intensa de cada um dos 11 elementos estudados. Esses dados foram normalizados novamente, porém pela intensidade relativa de cada elemento, informação que também fora obtida na base de dados própria do equipamento e, por fim, os dados foram autoescalados. As imagens hiperespectrais foram então geradas. Ainda na FIGURA 1.5.4.2, observa-se uma suavização da coloração amarela nas imagens hiperespectrais do pulso 1 para o pulso 10 para a PC2, na parte que se refere ao coprólito, chegando a apresentar, em alguns pontos, coloração azul. Isso nos mostra que a composição do coprólito com o aumento da profundidade foi se alterando em direção à composição da rocha. Isso é coerente com a análise visual desta amostra que continha uma camada fina, sendo possível visualizar, em alguns pontos, a rocha.

A primeira imagem hiperespectral mostrada, na FIGURA 1.5.4.3, é referente ao coprólito (amostra 6, vide TABELA 1.4.1.2). Essa amostra foi a mesma utilizada no item 1.5.3, onde se encontra a análise de ICP OES desta amostra.

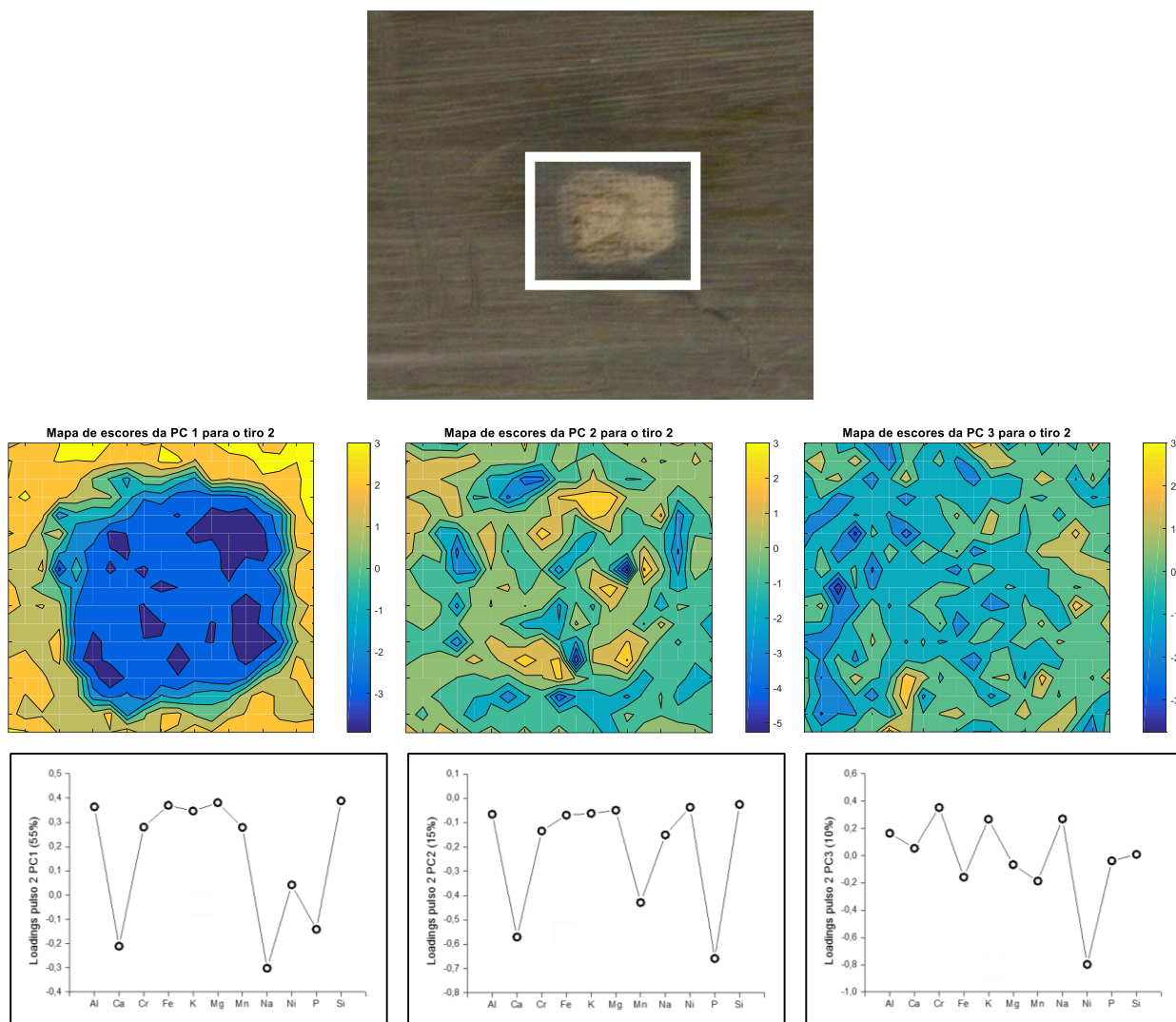


FIGURA 1.5.4.3 – Imagem real do coprólito do período Oligo-Mioceno acompanhada dos mapas de escores da PC1, PC2 e PC3 para o pulso 2 e seus respectivos *loadings*.

Como o pulso 1 geralmente é descartado para se evitar contaminação, foram utilizadas sempre as imagens do pulso 2. Pela imagem hiperespectral da PC1, é nítida a variação do perfil espectral dos 11 elementos seleccionados, na rocha e no coprólito. No gráfico dos *loadings*, observa-se que elementos Al, Fe, K, Mg possuem *loadings* positivos, que na imagem hiperespectral representa a região com coloração amarela e nos permite dizer que estes elementos encontram-se em maior concentração

na rocha do que no coprólito. Já os elementos Ca, Na e P possuem *loadings* negativos, que na imagem hiperespectral representa a região com coloração azul, e nos permite dizer que estes elementos encontram-se em maior concentração nos coprólitos do que na rocha. Qualitativamente, é possível dizer que alguns elementos possuem maior concentração em uma matriz do que em outra, no entanto, não é possível informar qual é a concentração, nem mensurar quanto maior é a concentração destes elementos. Com exceção dos elementos Cr e Ni, que ficaram abaixo do limite de detecção no ICP OES, e dos elementos Mn e Si que já foram discutidos, os resultados a partir das imagens hiperespectrais são coerentes com os resultados obtidos por ICP OES.

Como os dados foram corretamente correlacionados, foi possível realizar inferências para as outras imagens hiperespectrais dos coprólitos restantes.

Na FIGURA 1.5.4.4, temos a foto original da amostra 7, que representa um fóssil de um pequeno réptil aquático (*Stereosternum tumidum*) que viveu durante o período Permiano¹⁵. Nesse caso, os ossos (falanges) são facilmente observados, incrustados na rocha calcária que o envolve. Este réptil pertence a uma extinta Ordem da Mesosauria (“pequeno lagarto”, período Permiano 260 milhões de anos, da formação Irati, Rio Claro, São Paulo). Esse réptil carnívoro foi um dos primeiros animais aquáticos.

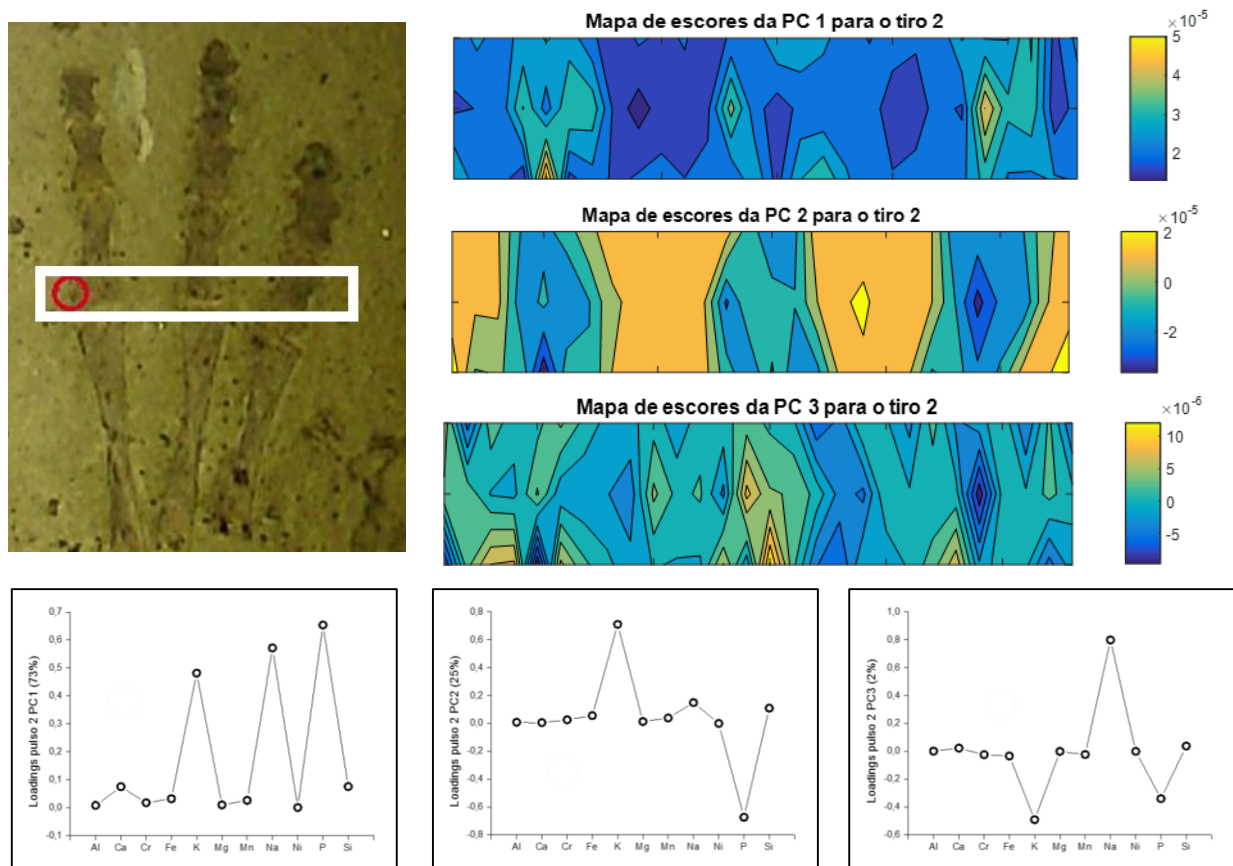


FIGURA 1.5.4.4 - Imagem real do fósil do período Permiano acompanhada dos mapas de escores da PC1, PC2 e PC3 para o pulso 2 e seus respectivos *loadings*.

Pode-se observar pela imagem hiperespectral que há claramente uma diferença na composição do fósil e da rocha no mapa de escores para a PC2. Nos *loadings* conseguimos observar que os elementos K, Na e Si estão presentes em maior concentração na rocha do que no fósil, representado pelas colorações amarelas. Da mesma maneira, elementos como o P estão em maior concentração no fósil do que na rocha. Ressalta-se neste caso que os elementos que estão com *loadings* com valor próximo do zero permitem duas observações: o elemento não se encontra em nenhuma das matrizes, ou eles se encontram em ambas matrizes, porém em concentrações muito próximas. É o caso observado para o Ca, pois sabe-se que os fósseis contêm o composto $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, e como a rocha é calcária, predominantemente formada por CaCO_3 , o elemento está presente nas duas matrizes em concentrações próximas.

