

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**PAULINO FLORÊNCIO DE SOUZA**

**Determinação direta de silício em folhas de cana-de-açúcar por espectrometria de  
emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)**

**Piracicaba  
2012**

PAULINO FLORÊNCIO DE SOUZA

**Determinação direta de silício em folhas de cana-de-açúcar por espectrometria de  
emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)  
Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011**

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na  
Agricultura, da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e  
no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Krug

Piracicaba  
2012

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Souza, Paulino Florêncio de.

Determinação direta de silício em folhas de cana-de-açúcar por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) / Paulino Florêncio de Souza; orientador Francisco José Krug - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

87 p.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Cana-de-açúcar
2. Espectrometria óptica
3. Folhas (Plantas)
4. Silício I. Título.

CDU 633.61 : 543.42

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco José Krug, pela amizade, orientação e incentivo.

Ao Prof. Dr. Dário dos Santos Jr. do Centro de Ciências Exatas e da Terra - Universidade Federal de São Paulo, Diadema-SP, pela amizade, incentivo, orientações, acalorados conselhos e contribuições nas discussões dos resultados.

Ao Coordenador do laboratório de P&D Wokimar Teixeira Garcia do CTC - Centro de Tecnologia Canavieira, pela amizade, incentivo e apoio na realização deste trabalho.

A Dra. Lidiane Cristina Nunes – Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), pelas orientações, sugestões e apoio.

Ao MSc. Gabriel Gustinelli Arantes de Carvalho – Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), pelas orientações, sugestões e apoio.

Ao MSc. Marcos da Silva Gomes – da UFScar, Universidade Federal de São Carlos – SP, pelo apoio.

Ao Dr. Marcelo Braga Bueno Guerra do Departamento de Solos da UFV - Universidade Federal de Viçosa – MG, pela utilização do  $\mu$ ED-XRF nas determinações de silício.

A Dra. Raffaella Rossetto APTA – Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico do Centro Sul e ao Dr. Carlos Eduardo Faroni do CTC – Centro de Tecnologia Canavieira, pelo fornecimento das amostras de folhas de cana-de-açúcar.

A Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira da Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos - SP, pela utilização do ICP OES.

Ao CENA-USP - Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo.

Ao CTC – Centro de Tecnologia Canavieira, por colocar à disposição o laboratório de P&D.

Aos amigos do Laboratório da Química Analítica “Prof. Henrique Bergamin Filho” do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), Iolanda Rufini, Sheila, Flávio Leme, Quienly Godoi, Gustavo, Paula Packer, Fátima, Claudia e Kennedy Aragão, pela agradável convivência.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos

## DEDICATÓRIA

A Deus, pela vida,

À minha esposa Izabel Christina pelo apoio,

Aos meus filhos Rafael e Isabela,

Aos meus pais Jonas e Celina,

Aos meus irmãos, Joel, Delvino (Dé), Domingos (Dú), Narcisio (Ciso) e  
minhas irmãs, Justiniana (Tina) e Gertrudes (Tude).

*“Feliz é o dia em que aprendemos algo de novo”  
(Henrique Bergamin Filho)*

*“O importante não é progredir depressa, é não cessar de ir sempre adiante”  
(Plutarco)*

## RESUMO

SOUZA, P.F. **Determinação direta de silício em folhas de cana-de-açúcar por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)**. 2012. 87f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2012.

A cultura da cana-de-açúcar no Brasil é uma das atividades mais relevantes na agroindústria nacional devido ao alto potencial de produção e elevada importância econômica de seus subprodutos como *e.g.* açúcar e etanol. Embora o Si não seja considerado um elemento essencial, a adubação silicatada tem proporcionado aumentos apreciáveis na produtividade da cana-de-açúcar e na resistência a algumas pragas e doenças. Ainda não existem métodos bem estabelecidos para a determinação de Si em material vegetal visando à diagnose foliar. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método para determinação de Si em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS). O arranjo experimental foi composto por um laser pulsado de Nd:YAG a 1064 nm (pulsos de 5 ns, 360 mJ, 10 Hz) e os sinais de emissão foram coletados por um telescópio acoplado por fibra óptica ao espectrômetro Echelle com detector ICCD. Amostras laboratoriais consistiram de pastilhas preparadas com folhas de cana-de-açúcar moídas criogenicamente por 40 min. Melhores resultados foram obtidos quando a linha de emissão Si I 212,412 nm foi selecionada e os parâmetros instrumentais foram ajustados em 25 pulsos acumulados,  $50 \text{ J cm}^{-2}$ , diâmetro de focalização de 750  $\mu\text{m}$ , 2,0  $\mu\text{s}$  de atraso e 4,5  $\mu\text{s}$  de integração. Os resultados obtidos por LIBS na análise de pastilhas de 20 amostras laboratoriais foram comparados com os obtidos por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) após decomposição alcalina e por espectrometria de micro-fluorescência de raio-X por energia dispersiva ( $\mu\text{ED-XRF}$ ) após análise direta das pastilhas. Aplicando-se o teste *t* de *Student* pareado, não foram verificadas diferenças significativas ao nível de 95% de confiança nas determinações de Si por LIBS, ICP OES e  $\mu\text{ED-XRF}$ . Os resultados obtidos nesta tese indicam a viabilidade de LIBS para determinação direta de Si em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar e abrem uma expectativa para futuras explorações de LIBS em análises em campo.