Quando observamos o coprólito gerado por este animal, observamos comportamento semelhante com relação ao Ca.

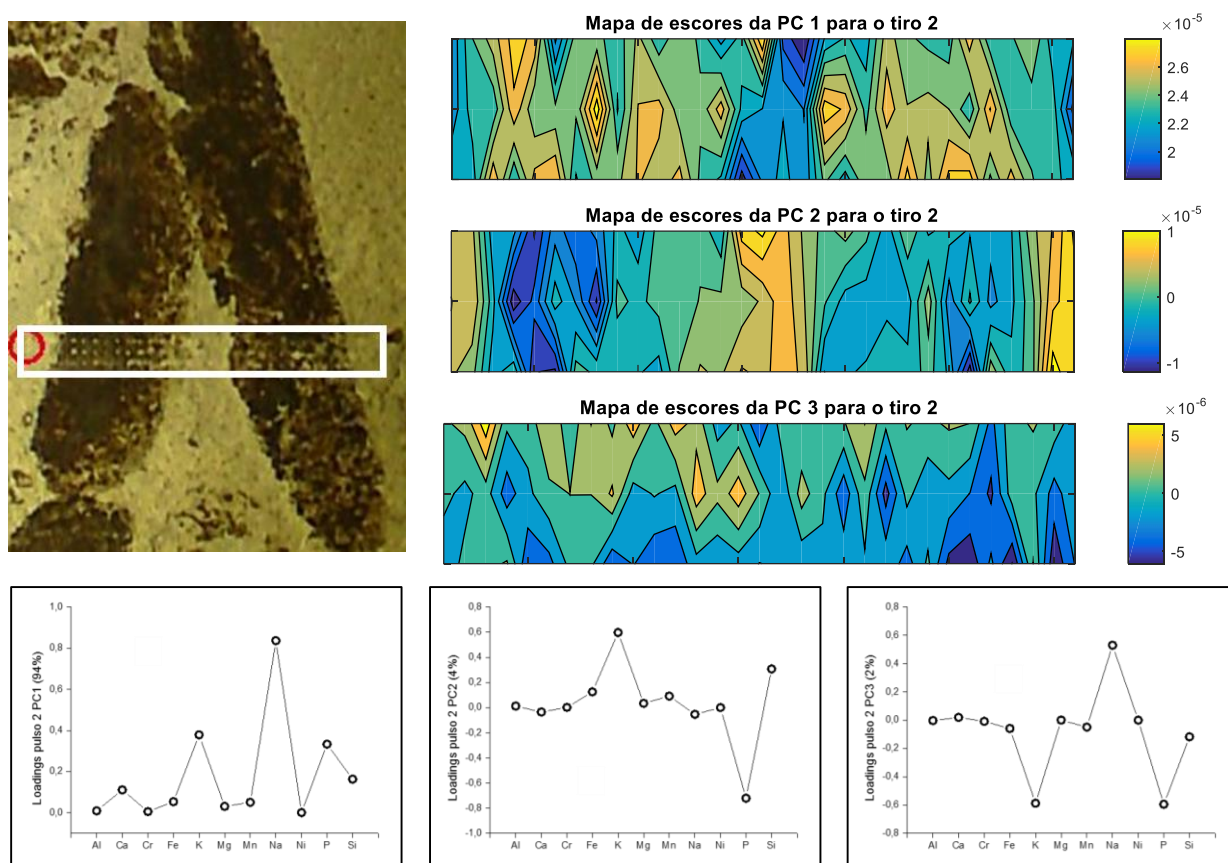


FIGURA 1.5.4.5 - Imagem real do coprólito do período Permiano acompanhada dos mapas de escores da PC1, PC2 e PC3 para o pulso 2 e seus respectivos *loadings*.

Na FIGURA 1.5.4.5 observamos que os elementos Fe, K, Mn e Si apresentam *loadings* positivos, estando presentes então em maior concentração na rocha que no coprólito. Já os elementos Ca e P estão com *loadings* negativos, estando em maior concentração no coprólito que na rocha. Neste caso, existe uma relação direta entre Ca e P devido ao composto $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, que é comum em coprólitos de animais carnívoros.

Na FIGURA 1.5.4.6 encontra-se a imagem hiperespectral da amostra 5, do período Cretáceo.

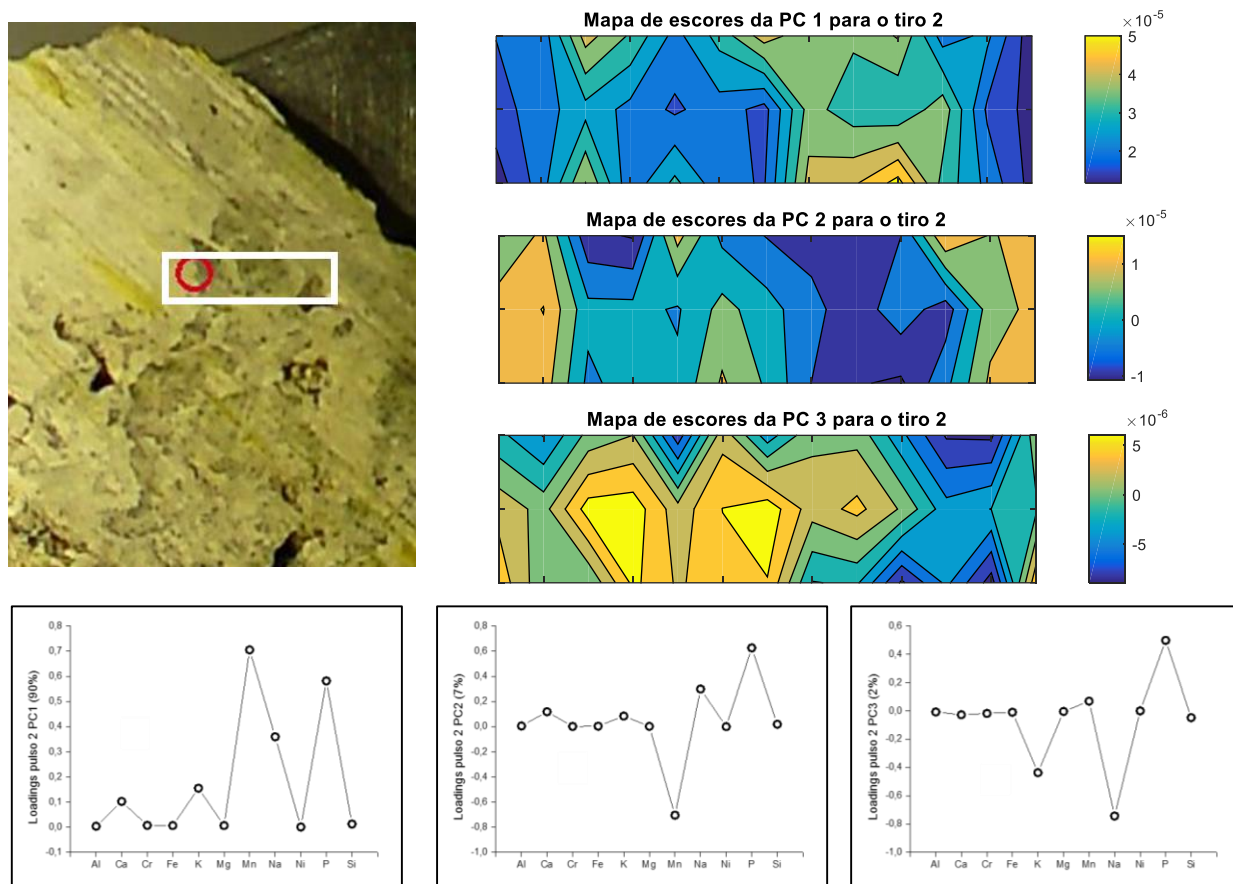


FIGURA 1.5.4.6 - Imagem real do coprólito do período Permiano acompanhada dos mapas de escores da PC1, PC2 e PC3 para o pulso 2 e seus respectivos *loadings*.

Esta amostra em particular era composta inteiramente por coprólito, portanto não foi possível ver o perfil espectral na mesma; no entanto, observa-se que era um coprólito bem heterogêneo e isso nos permite fazer algumas inferências. Na região mais clara do coprólito, elementos com *loadings* positivos, como o Ca, Na e P, encontram-se em maior concentração do que na região mais escura do coprólito, que possui concentração maior de Mn que na parte clara. O elemento Mn pode estar relacionado com hábitos terrestres do animal que gerou o coprólito. Mais uma vez, encontra-se a relação direta dos elementos Ca e P, indicando possivelmente a presença do composto $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, que pode estar relacionado a hábitos carnívoros do animal.

1.6 – Conclusões Parciais

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que as análises de coprólitos, através da técnica LIBS, foi possível e satisfatória no que concerne à obtenção rápida de um perfil espectral (*fingerprint*) dos mesmos. Através de uma investigação mais específica, foi possível a determinação dos teores dos elementos presentes utilizando-se a técnica de ICP OES. Com estes dados em mãos, foi possível correlacionar e embasar as inferências feitas com as imagens hiperespectrais com os teores encontrados para os 11 elementos estudados. No que se refere ao elemento Si, observa-se uma discrepância. Enquanto nas imagens hiperespectrais o Si parece prevalecer, em concentração na rocha, os resultados para Si, pela análise de ICP OES, mostram que a concentração é mais elevada no coprólito. No entanto, podemos observar que o método digestão escolhido para as amostras não foi voltado para a determinação de silício. Sendo assim, apresenta-se a técnica LIBS como uma excelente ferramenta na obtenção de informações rápidas nas mais variadas matrizes. No entanto, há algumas limitações para a técnica, como altos valores de LOD, e também a falta de padrões adequados dificultando a quantificação de analitos. Contudo, foi possível realizar observações pertinentes a respeito da dieta de animais pré-históricos com o auxílio da técnica.

Capítulo 2

Solos

2 – Capítulo 2 – Solos

2.1 – Introdução

Análises *via* radiação infravermelho próximo (NIRS – *Near Infrared Spectroscopy*) se apresenta como um método espectroanalítico que possibilita análises rápidas, isentas de preparo de amostra e de baixo custo, é a realizada *via* radiação por infravermelho próximo (NIRS – *Near Infrared Spectroscopy*).

As análises de solos hoje possuem uma função importante na agricultura brasileira. Sabe-se que a textura do solo, ou seja, as frações de areia, argila e silte, caracterizam o solo em diversas classificações de acordo com o diagrama triangular das classes texturais do solo. Essas classificações auxiliam diretamente na adubação e manejo do solo, pois a textura tem uma relação intrínseca com a retenção de água e troca catiônica¹⁶. As frações granulométricas que caracterizam o solo (areia, argila e silte) possuem dimensões variadas e diferentes entre si: argila (< 0,002 mm), silte (0,002 mm a 0,05 mm) e areia (0,05 mm a 2 mm)¹⁷.