Palavras-chaves: Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser; LIBS; silício; análise direta de sólidos; folhas; cana-de-açúcar.

## ABSTRACT

SOUZA, P.F. **Direct determination of silicon in sugarcane leaves by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS)**. 2012 87f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2012.

The high production of sugarcane and its subproducts (*e.g.* sugar and ethanol fuel) make this crop one of the most important for the Brazilian agro-industrial economy. Although Si is not considered an essential element, the Si-based fertilizers have provided considerable improvement in productivity of sugarcane and resistance to some pests and diseases. At moment, there are no well-established methods for the determination of Si in plant materials aiming at nutritional diagnosis. The aim of this work was to develop a method for Si determination in pellets of sugarcane leaves by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). The experimental setup was designed by using a Q-switched Nd:YAG laser (5 ns, 360 mJ, 10 Hz,  $\lambda = 1064$  nm) and the emission signals were collected by lenses into an optical fiber coupled to an Echelle spectrometer equipped with an ICCD. Pellets prepared from cryogenically ground sugarcane leaves were used as laboratory samples. Best results were obtained when the Si I 212.412 nm emission line was selected and the instrumental parameters were adjusted at 25 laser shots,  $50 \text{ J cm}^{-2}$ , 750  $\mu\text{m}$  laser spot size, 2.0  $\mu\text{s}$  delay time and 4.5  $\mu\text{s}$  integration time gate. The results obtained by LIBS in the analysis of pellets of 20 laboratory samples were compared with those from inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) after alkaline digestion and by microenergy dispersive X-ray fluorescence ( $\mu\text{ED-XRF}$ ) after direct analysis of pellets. By applying a paired t-test at 95 % confidence level, there was no significant difference in the Si determination by LIBS, ICP OES and  $\mu\text{ED-XRF}$ . The findings of this thesis indicate the feasibility of LIBS for the direct determination of Si in pellets of sugarcane leaves and open expectations for future investigations of LIBS for field analysis.

Keywords: Laser-induced breakdown spectroscopy; LIBS; silicon; direct solid analysis; leaves; sugarcane.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 -	Áreas produtoras de cana-de-açúcar, etanol e bioeletricidade no Brasil. Figura adaptada do IBGE, Nipe e CTC.....	16
Figura 2.2 -	Numeração da folha diagnóstico pelo sistema de <i>Kuijper</i> .....	22
Figura 2.3 -	Diagrama de um sistema LIBS.....	31
Figura 3.1 -	Sistema LIBS utilizado no Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho” do CENA-USP.....	38
Figura 3.2 -	Vista aproximada do sistema LIBS.....	39
Figura 4.1 -	Imagem da pastilha de folha de cana-de-açúcar (diâmetro = 15 mm) .....	44
Figura 5.1 -	Perfis dos sinais de fluorescência de silício (passo de 100 $\mu\text{m}$ ) obtidos para diferentes tempos de aquisição.....	49
Figura 5.2 -	Correlação entre as intensidades (cps/ $\mu\text{A}$ ) obtidas por $\mu\text{ED-XRF}$ ( $K_{\alpha} = 1,740$ keV) na análise das pastilhas e as concentrações de Si ( $\text{g kg}^{-1}$ ) determinadas por ICP OES após digestão alcalina.....	50
Figura 5.3 -	Curva analítica de calibração para Si por $\mu\text{ED-XRF}$ ( $K_{\alpha} = 1,740$ keV).....	51
Figura 5.4 -	Comparação entre as concentrações de Si determinadas por ICP OES empregando-se a linha Si I 212,412 nm e por $\mu\text{ED-XRF}$ empregando-se $K_{\alpha} = 1,740$ keV.....	52
Figura 5.5 -	Fragmento do espectro de emissão obtido em pastilha de folhas de cana-de-açúcar (CTC16) mostrando o sinal de emissão de Si I 212,412 nm.....	54
Figura 5.6 -	Fragmento do espectro de emissão obtido em pastilha de folhas de cana-de-açúcar (CTC16) mostrando os sinais de emissão de Si I 221,667 e Si I 221,806 nm .....	55
Figura 5.7 -	Fragmento do espectro de emissão obtido em pastilha de folhas de cana-de-açúcar (CTC16) mostrando os sinais de emissão de Si I 251,432, Si I 251,611 e Si I 251,920 nm.....	55
Figura 5.8 -	Fragmento do espectro de emissão obtido em pastilha de folhas de cana-de-açúcar (IAC87-3396) mostrando os sinais de emissão de Si I 288,158 nm .....	56
Figura 5.9 -	Evolução temporal da linha de emissão Si I 212,412 nm em plasma induzido por laser em pastilha da variedade CTC7.....	57
Figura 5.10 -	Correlação entre as concentrações de Si determinadas por ICP OES após digestão alcalina e as áreas integradas dos sinais de emissão obtidos por LIBS usando a linha Si I 212,412 nm.....	59
Figura 5.11 -	Correlação entre as concentrações de Si determinadas por ICP OES após digestão alcalina e as áreas integradas dos sinais de emissão obtidos por LIBS usando a linha Si I 221,667 nm .....	60
Figura 5.12 -	Correlação entre as concentrações de Si determinadas por ICP OES após digestão alcalina e as áreas integradas dos sinais de emissão obtidos por LIBS usando a linha Si I 288,158 nm .....	61
Figura 5.13 -	Efeito da fluência na intensidade de emissão de Si I 212,412 nm em pastilha de folha de cana-de-açúcar (CTC12) para diâmetros de focalização entre 180 e 1050 $\mu\text{m}$ .....	63
Figura 5.14 -	Efeito da fluência na intensidade de emissão de Si I 221,667 nm.....	63

## LISTA DE FIGURAS

Figura 5.15 -	Efeito da fluência na intensidade de emissão de Si I 288,158 nm .....	64
Figura 5.16 -	MEV da cratera formada em pastilha de folha de cana-de-açúcar (CTC 18).....	67
Figura 5.17 -	MEV da cratera formada em pastilha de folha de cana-de-açúcar (CTC 18).....	67
Figura 5.18 -	MEV da cratera formada em pastilha de folha de cana-de-açúcar (IAC 86-7515).....	68
Figura 5.19 -	MEV da cratera formada em pastilha de folha de cana-de-açúcar (IAC 86-7515).....	68
Figura 5.20 -	Fragmentos do espectro mostrando a comparação dos sinais de emissão de Si I 212,412 nm .....	69
Figura 5.21 -	Fragmentos do espectro mostrando a comparação dos sinais de emissão de Si I 288,158 nm.....	70
Figura 5.22 -	Fragmentos do espectro mostrando a comparação dos sinais de emissão de Si I 288,158 nm.....	70
Figura 5.23 -	Correlação dos resultados de concentrações das amostras obtidos por ICP OES após digestão alcalina .....	71
Figura 5.24 -	Correlação dos resultados de concentrações das amostras obtidos por ICP OES após digestão alcalina ).....	72
Figura 5.25 -	Curva analítica de calibração para determinação de Si usando a linha Si I 212,412 nm e 25 pulsos de 50 J cm <sup>-2</sup> .....	74
Figura 5.26 -	Comparação entre os resultados para as amostras de validação obtidos por ICP OES e LIBS usando 50 J cm <sup>-2</sup> .....	75
Figura 5.27 -	Comparação entre os resultados para as amostras de validação obtidos por $\mu$ ED-XRF e LIBS usando 50 J cm <sup>-2</sup> .....	76
Figura 5.28 -	Fragmento do espectro mostrando a linha espectral Si I 212,412 nm e regiões nas vizinhanças desta linha (BG <sub>1</sub> e BG <sub>2</sub> ) para correção de fundo e cálculo do LOD.....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 -	Intervalos de concentrações de macronutrientes nas folhas de cana planta e cana soca.....	17
Tabela 2.2 -	Intervalos de concentrações de micronutrientes nas folhas de cana planta e cana soca.....	18
Tabela 2.3 -	Procedimentos utilizados para determinação de Si em amostras de tecidos vegetais.....	28
Tabela 2.3 -	Procedimentos utilizados para determinação de Si em amostras de tecidos vegetais (continuação).....	29
Tabela 4.1 -	Parâmetros operacionais utilizados no ICP OES modelo Vista RL.....	43
Tabela 4.2 -	Parâmetros operacionais utilizados para determinação de Si por $\mu$ ED XRF.....	45
Tabela 5.1 -	Resultados da determinação de Si por ICP OES após decomposição por digestão alcalina em folhas de cana-de-açúcar.....	47
Tabela 5.2 -	Comparação dos coeficientes de variações na aquisição de sinais de fluorescência por $\mu$ ED-XRF.....	49
Tabela 5.3 -	Linhas de emissão de interferentes nas determinações de Si em folhas de cana-de-açúcar.....	54
Tabela 5.4 -	Condições previamente recomendadas por Nunes para determinação de macro e micronutrientes em tecido vegetal.....	58
Tabela 5.5 -	Concentrações (%) de lignina, celulose e fibra em folhas de cana-de-açúcar.....	66
Tabela 5.6 -	Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de Si em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar utilizando LIBS.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BG - Background

CRM - Material de referência certificado

CV - Coeficiente de variação

ETV-ICP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente empregando atomização eletrotérmica

ETV-ICP-MS - Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente empregando atomização eletrotérmica

FAAS - Espectrometria de absorção atômica com chama

GFAAS - Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite

IAEA - Agência Internacional de Energia Atômica

ICP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente

ICP-MS - Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente

INAA- Análise por ativação neutrônica instrumental

LA-ICP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente empregando ablação com laser

LA-ICP-MS - Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente empregando ablação com laser