A literatura especializada reporta pelo menos dois métodos clássicos para análise de textura em solo: o método da pipeta e o método do densímetro. Esses dois métodos são amplamente disseminados pelo estado de São Paulo e há também um ensaio de proficiência, regulado pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), que também disponibiliza os métodos para os laboratórios participantes¹⁷. Entretanto, esses métodos demandam gasto de reagente e um longo tempo para a realização das análises (baixa frequência de amostragem), sendo possível analisar, em média, 30 amostras por dia¹⁸. A demanda por tais análises tem aumentado consideravelmente, justamente porque a maioria das decisões tomadas no âmbito agrícola (adubação, calagem, manejo, entre outras) tem como base laudos de análise química (macro e micronutrientes) e física (granulometria) do solo¹⁹. Dessa forma, a necessidade por métodos instrumentais de análise, que aliem o rápido preparo de amostra (ou até mesmo a isenção deles), o baixo custo da análise e a rapidez desta, tem se mostrado cada vez maior no âmbito científico.

2.2 – Revisão Bibliográfica

Estudos que utilizam a espectroscopia no infravermelho próximo, assim como a LIBS, vêm crescendo nos últimos anos. Uma pesquisa realizada na Principal Coleção do *Web of Science* reporta cerca de 5.000 trabalhos com as palavras-chaves *near-infrared spectroscopy* e *NIRS*. A FIGURA 2.2.1 retrata o número de publicações por ano, com estas palavras-chave.

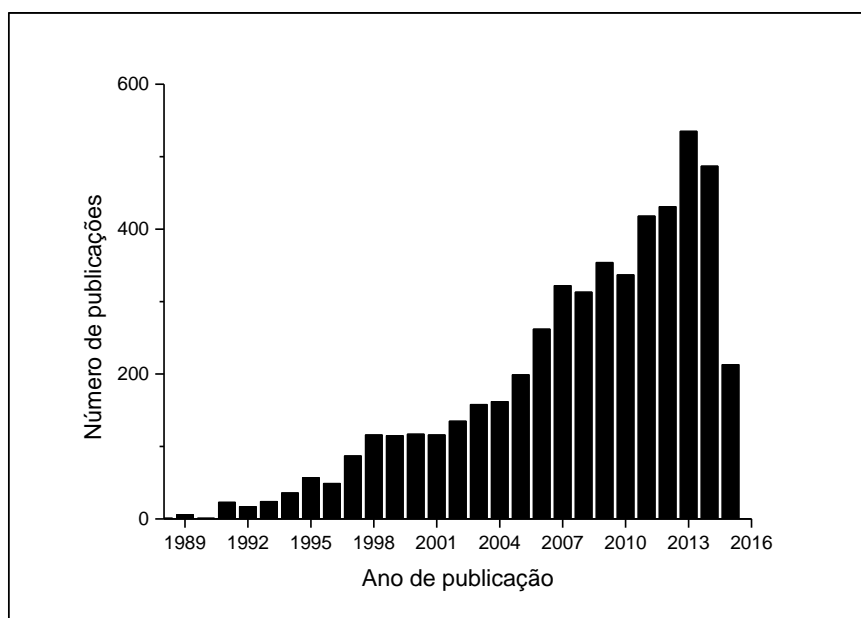


FIGURA 2.2.1 - Número de publicações por ano com as palavras-chave *near-infrared spectroscopy* e *NIRS*.

Destes trabalhos, o primeiro reportado, de 1985, traz a utilização da técnica para determinação de metionina em ervilhas. WILLIAMS *et al.*²⁰ destacaram a aplicação da técnica frente àquelas já utilizadas para determinação de metionina e proteínas nas ervilhas. O método proposto pelos autores atingiu valores de exatidão na predição da metionina de $\pm 0,011\%$ e $\pm 0,76\%$ com um aparelho de infravermelho próximo comercial. Eles também frisaram o reduzido tempo de análise frente à técnica tradicional (Método da Pipeta), chegando em predições de metionina e proteína em menos de 1 min.

Em um trabalho mais recente, KRÄHMER *et al.*²¹ desenvolveram um método de espectroscopia de infravermelho próximo para determinar parâmetros de

qualidade em produtos de coco. Os autores destacaram novamente as vantagens frente à técnica de determinação destes parâmetros *via* cromatografia, que são limitados devido aos passos de isolamento e purificação dos compostos. Eles mostraram que a técnica é rápida e confiável na rotina para a determinação de compostos fenólicos, ácidos orgânicos, epicatequina, ácido láctico, tempo de fermentação e valor de pH.

Ao alterar as palavras-chaves para *near-infrared spectroscopy*, *NIRS* e *soils*, são reportados 201 trabalhos publicados entre 1991 e 2015. Na FIGURA 2.2.2 podemos ver a distribuição das publicações pelos seus respectivos anos de publicação.

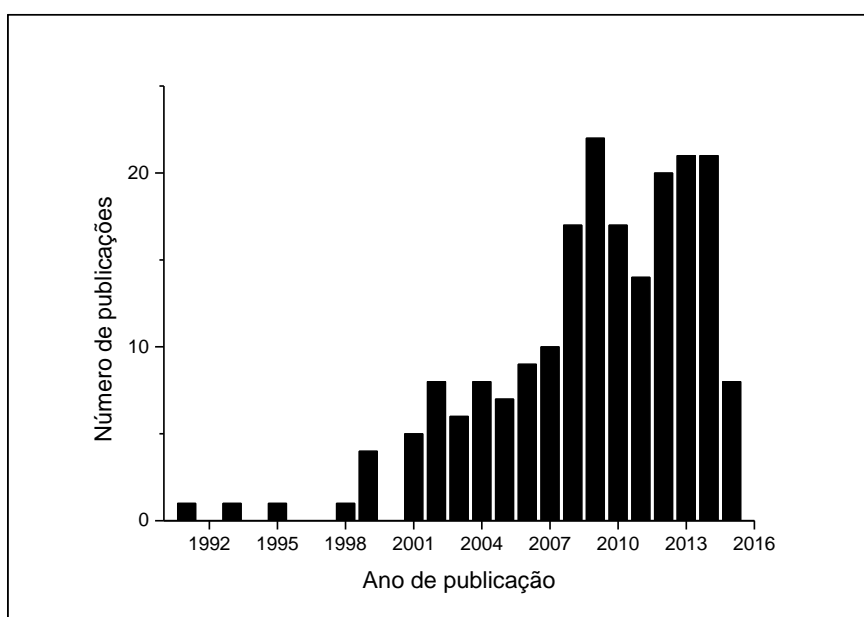


FIGURA 2.2.2 - Número de publicações por ano com as palavras-chave *near-infrared spectroscopy*, *NIRS* e *soils*.

No que concerne à utilização da técnica em análises de solos, CHANG *et al.*²² utilizaram a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo para avaliar diversas propriedades do solo, como C total, N total, tamanho de partícula, metais extraíveis com Mehlich III (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn), cátions trocáveis (Ca, Mg, Na e K) e biomassa. Os autores destacaram que para algumas propriedades como C total, N total, umidade, capacidade de troca catiônica, taxa de respiração, metais extraíveis, areia, silte e Ca por Mehlich, a predição se deu com sucesso ($R^2 > 0,80$). Alguns outros parâmetros como alguns metais extraíveis por Mehlich III (Fe, K, Mg, Mn), cátions trocáveis (Ca, Mg, e K), soma de bases trocáveis, acidez trocável, argila, N

potencialmente mineralizável, taxa de respiração total, biomassa C e pH foram também estimados por NIRS, mas com menos precisão ($R^2 = 0.80\sim 0.50$). Já os resultados previstos para a agregação e macroagregação não foram estatisticamente aceitáveis ($R^2 = 0.46\sim 0.60$). Os demais metais extraíveis por Mehlich III (Cu, P e Zn) e metais trocáveis (Na) não poderiam ser previstos utilizando a técnica de infravermelho próximo ($R^2 < 0,50$). Os autores concluíram que, com os resultados apresentados, a técnica NIRS poderia ser usada como uma alternativa rápida para obtenção de resultados confiáveis para se determinar propriedades do solo com certa precisão em um curto intervalo de tempo.

VISCARRA ROSSEL *et al.*²³ também demonstraram a potencialidade da técnica frente àquelas tradicionais de análises de solos. Os autores utilizaram espectroscopia no visível, infravermelho próximo e infravermelho médio. Com isso, eles determinaram uma série de propriedades através da técnica. Particularmente, com relação à determinação da textura de solo, foi eleita a espectroscopia no infravermelho médio como a mais adequada, visto que ela discrimina minerais argilosos com mais precisão. Os autores ainda concluíram que uma das maiores vantagens da técnica é a possibilidade de, em apenas um espectro, obter informações precisas de praticamente todas as propriedades que são determinadas no solo, em um laboratório de rotina.

Ainda considerando todas as características do solo, VENDRAME *et al.*²⁴ utilizaram também a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo em Latossolos do Cerrado na região central do Brasil. Os autores concluíram que não foi possível prever algumas propriedades físico-químicas, tais como pH e capacidade de troca iônica. No entanto, no que se refere aos principais constituintes do solo (areia, argila e silte), a previsão foi relativamente boa.

FERRARESI *et al.*²⁵ utilizaram duas técnicas a fim de comparar qual é a mais adequada para análise de textura de solo. São elas: espectroscopia no infravermelho próximo e espectroscopia de refletância difusa com transformada de *Fourier* (DRIFTS). Os autores determinam as frações do solo nas duas técnicas. Os autores ainda elegem DRIFTS como sendo a mais adequada para a análise de textura, devido ao fato de que esta técnica é sensível à identificação de minerais argilosos.

Observa-se que vários autores sugerem a utilização da técnica NIRS na classificação de solos, visto que é mais rápida e mais eficiente frente àquelas tradicionais para determinação dos parâmetros de caracterização dos solos.

2.3 – Objetivos

No que concerne às análises de solos, tem-se por objetivos:

- A criação de modelos de classificação para textura de solos utilizando a técnica NIRS.
- Apresentar a LIBS como técnica analítica para previsão da textura de solos utilizando uma estratégia de encapsulamento por polímero.

2.4 – Materiais e Métodos

2.4.1 – Amostras

As amostras de solos utilizadas neste trabalho foram todas cedidas pela Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil, em parceria com outras instituições: Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil; USP, Pirassununga, SP, Brasil; IAC, Campinas, SP, Brasil; Embrapa Solos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. As amostras estão divididas em 5 classes de textura de solos: arenosa, argilosa, média, muito argilosa e siltosa. Algumas amostras não tinham resultados de textura, as quais foram classificadas como desconhecidas. Como disposto na TABELA 2.4.1.1, pode-se observar o número de amostras por instituição, e na TABELA 2.4.1.2, o número de amostras por classe.

TABELA 2.4.1.1 - Número de amostras cedidas ao trabalho por instituição de origem.