LIBS - Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser

LOD - Limite de detecção

LTSD - Distância entre a lente de focalização e a amostra

$\mu$ ED- XRF - Micro fluorescência de raios-X por Energia Dispersiva

NIES - Instituto Nacional de Estudos Ambientais

NIST - Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia

SD - Desvio padrão

SNR - Razão sinal-ruído

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	14
1.1	Objetivos.....	15
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	15
2.1	Cana-de-açúcar no cenário brasileiro.....	15
2.2	Importância dos macro e micronutrientes no desenvolvimento da cana-de-açúcar.....	16
2.3	Importância do silício na agricultura.....	18
2.4	Fontes de silício para fins agrícolas.....	20
2.5	Diagnose foliar.....	21
2.5.1	Importância da diagnose foliar.....	21
2.5.2	Métodos empregados para determinação de silício em tecidos vegetais.....	23
2.6	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser.....	29
2.6.1	Vantagens e limitações de LIBS.....	33
2.6.2	LIBS para análise de tecidos vegetais.....	33
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	37
3.1	Instrumentação.....	37
3.2	Reagentes e soluções.....	40
3.3	Amostras de folhas de cana-de-açúcar.....	41
4	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	41
4.1	Coleta e pré-tratamento das amostras de folhas de cana-de-açúcar.....	41
4.2	Decomposição das amostras de folhas de cana-de-açúcar.....	42
4.3	Determinação de silício por ICP OES.....	42
4.4	Preparo das pastilhas.....	43
4.5	Análises das pastilhas por LIBS.....	43
4.6	Determinação direta de silício por $\mu$ ED-XRF.....	44
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	46
5.1	Determinação de silício por ICP OES e $\mu$ ED-XRF.....	46
5.2	Determinação de silício em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar por LIBS....	53
5.2.1	Avaliação de interferências espectrais nas linhas de emissão de silício.....	53
5.2.2	Avaliação da evolução temporal dos sinais de emissão.....	56
5.2.3	Avaliação da fluência do laser e do diâmetro de focalização.....	58
5.2.4	Comparação de resultados de análises feitas por LIBS, ICP OES e $\mu$ ED-XRF.	72
6.	<b>CONCLUSÕES.....</b>	78
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	79

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar no Brasil é uma das atividades mais relevantes na agroindústria nacional devido ao alto potencial de produção e elevada importância econômica de seus subprodutos como açúcar, etanol, aguardente, energia elétrica entre outros. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo e é o líder mundial na produção de etanol de cana-de-açúcar como fonte energética alternativa.<sup>1</sup>

O silício (Si) não é considerado um elemento essencial para a cana-de-açúcar, mas apenas benéfico, pois proporciona aumento apreciável na produtividade.<sup>2</sup> Em alguns casos, a administração de Si aumentou a produtividade da cana planta e da cana soca de 145 para 161 e de 92 para 112 toneladas de cana por hectare ( $t\ ha^{-1}$ ), respectivamente. Além disso, a administração de Si aumentou a resistência às pragas e doenças.<sup>2</sup> Neste sentido, o desenvolvimento de métodos para determinação de silício visando à diagnose foliar é necessário. Os procedimentos para determinação de Si em plantas descritos na literatura são morosos, exigem protocolos de preparação de amostras relativamente complexos, que podem exigir o uso de reagentes perigosos (*e.g.* ácido fluorídrico), e são de custos relativamente elevados.

Existe um consenso de que o tratamento da amostra previamente à determinação dos analitos consiste na etapa de maior custo e de maior fonte de erros. Assim, o desenvolvimento de métodos de análise direta é uma necessidade cada vez mais presente. Nos últimos anos, duas linhas de pesquisas foram intensificadas: uma delas consiste na busca por métodos de preparo de amostras cada vez mais rápidos e eficientes, e a outra por métodos de análise direta sem nenhum ou com mínimo pré-tratamento da amostra.<sup>3,4</sup> A análise direta de sólidos permite que a determinação dos analitos seja feita diretamente no local de amostragem, simplificando a sequência analítica. Entretanto, ainda são poucos os equipamentos com desempenho apropriado que podem ser levados ao campo para a determinação de elementos químicos em quaisquer tipos de amostras.<sup>3</sup>

A análise direta de amostras por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) vem se mostrando como uma alternativa viável aos métodos bem consolidados de espectrometria atômica. LIBS ocupa um lugar de destaque nos principais periódicos especializados, com um número crescente de publicações (cerca de 600

publicações/ano). Os resultados apresentados na literatura destacam grandes avanços e potencialidades de LIBS para a análise de amostras de interesse ambiental, biológico e industrial de forma rápida, com mínimo ou nenhum preparo de amostra, possibilitando determinações simultâneas, multielementares e *in situ*.<sup>5,6</sup>

Nos últimos 5 anos LIBS vem sendo avaliado pelo Grupo de Espectrometria Atômica do CENA-USP para análise de tecidos vegetais visando à determinação de P, K, Ca, Mg, B, Cu, Fe, Mn e Zn.<sup>7</sup> Os resultados mais recentes indicam que LIBS também apresenta características analíticas apropriadas para a determinação de Si em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar, sendo uma alternativa bastante viável aos métodos atualmente disponíveis.

## 1.1 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método para determinação de Si em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS).

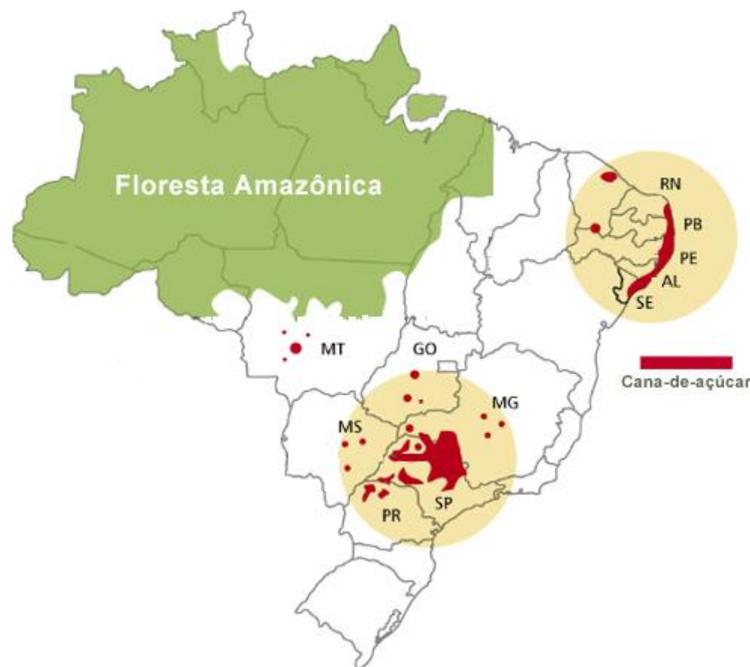
## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Cana-de-açúcar no cenário brasileiro

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) foi introduzida no Brasil no período colonial e se constitui em uma das culturas mais importantes para a economia brasileira. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, ocupando uma posição de destaque, juntamente com a Índia, Estados Unidos, Tailândia, China e México. Na safra de 2011/12 a área plantada no Brasil foi de 8,5 milhões de ha. A projeção para 2022 é que esta área chegue a ocupar 10,5 milhões ha. O Estado de São Paulo é o maior produtor nacional, contribuindo com 4,4 milhões ha (51 %), seguido por Minas Gerais com 769 mil ha (9 %), Goiás com 732 mil ha (8 %), Paraná com 614 mil ha (7 %), Mato Grosso do Sul com 541 mil ha (6 %), Alagoas com 458 mil ha (5 %) e Pernambuco com 298 mil ha (3 %).<sup>8,9</sup>

A produtividade média brasileira para safra 2012/2013 está estimada em  $70,3 \text{ t ha}^{-1}$ , 3 % maior do que na safra 2011/12 ( $68 \text{ t ha}^{-1}$ ). Na safra 2011/12 foram moídas 571 milhões de t de cana-de-açúcar e a previsão para safra de 2012/13 é que sejam moídas cerca de 600 t. Em 2022 espera-se que sejam moídas 969 milhões de t.

O setor sucroalcooleiro brasileiro possui 437 unidades produtoras (usinas), sendo 168 produtoras de etanol, 16 de açúcar e 253 de açúcar e etanol. Recentemente, três novas unidades foram instaladas em Minas Gerais, duas em São Paulo, duas em Goiás, uma em Mato Grosso, uma em Mato Grosso do Sul e uma no Rio de Janeiro. A Figura 2.1 mostra as regiões onde se concentram as maiores plantações de cana-de-açúcar e unidades produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade no Brasil.<sup>10-13</sup>



**Figura 2.1** - Áreas produtoras de cana-de-açúcar, etanol e bioeletricidade no Brasil. Figura adaptada do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), Nipe - Unicamp (Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético - Universidade Estadual de Campinas - SP) e CTC (Centro de Tecnologia Canavieira - SP).

## 2.2 Importância dos macro e micronutrientes no desenvolvimento da cana-de-açúcar

Em função das projeções realizadas para o aumento da produtividade da cana-de-açúcar e a introdução de novas variedades em áreas de solos de maior ou menor fertilidade, a

cultura sempre será dependente de um suporte apropriado de nutrientes para se obter os rendimentos desejáveis. Neste sentido a disponibilidade e o fornecimento adequado dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S), os quais são requeridos em maiores quantidades e possuem papel estrutural nos vegetais e fazem parte de moléculas essenciais, e dos micronutrientes (Fe, Mn, B, Zn, Cu, Ni, Mo e Cl), os quais estão presentes em menores quantidades e exercem atividades bioquímicas e enzimáticas, são de fundamental importância para se assegurar o desenvolvimento apropriado da cana-de-açúcar. As Tabelas 2.1 e 2.2 mostram os intervalos adequados das concentrações de macro- e micronutrientes, expressos em matéria seca nas folhas de cana planta e cana soca.<sup>14</sup> Cabe informar que a cana planta é a cana de açúcar derivada do primeiro plantio, a qual é a mais produtiva, e a de segundo corte é chamada de cana soca. Do terceiro corte em diante é chamada de ressorca. Normalmente a cana-de-açúcar suporta, em média, até cinco cortes, quando então se faz a reforma do canavial.