<i>Instituição de Origem</i>	<i>Número de amostras</i>
Embrapa – Pantanal	45
Embrapa – Solos	56
Instituto Agrônômico de Campinas	98
USP – Pirassununga	51
Total	250

TABELA 2.4.1.2 - Número de amostra por classe textural

<i>Classe textural</i>	<i>Número de amostra</i>
Arenosa	29
Argilosa	69
Média	115
Muito Argilosa	19
Siltosa	10
Desconhecida	8
Total	250

2.4.2 – Reagentes

Como uma das vantagens da técnica NIRS é o mínimo ou ausência de preparo de amostra, não foi necessário o uso de nenhum reagente para as análises. Para o preparo das amostras de solo pela estratégia de encapsulamento de amostra por uma solução de polímero, foi utilizada uma solução 10 % m/v de policarbonato (LEXAN GE101) em diclorometano (CH_2Cl_2 , 99,5 %, 84,93 g mol⁻¹, Synth, Diadema, SP, Brasil). Os detalhes do preparo das amostras para as análises pela técnica LIBS serão mostrados no item 2.4.3

2.4.3 – Preparo de Amostra

Para a análise no infravermelho próximo dos solos, o único preparo de amostra realizado foi a adequação das mesmas com relação ao tamanho de partícula, que foi de 2 mm. Para isso, as amostras são secas em temperatura ambiente e passadas em peneira de 2 mm de abertura. Este procedimento não foi necessário, pois as amostras cedidas já estavam nesta condição.

Para as análises no LIBS, o preparo de amostras se deu da seguinte maneira: uma massa de solo era pesada e transferida para um suporte de alumínio fixado a uma lâmina de vidro. Neste suporte já havia uma camada de polímero (policarbonato), e após o solo ser distribuído homoganeamente no suporte, mais uma camada de polímero era adicionada, na forma de solução. Após a secagem do material, o suporte de alumínio era levado diretamente ao LIBS. Na FIGURA 2.4.3.1 pode se ver o resultado final deste procedimento.

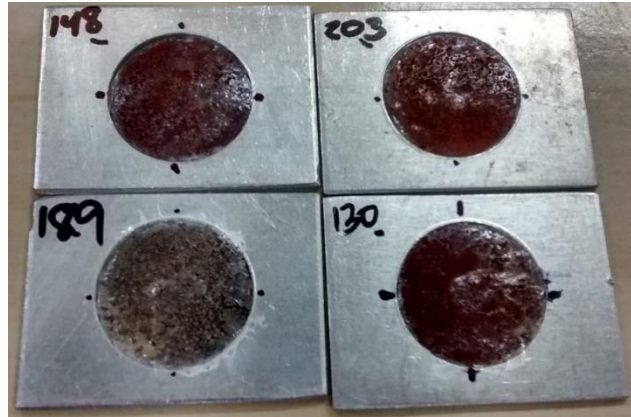


FIGURA 2.4.3.1 - Resultado final do preparo das amostras de solo por encapsulamento em polímero para análise em LIBS.

2.4.4 – Equipamentos

Para as análises de radiação no infravermelho próximo dos solos foi utilizado o equipamento NIRFlex Solids N-500 (BUCHI, Flawil, Suíça). Este é um equipamento de refletância difusa que emite radiações de 1.000 a 2.500 nm (10.000 a 4.000 cm^{-1})

Para as análises de LIBS, o mesmo equipamento descrito no item 1.4.4 foi utilizado.

2.5 – Resultados e Discussão

2.5.1 – Análises NIRS

As análises dos solos por NIRS ocorreram de modo a tentar criar modelos de classificação e possível quantificação de textura de solos utilizando ferramentas quimiométricas como SIMCA, KNN, PLS-DA e PLS. As análises foram feitas em triplicata e pode-se ver um espectro de absorvância de infravermelho próximo na FIGURA 2.5.1.1.

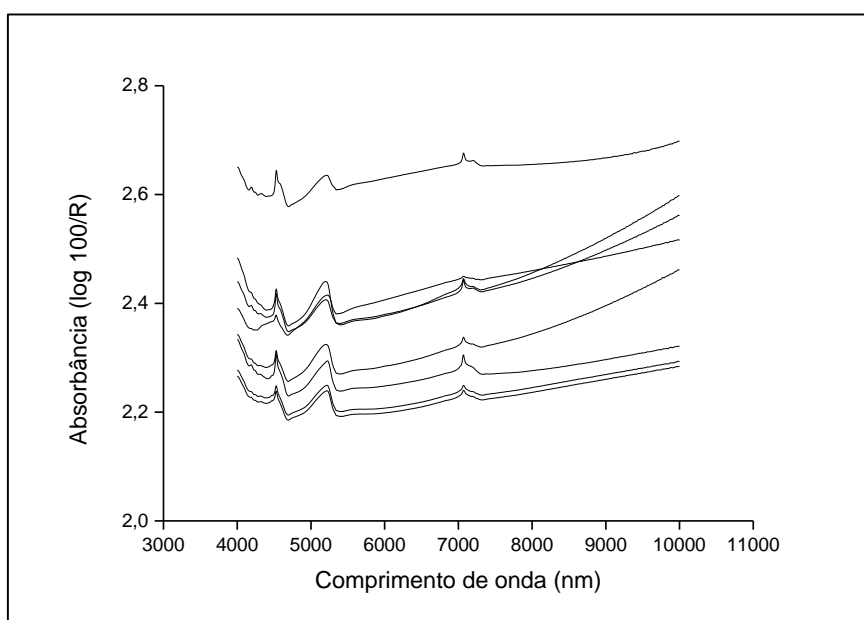


FIGURA 2.5.1.1 - Espectro de infravermelho próximo para algumas amostras de solo.

Os dados foram tratados igualmente no software Pirouette 4.5 (Infometrix, Bothell, WA, EUA).

Os dados foram inicialmente normalizados (norma = 1), derivados pela primeira derivada com uma janela de 5 pontos, e em seguida centrados na média. Na sequência, os dados foram submetidos à análise de componentes principais (PCA). O esperado neste ponto era a observação de agrupamentos formados por amostras de diferentes texturas, o que ajudaria a classificação. Entretanto, houve apenas dois agrupamentos observados, um mais coeso e outro mais disperso, que foram formados pela origem das amostras, e não pela textura das mesmas. Na FIGURA 2.5.1.2 pode se

ver estes agrupamentos. O agrupamento mais coeso se refere às amostras cedidas pela USP sediada em Pirassununga. Não houve uma análise mais aprofundada, porém, acredita-se que, como os espectros no infravermelho próximo são bastante sensíveis às ligações C-H, O-H e N-H, abundantes em compostos orgânicos, este agrupamento observado ocorreu devido à composição da matéria orgânica presente nestas amostras. Essa inferência se deu devido ao fato de que os solos da região da Pirassununga são, em sua maioria, utilizados para plantação de cana-de-açúcar, e é comum entre os agricultores desta cultura a utilização de vinhaça na adubação.

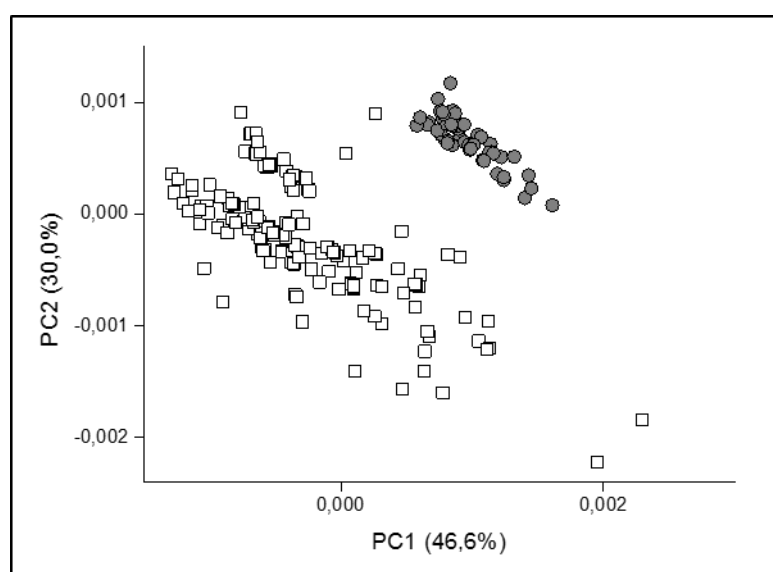


FIGURA 2.5.1.2 - Gráfico de escores (PC1xPC2). Círculos compreendem amostras apenas de USP - Pirassununga enquanto que os quadrados representam amostras das outras instituições.

A partir deste resultado, iniciou-se a criação de modelos de calibração com as ferramentas KNN, SIMCA e PLS-DA. Serão mostrados apenas os resultados para os modelos criados com as ferramentas KNN e SIMCA, pois os modelos de classificação PLS-DA obtiveram resultados que não ultrapassaram a marca de 40% de acerto, o que é considerado ruim. Também foi testada a ferramenta PLS para criação de um modelo multivariado de quantificação, no entanto o mesmo apresentou resultados que não ultrapassavam 50% exatidão na quantificação, o que é insatisfatório.

Dentre as várias abordagens que serão mostradas, a primeira delas foi a criação de modelos com todo o conjunto de amostras, com exceção apenas das 8 amostras que não possuíam, de antemão, os valores dos teores de argila, areia e silte. Resumidamente, o número de amostras por classe usadas nesta primeira abordagem se encontra na TABELA 2.4.1.2

Na TABELA 2.5.1.1 encontram-se os valores das previsões do modelo KNN.

TABELA 2.5.1.1 - Resultado para o modelo de classificação KNN com 4 vizinhos mais próximos

KNN	1 predito	2 predito	3 predito	4 predito	5 predito	Acerto (%)
1 real	12	2	15	0	0	42
2 real	2	48	16	2	1	70
3 real	9	14	92	0	0	80
4 real	1	6	5	7	0	37
5 real	2	1	4	0	3	30
					Média	51,8

1 – Classe arenosa, 2 – Classe argilosa, 3 – Classe média, 4 – Classe muito argilosa, 5 – Classe siltosa

Como se pode observar, o modelo KNN com todas as amostras apresentou no geral uma média de 51,8% de acerto nas previsões, no entanto, observamos que para algumas classes como a classe média, o modelo apresentou uma média de 80% de acerto, o que já representa um valor aceitável.

Já a TABELA 2.5.1.2 apresenta os resultados para o modelo de classificação SIMCA, criado com este conjunto de amostras.

TABELA 2.5.1.2 - Resultado para o modelo de classificação SIMCA.

SIMCA	1 predito (3 PC's)	2 predito (3 PC's)	3 predito (3 PC's)	4 predito (4 PC's)	5 predito (3 PC's)	SC*	Acerto (%)
1 real	26	0	2	0	1	0	90
2 real	6	43	10	7	1	2	62
3 real	29	11	71	2	1	1	62
4 real	0	2	1	16	0	0	84
5 real	1	0	2	0	7	0	70
						Média	74

1 – Classe arenosa, 2 – Classe argilosa, 3 – Classe média, 4 – Classe muito argilosa, 5 – Classe siltosa

SC* - Sem classificação

Observa-se que o modelo SIMCA apresentou resultados melhores que o modelo KNN no geral, com uma média de acerto de 74%; no entanto, para a classe 3, observou-se um resultado melhor para o modelo KNN.