**Tabela 2.1** – Intervalos de concentrações de macronutrientes nas folhas de cana planta e cana soca.

Nutriente	Cana planta <sup>15, 16</sup>	Cana soca <sup>15, 16</sup>
	Concentração (g kg <sup>-1</sup> )	
<b>N</b>	19 - 21	20 - 22
<b>P</b>	2,0 - 2,4	1,8 - 2,0
<b>K</b>	11 - 13	13 - 15
<b>Ca</b>	8 - 10	5 - 7
<b>Mg</b>	2 - 3	2,0 - 2,5
<b>S</b>	2,5 - 3,0	2,5 - 3,0

**Tabela 2.2** – Intervalos de concentrações de micronutrientes nas folhas de cana planta e cana soca.

Nutriente	Cana planta <sup>15,16</sup>	Cana soca <sup>15,16</sup>
	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )	
<b>B</b>	15 - 50	-
<b>Cu</b>	8 - 10	8 - 10
<b>Fe</b>	200 - 500	80 - 150
<b>Mn</b>	100 - 250	50 - 125
<b>Zn</b>	25 - 50	25 - 30
<b>Mo</b>	0,15 - 0,30	não disponível
<b>Ni</b>	não disponível	não disponível
<b>Cl</b>	não disponível	não disponível

### 2.3 Importância do silício na agricultura

Embora o Si não seja classificado como um elemento essencial, pois as plantas conseguem completar todo seu ciclo na sua ausência, ele é considerado um “elemento benéfico”. Cabe destacar que o Si foi incluído como nutriente benéfico para o cultivo de cana-de-açúcar de acordo com a Legislação para Produção e Comercialização de Fertilizantes e Corretivos, pelo decreto-lei número 4.954 de 14 de janeiro de 2004.<sup>15,17</sup>

O Si é o segundo elemento mais abundante na crosta terrestre, sendo o óxido de silício (SiO<sub>2</sub>) o mineral mais abundante nos solos. O Si contido nos minerais do solo original, ou neoformado, somente poderá ser absorvido pela planta após sofrer decomposição devida ao intemperismo, sendo absorvido pelas raízes das plantas na forma de ácido monossilícico (H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>).<sup>18,19</sup> O quartzo é reconhecidamente a forma mais estável de SiO<sub>2</sub> em condições normais de temperatura e pressão, e a solubilidade varia desde 10<sup>-2,74</sup> mol L<sup>-1</sup> para sílica amorfa até 10<sup>-3,10</sup> mol L<sup>-1</sup> para o quartzo de acordo as reações de equilíbrio (1) e (2).<sup>20</sup>

Reações de equilíbrio	$\log K^o$	
$SiO_{2(amorfo)} + 2H_2O \rightleftharpoons H_4SiO_4^o$	- 2,74	(1)
$SiO_{2(solo)} + 2H_2O \rightleftharpoons H_4SiO_4^o$	- 3,10	(2)

A formação de íons silicato pode ocorrer de acordo com as seguintes reações de equilíbrio:<sup>20</sup>

Reações de equilíbrio	$\log K^o$	
$H_4SiO_4^o \rightleftharpoons H_3SiO_4^- + H^+$	- 9,71	(3)
$H_4SiO_4^o \rightleftharpoons H_2SiO_4^{2-} + 2H^+$	- 22,98	(4)
$H_4SiO_4^o \rightleftharpoons H SiO_4^{3-} + 3H^+$	- 32,85	(5)
$H_4SiO_4^o \rightleftharpoons SiO_4^{4-} + 4H^+$	- 45,95	(6)
$4H_4SiO_4^o \rightleftharpoons H_6Si_4O_{12}^{2-} + 2H^+ + 4H_2O$	- 13,32	(7)

Assim, a solubilidade do silício está relacionada com as diferentes formas de sílica mineral presente no solo, sendo que as espécies iônicas dependem do pH do solo. Considerando-se os valores de pH normalmente encontrados na maioria dos solos,  $H_4SiO_4$  é a espécie predominante na solução do solo.<sup>20</sup>

Após absorção,  $H_4SiO_4$  é depositado nas paredes das células da epiderme, contribuindo de maneira positiva no aspecto estrutural, promovendo uma diminuição do acamamento, reduzindo a taxa de transpiração, maior tolerância à falta de água durante os períodos de baixa umidade do solo, e aumentando a resistência da planta contra pragas e doenças. O transporte do  $H_4SiO_4$  é realizado através do xilema e pode ser regulado pela transpiração. Sua absorção é de natureza não seletiva e passiva, sendo depositado nas lâminas e bainhas foliares, colmos, cascas e raízes. Todas as plantas contêm Si em seus tecidos, cujas concentrações variam entre 0,1 e 10% m/m, com base na matéria seca.<sup>21</sup> Na cana-de-açúcar as concentrações de Si na matéria seca podem variar de 0,14% em folhas jovens a 6,7% em folhas mais velhas.<sup>2, 22, 23</sup>

O Si absorvido tem efeitos benéficos relacionados, principalmente, à resistência da planta contra a ação de insetos (pragas), nematóides e ao controle de várias doenças, principalmente, as fúngicas, reduzindo a necessidade da aplicação de fungicidas.<sup>22, 24</sup> A

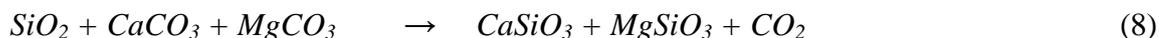
resistência e os mecanismos de defesa das plantas estão associados aos constituintes da parede celular (celulose, hemicelulose, pectinas, glicoproteínas, lignina) tornando as enzimas de degradação menos acessíveis. A broca do colmo (*Eldana saccharina*) é uma das pragas mais prejudiciais à cana-de-açúcar. Estudos conduzidos em viveiros na África do Sul, onde seis variedades comerciais de cana-de-açúcar foram tratadas com doses de silicato de cálcio e infestadas artificialmente com *E. saccharina*, mostraram aumentos significativos na resistência à praga seis meses após a infestação.<sup>25-30</sup> Em outras culturas, como por exemplo a de arroz, observou-se que a incidência de doenças (e.g. escaldadura da folha, mancha marrom e podridão do colmo) e a resistência às pragas (e.g. larva do colmo) podem ser controladas com adubação silicatada.<sup>19</sup>

A monocultura de cana-de-açúcar é reconhecida como uma acumuladora de Si<sup>22, 23</sup>. Uma produção de 100 t ha<sup>-1</sup> de cana-de-açúcar pode remover cerca de 300 kg ha<sup>-1</sup> de Si do solo. Em locais onde a produtividade é mais elevada, esta quantidade pode chegar a 500 kg ha<sup>-1</sup> Si. A questão da adubação silicatada torna-se bastante relevante principalmente nos casos de solos contendo baixo teor de Si solúvel (< 20 mg kg<sup>-1</sup>) como, por exemplo, os arenosos. Cabe destacar que em algumas regiões do mundo a queda de produtividade do arroz também foi atribuída à diminuição de Si solúvel no solo.<sup>31, 32</sup>

A importância do Si na agricultura é tão relevante, que, desde 1999, é realizado o evento “*The International Conference on Silicon in Agriculture*”, que ocorre a cada três anos, com o objetivo de discutir a dinâmica do Si no sistema solo-planta, os mecanismos de transporte do Si, os mecanismos de resistência às pragas e doenças, e sua relevância na produtividade de diversas culturas.

## 2.4 Fontes de silício para fins agrícolas

Os silicatos são as principais fontes de Si na agricultura e podem ser aplicados na forma de pó, granulado ou líquida, via foliar ou diretamente no solo. As escórias siderúrgicas são as fontes mais abundantes de silicatos e as de menor custo. As provenientes da siderurgia do ferro e do aço são originárias do processamento em altas temperaturas, geralmente acima de 1400 °C, pela reação do calcário (calcítico, magnesiano ou dolomítico) com a sílica (SiO<sub>2</sub>) presente no minério de ferro, de acordo a reação (8).<sup>33-35</sup>



A solubilidade do Si nos diferentes tipos de escórias é muito variável. De forma geral, as escórias de alto forno apresentam maiores teores de Si, mas com baixa solubilidade. As de aciarias (produção de aço) apresentam menores teores de Si, porém na forma mais solúvel.

As escórias devem apresentar algumas características como, por exemplo, disponibilidade de Si para as plantas, conter Ca e Mg, apresentar propriedades físicas que facilitem sua aplicação mecanizada, e baixa concentração ( $< 0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) de elementos potencialmente tóxicos, como Pb, Cd, As e Cr. No campo, os silicatos granulados são aplicados em linhas, juntamente com fertilizantes contendo N, P e K, próximo ao sistema radicular. Este procedimento favorece a absorção pelas plantas, reduz o custo da formulação do fertilizante, tem ação de efeito corretivo no pH do solo e concorre para a diminuição da atividade dos íons  $\text{Al}^{3+}$ . A saturação de bases aumenta enquanto a saturação de alumínio diminui, em decorrência da reação dos ânions  $\text{SiO}_3^{2-}$  com os prótons de hidrogênio, conforme as reações (09), (10) e (11):<sup>33-35</sup>



Cabe destacar que trabalhos realizados em campo no plantio da cana-de-açúcar demonstraram que a aplicação de  $4 \text{ t ha}^{-1}$  de Si, com fontes consideradas não convencionais (*e.g.* cimento), resultaram em ganhos médios de  $14 \text{ t ha}^{-1}$ .<sup>34, 36</sup>

A cana-de-açúcar responde favoravelmente à adubação com Si principalmente nos solos pobres deste elemento ( $< 20 \text{ mg kg}^{-1}$ ).<sup>2, 33-35, 37</sup>

## 2.5 Diagnose foliar

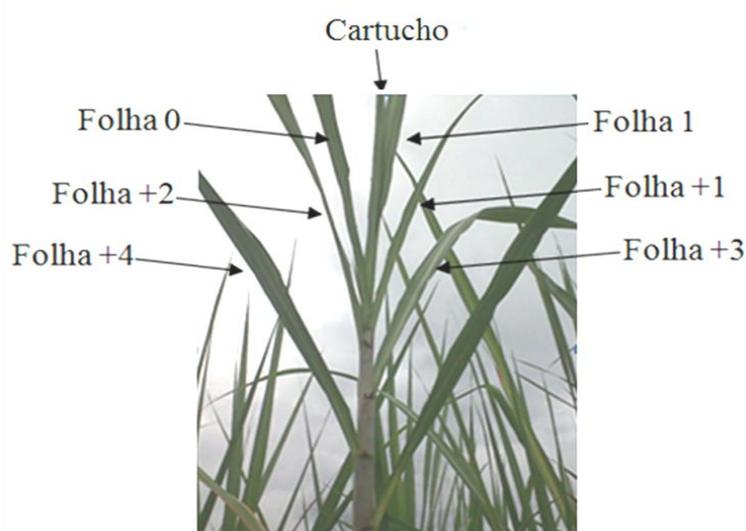
### 2.5.1 Importância da diagnose foliar

Em geral, a diagnose foliar baseia-se na determinação do teor de macro (N, P, K, Ca,

Mg e S) e de micronutrientes (Fe, Mn, B, Zn, Cu) presentes nas amostras de folhas (folhas-diagnóstico) da cultura de interesse com o objetivo de avaliar, principalmente, o estado nutricional da planta. Com relação aos demais micronutrientes (Mo, Cl e Ni), raramente determina-se Mo, e não há referências no Brasil sobre a determinação de Cl e Ni. O Si, por ser um elemento benéfico, é possível prever que deverá ser incluído nas análises foliares quando houver um método devidamente validado.