Neste momento, é apresentada a primeira estratégia adotada no intuito de melhorar os resultados para os modelos de classificação. Como o trabalho foi voltado para uma demanda do Laboratório de Solos e Resíduos (LSR) da Embrapa – Pecuária Sudeste, retiraram-se as amostras classificadas como siltosas, pois estas são muito incomuns em uma análise de rotina e também pelo número reduzido disponível de amostras desta classe. Junto a isto, outra seleção de amostras foi adotada. Para cada classe, foi calculado o ponto médio, formado pelas médias dos três parâmetros, e em seguida calculou-se o desvio padrão para cada um dos parâmetros. Sendo assim, delimitou-se a área do triângulo das classes texturais, em cada parâmetro, por 2 desvios padrões da média e todas as amostras que se encontraram fora do polígono criado foram retiradas do modelo. Adotou-se esta estratégia pois algumas destas amostras ficavam no limiar de outra classe, comprometendo a classificação do modelo. Visualizam-se detalhes sobre esta estratégia na FIGURA 2.5.1.3.

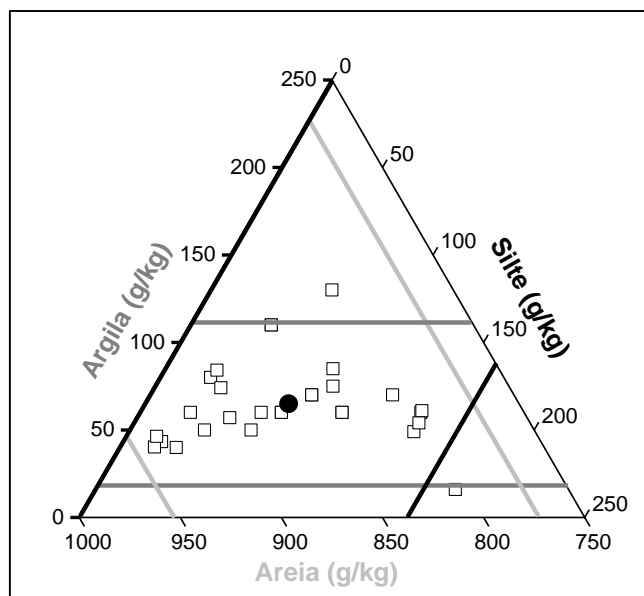


FIGURA 2.5.1.3 - Região do gráfico ternário referente à classe arenosa.

Desta forma, encontram-se nas TABELAS 2.5.1.3 e 2.5.1.4 os resultados para os novos modelos de classificação criados, sem a classe siltosa e com a seleção de amostras para cada classe.

TABELA 2.5.1.3 - Resultados para o 2º modelo de classificação KNN com 4 vizinhos mais próximos.

2º KNN	1 predito	2 predito	3 predito	4 predito	Acerto (%)
1 real	14	2	11	0	52
2 real	2	46	12	2	75
3 real	7	12	91	0	83
4 real	0	4	6	5	33
		1º KNN	51,8 %	Total	61

1 – Classe arenosa, 2 – Classe argilosa, 3 – Classe média, 4 – Classe muito argilosa

TABELA 2.5.1.4 - Resultados para o 2º modelo de classificação SIMCA.

2º SIMCA	1 predito (4 PC's)	2 predito (3 PC's)	3 predito (3 PC's)	4 predito (3 PC's)	SC*	Acerto (%)
1 real	24	0	2	1	0	89
2 real	5	42	7	6	2	68
3 real	27	8	70	4	1	63
4 real	0	1	0	14	0	93
			1º SIMCA	74%	Total	78

1 – Classe arenosa, 2 – Classe argilosa, 3 – Classe média, 4 – Classe muito argilosa
SC* - Sem classificação

Observou-se que esta abordagem melhorou os modelos (9% para KNN e 4% para SIMCA). Após a criação dos modelos, algumas figuras de mérito foram calculadas no intuito de avaliar graficamente os resultados. São elas: exatidão, sensibilidade, taxa de falso positivo e especificidade. Com exceção da exatidão, que é calculada para o modelo como um todo, as outras figuras de mérito são calculadas individualmente para cada classe.

Nas equações 1, 2, 3 e 4 é possível observar como foram realizados os cálculos.

$$\text{Exatidão} = \frac{NA}{NT} \quad (\text{Equação 1})$$

NA é o número total de acertos e NT é o número total de amostras.

$$\text{Sensibilidade de } i = \frac{\sum N_{Ay}}{\sum N_{Ty}} \quad (\text{Equação 2})$$

i é a classe que se deseja calcular a sensibilidade, y são as outras classes com exceção de i e N_{Ay} são todos os acertos de y e N_{Ty} é o número total de amostras de y.

$$\text{Taxa de falso positivo de } i = \frac{NE_i}{NT_i} \quad (\text{Equação 3})$$

i é a classe que se deseja calcular a taxa de alarme falso, NE_i é o número de erros em i e NT_i é o número total de amostras de i.

$$\text{Especificidade de } i = \frac{NAi}{NTi} \quad (\text{Equação 4})$$

i é a classe que se deseja calcular a especificidade, *NAi* é o número de acertos em *i* e *NTi* é o número total de amostras de *i*.

Definidos estes termos, na FIGURA 2.5.1.4 podemos visualizar as quatro figuras de mérito calculadas para cada classe.

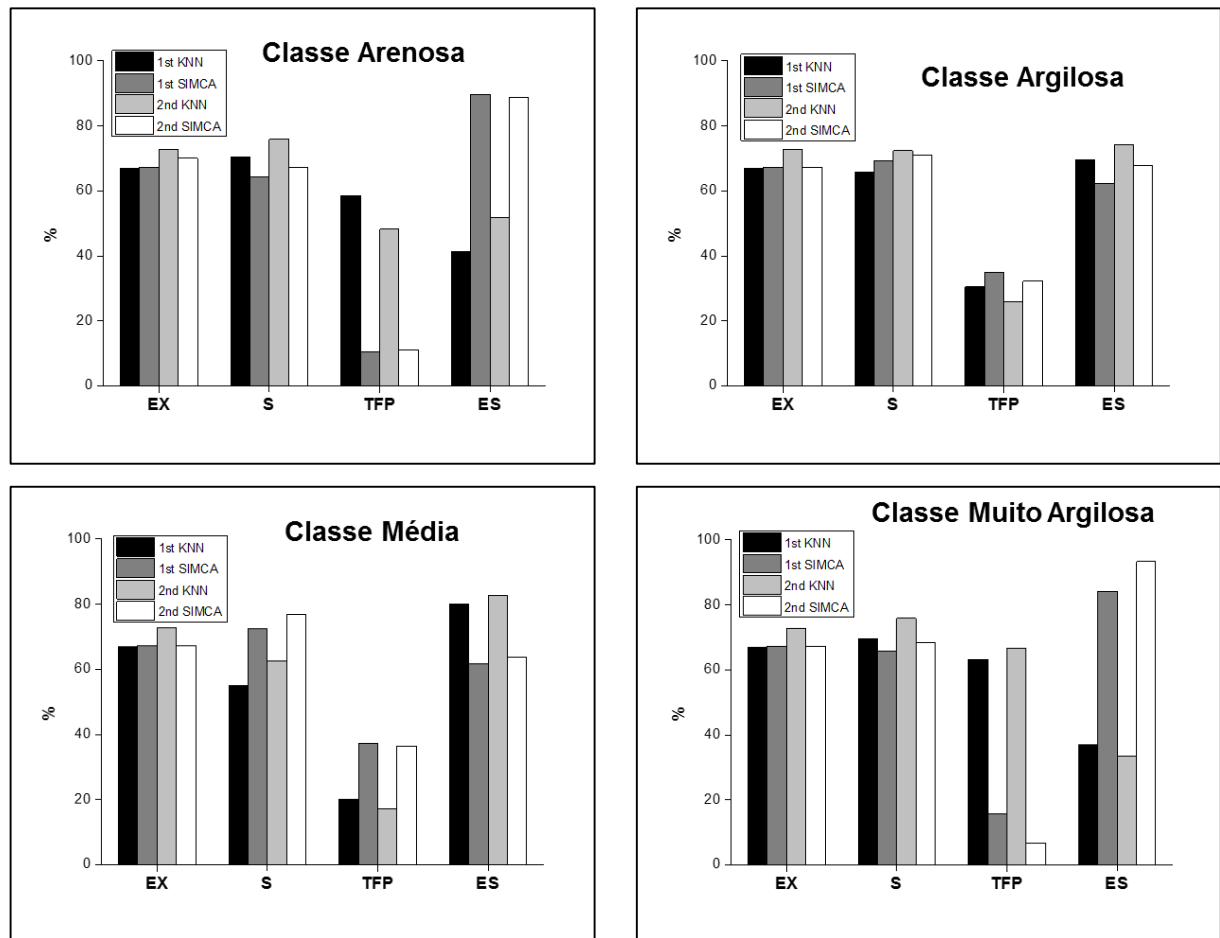


FIGURA 2.5.1.4 - Exatidão, sensibilidade, taxa de falso positivo e especificidade calculadas para os modelos KNN e SIMCA, antes e depois da seleção de amostras.

Podemos observar que para as classes arenosa e muito argilosa, a seleção de amostras se mostrou eficaz, visto que a taxa de falso positivo diminuiu e a especificidade aumentou. Para a classe argilosa, não houve variação significativa em nenhuma das 4 figuras calculadas, e para a classe média houve um aumento na taxa de

falso positivo e uma diminuição na especificidade. Pode-se visualizar também que a exatidão e a sensibilidade dos modelos não variaram muito nem entre um modelo e outro e nem antes e após a seleção de amostras, alcançando valores entre 60 e 70%.

Outra estratégia adotada no intuito de melhorar o modelo foi dividir o espectro completo em 5 partes iguais e criar modelos de classificação KNN e SIMCA para todas as combinações possíveis, isto é, para cada parte do espectro isoladamente, para cada combinação binária, ternária e quaternária. A combinação de quinta ordem era o espectro completo. A FIGURA 2.5.1.5 mostra a exatidão calculada para cada modelo SIMCA (pois mostrou resultados melhores que os modelos KNN).

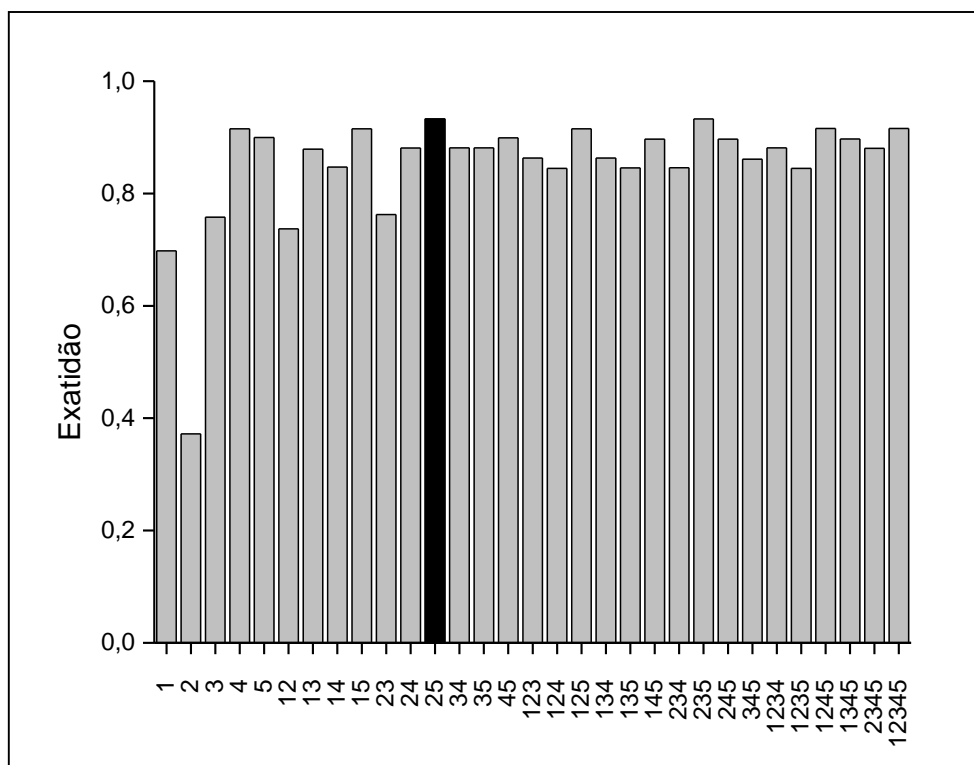


FIGURA 2.5.1.5 - Cada combinação possível com as 5 partes do espectro com sua respectiva exatidão.

A combinação composta pela parte 2 e 5, que compreende a faixa de 5204 a 6400 nm e de 8804 a 10000 nm, destacado em preto, mostrou a maior exatidão, desta forma, foram escolhidas estas regiões do espectro para seguir com os cálculos.

A partir deste ponto, separaram-se 15 amostras por classe para compor o conjunto de calibração e o restante das amostras compuseram o conjunto de validação;

porém, outra medida foi tomada neste momento. Após a retirada das amostras fora do polígono, restaram apenas 15 amostras da classe muito argilosa, ou seja, após a separação destas 15 amostras para o conjunto de calibração, não houve amostras para a validação. Sendo assim, optou-se por retirar também essa classe do estudo, reduzindo a robustez do modelo, porém melhorando o modelo a fim de suprir uma demanda da Embrapa – Pecuária Sudeste que é a necessidade de análises rápidas para textura de solos.

Na FIGURA 2.5.1.6 encontra-se o triângulo das classes texturais, a partir do qual é possível ver como funciona a classificação da textura dos solos, na direção de cada eixo, olha-se o teor de cada uma das propriedades. Juntamente, o mesmo gráfico ternário com todas as amostras utilizadas na situação final dos estudos.

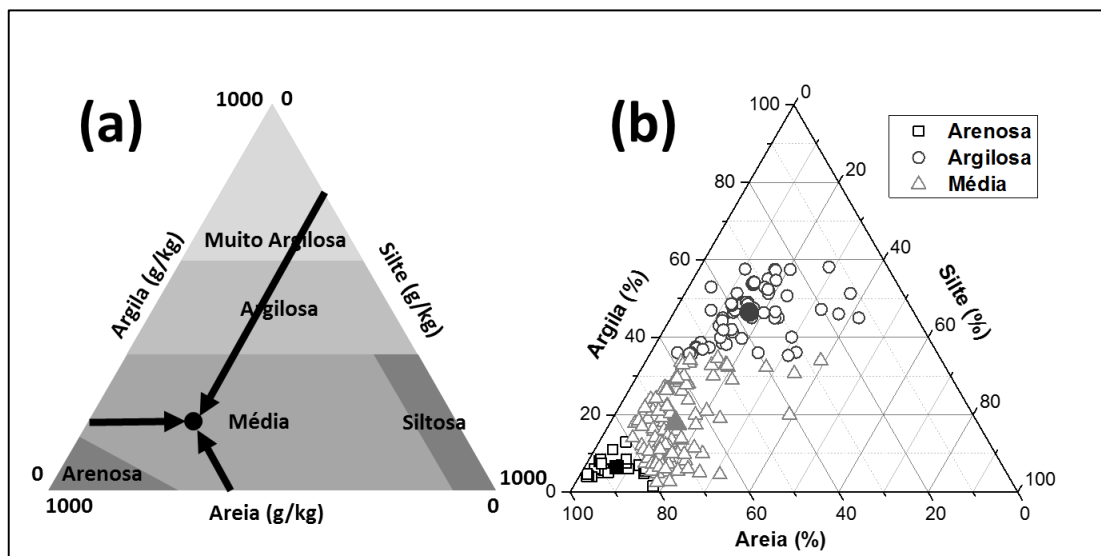


FIGURA 2.5.1.6 - (a) Triângulo das classes texturais com as 5 principais classes delimitadas (adaptado de referência 26) e (b) gráfico ternário com todas as amostras plotadas. Os símbolos preenchidos representam a média para a classe.

Detalhando um pouco mais a situação final em que se encontraram as análises e os resultados que serão mostrados, temos: total de 202 amostras, sendo 45 para criação dos modelos de classificação (15 arenosa, 15 argilosa e 15 média) e as 157 restantes serviram para previsão da textura (12 arenosa, 50 argilosa e 95 média).

Definidos estes termos, na TABELA 2.5.1.5 temos os resultados da predição para o modelo de classificação criado, utilizando-se o KNN, bem como as predições das amostras do conjunto de validação. A célula que está sombreada em cinza mostra os acertos.

TABELA 2.5.1.5 - Predições das amostras usadas na criação do modelo e também das amostras do conjunto de validação para o modelo KNN.

KNN	Conjunto de calibração			Conjunto de validação		
	1 predito	2 predito	3 predito	1 predito	2 predito	3 predito
1 real	11	2	2	8	1	3
2 real	1	9	5	9	33	8
3 real	2	5	8	24	21	50

1 - Classe arenosa, 2 - Classe argilosa, 3 - Classe média

Na sequência, podemos observar, na TABELA 2.5.1.6, os resultados das figuras de mérito calculadas para o conjunto de calibração e validação do modelo KNN.

TABELA 2.5.1.6 - Figuras de mérito calculadas para o modelo KNN de classificação mostrado na tabela anterior.

Figuras de mérito	Conjunto de calibração			Conjunto de validação		
	Arenosa (%)	Argilosa (%)	Média (%)	Arenosa (%)	Argilosa (%)	Média (%)
Exatidão		62,2			58,0	
Sensibilidade	56,7	63,3	56,7	57,2	54,2	57,2
Taxa de falso positivo	26,7	40,0	46,7	33,3	34,0	47,4
Especificidade	73,3	60,0	53,3	66,7	66,0	52,6

Já na TABELA 2.5.1.7, encontram-se os resultados da predição para o modelo de calibração criado, utilizando-se o SIMCA, bem como as predições das amostras do conjunto de validação.

TABELA 2.5.1.7 - Predições das amostras usadas na criação do modelo e também das amostras do conjunto de validação para o modelo SIMCA.

SIMCA	<i>Conjunto de calibração</i>				<i>Conjunto de validação</i>			
	1 predito	2 predito	3 predito	SC*	1 predito	2 predito	3 predito	SC*
1 real	13	1	1	0	7	3	2	0
2 real	0	15	0	0	5	31	12	2
3 real	0	1	14	0	17	26	48	4

1 - Classe arenosa, 2 - classe argilosa, 3 - Classe média

* Sem Classificação

Por fim, na TABELA 2.5.1.8, visualizam-se os valores das figuras de mérito calculadas para conjunto de calibração e validação no modelo SIMCA.

TABELA 2.5.1.8 - Figuras de mérito calculadas para o modelo SIMCA de classificação, mostrado na tabela anterior.

<i>Figuras de mérito</i>	<i>Conjunto de calibração</i>			<i>Conjunto de validação</i>		
	Arenosa (%)	Argilosa (%)	Média (%)	Arenosa (%)	Argilosa (%)	Média (%)
Exatidão		93,3			54,8	
Sensibilidade	96,7	90,0	96,7	54,5	51,4	54,5
Taxa de falso positivo	13,3	0,0	6,7	41,7	38,0	49,5
Especificidade	86,7	100,0	93,3	58,3	62,0	50,5

Observa-se que quando há a seleção das amostras para a criação do modelo, os resultados são bons para SIMCA com exatidão de 93,3 %, e satisfatórios para KNN com exatidão de 62,2 %; porém, quando utilizam-se os modelos para a predição das amostras do conjunto de validação, o modelo KNN apresenta resultados melhores, com exatidão de 58 %, enquanto para o modelo SIMCA, a exatidão foi de 54,8 %. Observa-se também que há uma confusão entre as amostras da classe 2 e da classe 3,

provavelmente devido ao fato de que a área no triângulo das classes texturais dessas duas classes é muito grande, aumentando a chance de erro na predição. Pode ser também pelo fato de o número de amostras nessas duas classes ser maior do que para a classe 1, que apresentou bons resultados de predição. Outra proposta adotada foi utilizar as mesmas amostras de maneira contrária, ou seja, utilizaram-se as 157 amostras na criação dos modelos de classificação e tentou-se a predição das 45 restantes, porém os resultados não são mostrados aqui pois não foram melhores que os já apresentados.

Um dos objetivos principais do trabalho foi criar modelos para prever a propriedade de textura dos solos, caracterizada basicamente pela variação do teor das frações do solo (areia, argila e silte), definidas, por sua vez, pelo tamanho da partícula. Foram criados novos modelos de classificação SIMCA e KNN com outro tratamento dos dados: ao invés de se normalizar os dados e posteriormente derivá-los, optou-se por invertê-los, ou seja, os dados foram derivados e, em seguida, normalizados. Também foram criados modelos com o espectro puro pois, uma vez que a refletância varia com o tamanho de partícula da amostra, a absorvância também variará. Sendo assim, o resultado esperado seria a variação da linha base de amostra para amostra, como mostrado na FIGURA 2.5.1.1.

Pode-se visualizar, portanto, nas TABELA 2.5.1.9 e 2.5.1.10, a matriz de confusão que mostra os acertos dos modelos KNN e SIMCA, criados com o conjunto de calibração, bem como as figuras de mérito calculadas para estes resultados. Lembrando que todos os cálculos foram realizados apenas com os intervalos 2 e 5 do espectro inicial ($5204 - 6400$ e $8804 - 10000 \text{ cm}^{-1}$), e nesta tabela são mostrados os resultados com o espectro sem nenhum tipo de transformação.

TABELA 2.5.1.9 - Matriz de confusão e figuras de mérito para modelo KNN calculado com amostras do conjunto de calibração apenas com os intervalos 2 e 5 do espectro, sem pré-tratamento, com 4 vizinhos.

KNN	1 predito	2 predito	3 predito		EX (%)	S (%)	TFP (%)	ES (%)
1 real	10	1	4	C1		70	33,3	66,7
2 real	2	11	2	C2	68,9	66,7	26,7	73,3
3 real	3	2	10	C3		70	33,3	66,7

TABELA 2.5.1.10 - Matriz de confusão e figuras de mérito para modelo SIMCA calculado com amostras do conjunto de calibração apenas com os intervalos 2 e 5 do espectro, sem pré-tratamento.

SIMCA	1 predito	2 predito	3 predito	SC*		EX (%)	S (%)	TFP (%)	ES (%)
1 real	9	0	6	0	C1		50	40	60
2 real	5	9	1	0	C2	53,3	50	40	60
3 real	4	5	6	0	C3		60	60	40

* Sem classificação

É possível observar que desta forma, ou seja, com apenas os intervalos 2 e 5 e com o espectro puro, o modelo KNN apresenta melhores resultados que o modelo SIMCA, porém não se observa uma melhora considerável em relação aos modelos anteriores quando os dados foram normalizados, derivados e centrados na média.

Já as TABELAS 2.5.1.11 e 2.5.1.12 mostram os resultados dos modelos KNN e SIMCA com o pré-tratamento com 1ª derivada e então normalização.

TABELA 2.5.1.11 - Matriz de confusão e figuras de mérito para modelo KNN calculado com amostras do conjunto de calibração apenas com a parte 2 e 5 do espectro, com 1ª derivada e normalização, com 4 vizinhos.

KNN	1 predito	2 predito	3 predito		EX (%)	S (%)	TFP (%)	ES (%)
1 real	12	0	3	C1		63,3	20	80
2 real	0	9	6	C2	68,9	73,3	40	60
3 real	3	2	10	C3		70	33,3	66,7

TABELA 2.5.1.12 - Matriz de confusão e figuras de mérito para modelo SIMCA calculado com amostras do conjunto de calibração apenas com a parte 2 e 5 do espectro, com 1ª derivada e normalização.

SIMCA	1 predito	2 predito	3 predito	SC*		EX (%)	S (%)	TFP (%)	ES (%)
1 real	11	2	2	0	C1		80	26,7	73,3
2 real	2	12	1	0	C2	77,8	76,7	20	80
3 real	1	2	12	0	C3		76,7	20	80

* Sem classificação

Observa-se que quando há a transformação dos dados através da 1ª derivada e posterior normalização, o modelo SIMCA calculado apresenta uma melhora quando não há transformação dos dados. Para o modelo KNN com os dados transformados, não foi observado mudanças significativas em relação ao modelo KNN anterior.

Após calculados estes modelos, utilizaram-se os mesmos para classificar as amostras do conjunto de validação por textura. Nas TABELAS 2.5.1.13 e 2.5.1.14, encontram-se as matrizes de confusão para as predições dos modelos KNN e SIMCA das amostras do conjunto de validação com o espectro sem transformação.

TABELA 2.5.1. 13 - Matriz de confusão e figuras de mérito para as predições do modelo KNN apenas com os intervalos 2 e 5 do espectro, sem pré-tratamento, com 4 vizinhos.

KNN	1 predito	2 predito	3 predito		EX (%)	S (%)	TFP (%)	ES (%)
1 real	7	1	4	C1		57,2	41,7	58,3
2 real	6	28	16	C2	57,3	57,9	44	56
3 real	26	14	55	C3		56,5	42,1	57,9

TABELA 2.5.1.14 - Matriz de confusão e figuras de mérito para as predições do modelo SIMCA apenas com os intervalos 2 e 5 do espectro, sem pré-tratamento.

SIMCA	1 predito	2 predito	3 predito	SC*		EX (%)	S (%)	TFP (%)	ES (%)
1 real	9	1	2	0	C1		37,2	25	75
2 real	32	12	5	1	C2	40,1	47,7	76	24
3 real	33	18	42	2	C3		33,9	55,8	44,2

Observa-se, neste caso, que as predições para o modelo SIMCA apresentaram resultados piores em relação às predições do modelo KNN.

Já as TABELAS 2.5.1.15 e 2.5.1.16 mostram as matrizes de confusão das predições dos modelos KNN e SIMCA das amostras do conjunto de validação com o espectro com a 1ª derivada e normalizado.

TABELA 2.5.1.15 - Matriz de confusão e figuras de mérito para as predições do modelo KNN apenas com os intervalos 2 e 5 do espectro, com 1ª derivada e normalização, com 4 vizinhos.

KNN	1 predito	2 predito	3 predito		EX (%)	S (%)	TFP (%)	ES (%)
1 real	9	2	1	C1		44,8	25	75
2 real	3	27	20	C2	47,1	43,9	46	54
3 real	32	25	38	C3		58,1	60	40

TABELA 2.5.1.16 - Matriz de confusão e figuras de mérito para as predições do modelo SIMCA apenas com os intervalos 2 e 5 do espectro, com 1ª derivada e normalização.

SIMCA	1	2	3	SC*		EX	S	TFP	ES
	<i>predito</i>	<i>predito</i>	<i>predito</i>			(%)	(%)	(%)	(%)
1 real	10	0	1	1	C1		57,2	9,1	90,9
2 real	5	32	9	4	C2	59,2	57	36	64
3 real	27	11	51	6	C3		67,7	46,3	53,7

Neste caso, para o espectro derivado e normalizado, os resultados foram satisfatórios (entre 55 e 100 %) para o modelo SIMCA e insatisfatórios para o modelo KNN (abaixo de 55 %).

2.5.2 – Análises LIBS

Outra estratégia adotada no intuito de determinar a textura dos solos por um meio rápido, que utilizasse menos reagente e gerasse menos resíduo, foi analisar os solos em LIBS, buscando um perfil espectral que determinasse a textura do mesmo.

Inicialmente foi cogitada a possibilidade de produzir pastilhas com os solos a serem analisados e então levá-las diretamente ao LIBS; porém, logo se descartou esta ideia devido ao fato de que a textura do solo é determinada pelo tamanho de partículas. Utilizar as amostras diretamente no porta-amostra, sem nenhum preparo prévio, também foi descartado devido ao fato da baixa reprodutibilidade e, também, por conta de espalhamento mecânico que poderia acarretar deposição de partículas dentro da câmara de ablação do aparelho.

Sendo assim, optou-se por uma estratégia que encapsularia a amostra em seu estado natural, de modo a fixá-la, sem perder a informação da textura, ou seja, do tamanho de partícula.

Para isso, utilizou-se o método de preparo de amostras descrito no item 2.4.3, e visto de maneira detalhada na FIGURA 2.5.2.1.

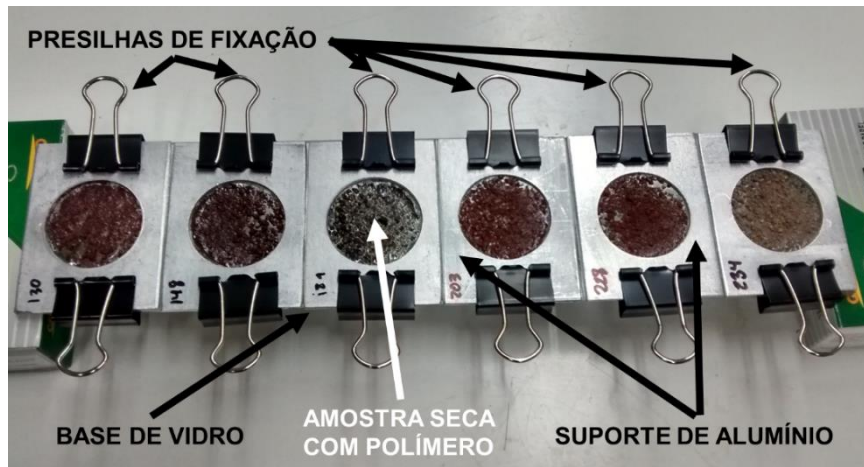


FIGURA 2.5.2.1 - Detalhes do procedimento de preparo das amostras de solo por encapsulamento em polímero, para análises em LIBS.

Analisaram-se as lâminas com os solos aprisionados pelo filme de polímero diretamente no LIBS. Para todos os casos, 4 quadrantes foram delimitados dentro de cada amostra. As matrizes correspondentes a cada quadrante continham 10 colunas e 10 linhas, e o espaço entre cada ponto era de 1 mm, totalizando uma área examinada de 121 mm²; em cada ponto foram dados 10 pulsos de laser, totalizando 1210 espectros por quadrante. Os dados, então, foram tratados igualmente no software Matlab 2009a. Após normalizados (norma = 1) e centrados na média, os dados foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) para novamente observar agrupamentos formados pela diferença de textura de solos entre as amostras analisadas; porém, não houve agrupamentos.

2.5.3 – Imagens hiperespectrais

As imagens hiperespectrais foram geradas da mesma maneira que para os coprólitos no item 1.5.4. A hipótese inicial era que, após a geração das imagens hiperespectrais com os dados de escores das PCA's calculadas, e após colocar todas as imagens na mesma escala, observaríamos uma variação na coloração, que ocorreria devido à variação da composição de cada amostra, variação está relacionada à textura de solo. No entanto, não foi possível concluir essa análise, pois a técnica LIBS determina elementos e suas intensidades de emissão; dessa forma, não seria possível relacionar

essa informação com o tamanho das partículas presentes em uma determinada amostra. Na FIGURA 2.5.3.1 é possível ver algumas imagens hiperespectrais de 4 amostras com texturas diferentes. Vale ressaltar que as imagens hiperespectrais mostradas abaixo são da PC1 para o pulso 2 no intuito de eliminar a camada superficial de polímero que ficou por cima na cápsula com o solo (vide item 2.4.3).

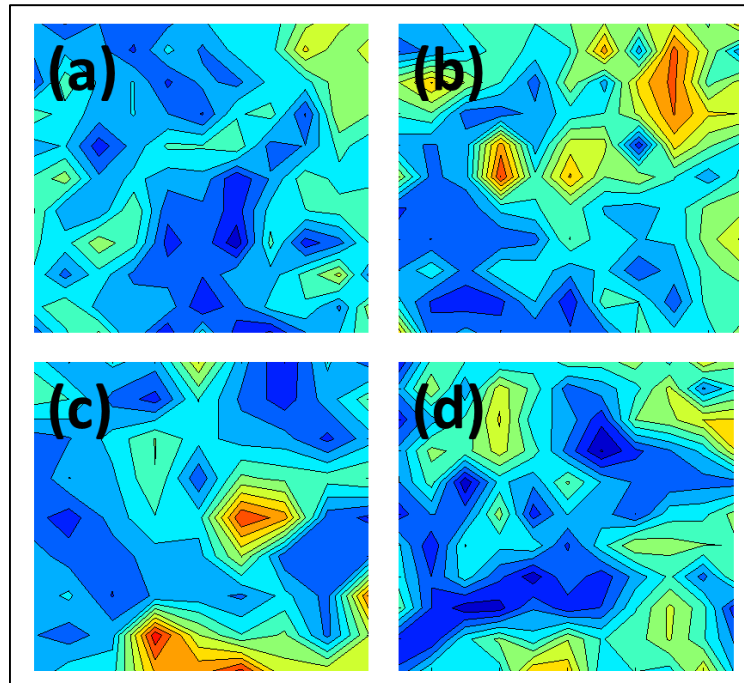


FIGURA 2.5.3.1 - Imagens hiperespectrais de solos. (a) arenosa, (b) argilosa, (c) muito argilosa e (d) média. Todas as imagens estão na mesma escala e são para a PC1 do pulso 2.

2.6 – Conclusões Parciais

Pela revisão de literatura especializada, encontrou-se a possibilidade da utilização da técnica NIRS na determinação de características do solo e, por meio deste trabalho, foi possível confirmar essa possibilidade. No entanto, há dificuldades no processo, visto que a técnica NIRS tem muita sensibilidade com materiais orgânicos, sendo assim, variações nos espectros NIRS nem sempre são referidos apenas às variações no tamanho de partícula do solo, limitando a técnica na determinação dessa característica. Devido à baixa variabilidade das amostras, e também pelo baixo número de amostras, encontrou-se um problema comum na criação de modelos de quantificação e/ou classificação, que é justamente a falta de informações sobre a matriz. Porém, com a seleção de algumas amostras representativas, dentro de cada classe de textura analisada, observou-se ser possível a criação de um modelo de classificação utilizando a ferramenta SIMCA, com percentagens de exatidão na faixa de 86 a 100%. Na tentativa de validar o modelo, a predição das amostras do conjunto de validação não foi satisfatória, visto que ficaram na faixa de 54 e 58 % (SIMCA e KNN respectivamente). Entre os modelos calculados com o espectro puro ou derivados e normalizados, verificaram-se valores satisfatórios para o modelo SIMCA, calculado com o espectro derivado e normalizado, sendo esta condição a eleita como melhor, pois apresentou exatidão na validação de aproximadamente 60%, valor este considerado bom para este tipo de análise.

As tentativas de quantificação e/ou classificação de solos via análises dos espectros LIBS foram frustradas, visto que o LIBS tem a habilidade de identificação dos sinais de emissão dos elementos da tabela periódica na região do espectro eletromagnético no visível. Sendo assim, pouco se consegue extrair de informação sobre tamanho de partícula, ainda que concentrações de alguns analitos talvez sejam maiores em uma determinada fração (areia, argila ou silte) do que em outra. Entretanto, a estratégia de aprisionamento do solo com uma solução de polímero, visto que não havia a possibilidade de criação de pastilhas do solo devido ao fracionamento de partículas maiores em partículas menores, se mostrou uma boa estratégia para o preparo de amostras, trazendo consigo perspectivas para análises de outros materiais, inclusive amostras líquidas.

Capítulo 3

Considerações Finais

3 – Conclusões Finais

O trabalho mostrou que a técnica LIBS tem um potencial muito grande no que concerne à análise de materiais geológicos e coprólitos como forma de explorar a variação do perfil dos principais elementos presentes nestas amostras. A técnica apresentou algumas limitações características, mas não relacionadas com a aplicação mostrada neste trabalho. É possível visualizar também uma lacuna com relação a este tipo de amostra, os coprólitos: observa-se que não há trabalhos de abordagem química com relação à composição desse tipo de amostra.

As análises de solos *via* NIRS também se mostraram eficientes e nos possibilitaram a criação de um modelo que possivelmente poderá ser utilizado na análise de rotina do laboratório de solos da Embrapa Pecuária Sudeste. Observou-se que algumas estratégias abordadas durante o trabalho possibilitaram a melhoria dos modelos.

Capítulo 4

Sugestões para Trabalhos Futuros

4 – Sugestões para Trabalhos Futuros

O presente trabalho apresentou perspectivas importantes, visto que concluímos ser possível a utilização da técnica LIBS na obtenção de *fingerprints* sobre as amostras geológicas e pré-históricas. Uma possibilidade de aprofundamento neste âmbito seria a coleta de amostras de rochas sedimentares, em diversas camadas, no intuito de obter o perfil espectral das mesmas. Isso poderia ser feito principalmente nos lugares onde há vestígios de fósseis e coprólitos, como a região onde foram encontradas e coletadas as amostras de coprólitos utilizadas neste estudo. Se possível a datação de cada camada em que as amostras foram retiradas, seria possível inferir sobre a variação da composição daquela região no que se refere aos elementos estudados. Como se acredita que o Ir (irídio) seja um elemento de origem extraterrestre, o monitoramento deste elemento poderia indicar, caso encontrado, em que época aproximadamente o meteorito que dizimou a população de seres pré-históricos colidiu com a Terra, reforçando esta teoria. Outra possibilidade seria obter um conjunto de amostras de coprólitos maior, englobando o país inteiro, e ver como o perfil espectral das amostras de cada região se comportam.

O estudo realizado sobre as amostras de solos com a técnica LIBS se mostrou ineficaz na predição de textura de solo, no entanto, se isolássemos as três frações do solo e as analisássemos separadamente, poderíamos observar como a concentração dos elementos que caracterizam o solo se comportam dentro de cada fração e, talvez, fazer inferências sobre como os elementos químicos determinam a textura do solo.

A estratégia de encapsulamento do solo através de uma solução de polímero nos trouxe perspectivas de como analisar amostras de difícil preparo devido às altas concentrações de carbono e açúcares, como vinhaça, méis, tintas e óleos por LIBS, visto que alguns elementos importantes na caracterização destes materiais estão em concentrações detectáveis por LIBS.

Referências Bibliográficas

5 – Referências Bibliográficas

1. POUZAR, M.; PRŮŠOVÁ, M.; PROKOPČÁKOVÁ, P.; ČERNOHORSKÝ, T.; WIENERB, J. & KREJČOVÁ, A. "LIBS analysis of chromium in samples of dyed wool fabric". *J. Anal. At. Spectrom.*, **24**: 685-688, 2009.
2. GONÇALVES, M. L. C.; ARAÚJO, A. & FERREIRA, L. F. "Paleoparasitologia no Brasil" *Ciênc. Saúde Colet.*, **7** (1): 191,196, 2002.
3. MARTIN, P.S.; SABELS, B.E. & SHUTLER, D. "Rampart cave coprolite and ecology of the Shasta ground sloth". *Am. J. Sci.*, **259**: 102-127, 1961.
4. POINAR, N. H.; HOFREITER M.; SPAULDING W. G.; MARTIN P. S.; STANKIEWICZ A.; BLAND H. EVERSHERD R. P.; POSSNERT G. & PÄÄBO S. "Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*". *Science* **281**: (5375), 402-406, 1998.
5. HOFREITER M.; POINAR H. N.; SPAULDING W. G.; BAUER K.; MARTIN P. S.; POSSNERT G. & PÄÄBO S. "A molecular analysis of ground sloth diet through the last glaciation" *Mol. Ecol.* **9**: 1975-1984, 2000
6. LOREILLE O.; ROUMAT E.; VERNEAU O.; BOUCHET F. & HÄNNI C. "Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites" *Int. J. Parasitol.*, **31** (10): 1101-1106, 2001.
7. ARGUELLES P.; REINHARD K. & SHIN D.H. "Forensic palynological analysis of intestinal contents of a korean mummy" *Anat. Rec.*, **296** (6): 1182-1190, 2015.
8. ANZANO J. M.; VILLORIA M. A.; GORNUSHKIN I. B.; SMITH B. W. & WINEFORDNER J. D. "Laser-induced plasma spectroscopy for characterization of archaeological material" *Can. J. Anal. Spect.*, **47** (5): 134-140, 2002
9. BRYSBART A.; MELESSANAKI K. & ANGLOS D. "Pigment analysis in Bronze Age Aegean and Eastern Mediterranean painted plaster by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS)" *J. Archaeol. Sci.*, **33** (8): 1095-1104, 2006.
10. ANZANO J.; SANGÜESA S.; CASAS-GONZÁLEZ J.; MAGALLÓN M. A.; ESCUDERO M.; ANWAR J. & SHAFIQUE U. "Analysis of Roman-Hispanic archaeological ceramics using laser-induced breakdown spectroscopy" *Anal. Lett.*, **48** (10): 1638-1643, 2015.
11. LEE D. H.; HAN S. C.; KIM T. H. & YUN J. I. "Highly sensitive analysis of boron and lithium in aqueous solution using dual-pulse laser-induced breakdown spectroscopy" *Anal. Chem.*, **83**: 9456-9461, 2011
12. FENG Y.; YANG J.; FAN J.; YAO G.; JI X.; ZHANG X.; ZHENG X. & CUI Z. "Investigation of laser-induced breakdown spectroscopy of a liquid jet" *Appl. Optics*, **43** (13): C70-C74, 2010.
13. GELADI P.; BURGER J. & LESTANDER T. "Hyperspectral imaging: calibration problems and solutions" *Chemometr. Intell. Lab.*, **72** (2): 209-217, 2004.
14. BURGER J. & GOWEN A. "Data handling in hyperespectral image analysis". *Chemometr. Intell. Lab.*, **108** (1): 13-22, 2011.
15. COPE, E. D. "A contribution to the vertebrate paleontology of Brazil". *P. Am. Philos. Soc.*, **23**: 1-21, 1886.
16. RESENDE, M.; CURI, N.; REZENDE, S. B. & CORRÊA, G. F. "Pedologia: Base Para Distinção De Ambientes". 2ª ed., Viçosa, Editora UFLA, 1997.

17. CAMARGO, O. A.; MONIZ, A. C.; JORGE, J. A. & VALADARES, J. M. A. S. “Métodos de Análise Química, Mineralógica e Física de Solos do Instituto Agrônomo de Campinas”. Campinas, Instituto Agrônomo de Campinas, 2009.
18. FERRARESI, T.M.; SILVA, W.T.L.; MARTIN-NETO, L.; SILVEIRA, P.M. & MADARI, B.E. “Espectroscopia de infravermelho na determinação da textura do solo” *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, **36**: 1769-1777, 2012.
19. SANTOS, G.A.; PEREIRA, A.B. & KORNDÖRFER, G.H., “Uso do sistema de análises por infravermelho próximo (nir) para análises de matéria orgânica e fração argila em solos e teores foliares de silício e nitrogênio em cana-de-açúcar”. *Biosci. J.*, **26**: 100-108, 2010.
20. WILLIAMS P. C.; MACKENZIE S. L. & STARKEY P. M. “Determination of methionine in peas by near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS)” *J. Agric. Food Chem.*, **33**: 811-815, 1985.
21. KRÄHMER A.; ENGEL A.; KADOW D.; ALI N.; UMAHARAN P.; KROH L. W. & SCHULZ H. “Fast and neat – determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy” *Food Chem.*, **181**: 152-159, 2015.
22. CHANG C. W.; LAIRD D. A.; MAUSBACH M. J. & HURBURGH C. R. “Near-infrared reflectance spectroscopy – principal components regression analyses of soil properties” *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **65** (2): 480-490, 2001.
23. VISCARRA ROSSEL R. A.; WALVOORT D. J. J.; MCBRATNEY A. B.; JANIK L. J. & SKJEMSTAD J. O. “Visible, near infrared, mid infrared or combined diffuse reflectance spectroscopy for simultaneous assessment of various soil properties” *Geoderma* **131**: 59-75, 2006.
24. VENDRAME P. R. S.; MARCHÃO R. L.; BRUNET D. & BECQUER T. “The potential of NIR spectroscopy to predict soil texture and mineralogy in Cerrado Latosols” *Eur. J. Soil Sci.*; **63**: 743-753, 2012.
25. FERRARESI T. M.; SILVA W. T. L.; MARTIN-NETO L. SILVEIRA P. M. & MADARI B. E. “Infrared spectroscopy in determination of soil texture” *Ver. Bras, Ciênc. Solo* **36** (6): 1769-1777, 2012.
26. CAMARGO O. A.; MONIZ A. C.; JORGE J. A.; VALADARES J. M. A. S. *Métodos De Análise Química, Mineralógica e Física de Solos do Instituto Agrônomo de Campinas*, Campinas, Instituto Agrônomo, 2009. p. 77.