Ao se determinar a concentração dos elementos presentes em uma folha ou em parte dela, obtêm-se um diagnóstico do estado nutricional da planta. A amostragem de folhas em cana planta é feita entre 4 e 6 meses após a germinação, ao passo que em cana soca é feita aos 4 meses após a brotação.<sup>15</sup> Recomenda-se coletar entre 20 e 30 folhas por talhão uniforme, sendo a folha dividida em três partes, selecionando-se o terço médio com aproximadamente 30 cm. Para cana-de-açúcar, a folha-diagnóstico é a primeira folha da haste ou barbela da bainha conhecida como folha TVD (do inglês “*Top Visible Dewlap*”), ou folha +1 (*Kuijper*). A Figura 2.2, mostra a numeração da folha-diagnóstico na etapa de coleta pelo sistema de *Kuijper*.<sup>15, 16</sup>

Experimentos realizados em campo indicaram que rendimentos desejáveis na produção de cana-de-açúcar foram observados quando as folhas TVD apresentaram pelo menos 1,0 % de Si, e que teores menores que 0,25 % Si diminuiriam 50 % do potencial de produção, justificando-se, assim, esta estratégia de amostragem.<sup>38, 39</sup>



**Figura 2.2** - Numeração da folha-diagnóstico pelo sistema de *Kuijper*<sup>15</sup>.

## 2.5.2 Métodos empregados para determinação de silício em tecidos vegetais

Na literatura existem vários artigos que descrevem procedimentos de preparo das amostras para determinação de Si.<sup>3</sup> Pode-se inferir que os métodos para a determinação de Si em materiais agrônômicos e foliares não são bem estabelecidos e/ou bem validados devido à carência de materiais de referência certificados (CRMs) destas matrizes para este elemento. Este aspecto reflete a falta de métodos confiáveis para a determinação de Si em materiais vegetais.

O método gravimétrico baseado na fusão alcalina da sílica e utilizado para determinação de Si em tecidos vegetais não é frequentemente utilizado em rotina, devido a pouca praticidade para obter e pesar o Si na forma de SiO<sub>2</sub>. É importante mencionar que são utilizados fornos elétricos (mufla) com elevado consumo de energia elétrica e com custo relativamente alto devido à necessidade de se utilizar cadinhos de platina, e exigindo o uso de HF para solubilização da amostra após a fusão.<sup>36, 40</sup> Cabe destacar que os procedimentos de oxidação por via seca são passíveis de contaminação e de perdas de amostra na forma de aerossol sólido (evolução de fumaça), aumentando os riscos de erros sistemáticos. Na prática, o que se observa na literatura é uma preferência pela espectrometria de absorção molecular (métodos colorimétricos) e pela espectrometria de emissão óptica (ICP OES). O método espectrofotométrico de absorção molecular baseia-se na reação entre o ácido silícico com o ácido molíbdico [H<sub>4</sub>(SiMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>)], resultando na formação do complexo sílico-molíbdico de coloração amarela.<sup>24, 31, 36, 40, 41</sup> Existem duas formas desse complexo: o ácido  $\alpha$ -sílico-molíbdico e o ácido  $\beta$ -sílico-molíbdico.<sup>24, 31, 41</sup>

Fox et al.<sup>42</sup> determinaram Si em tecido vegetal de cana-de-açúcar por espectrofotometria de absorção molecular após fusão alcalina com NaOH. A amostra (500 mg) foi previamente incinerada em cadinho de níquel em mufla a 550 °C. Após obtenção das cinzas, adicionaram-se 5 mL de uma solução 15% m/v NaOH e o cadinho foi colocado sobre uma chapa elétrica para evaporação da fase aquosa. Posteriormente, fez-se a fusão com auxílio de bico de Mecker por um período de 10 min. O material sólido resultante foi dissolvido com solução 0,6 mol L<sup>-1</sup> HCl e a determinação de Si foi realizada por método espectrofotométrico a 660 nm.

Furlani et al.<sup>40</sup> adaptou o método utilizado por Fox et al.<sup>42</sup> para determinar Si em folhas de milho, sorgo, cana-de-açúcar, capim, arroz, amendoim, bambu, e eucalipto. Os autores pesaram 100 mg da amostra de tecido vegetal em cadinho de níquel e a amostra foi

incinerada numa mufla entre 450 e 500 °C por 30 min. Após o resfriamento, adicionou-se 1 mL de uma solução 10% m/v NaOH, e o cadinho foi recolocado na mufla a 400 – 450 °C por 20 min. O Si foi determinado pelo método espectrofotométrico e os teores encontrados variaram de 3,0 a 22,1g kg<sup>-1</sup>.

Elliott e Snyder <sup>41</sup> propuseram um novo método de digestão com NaOH em frasco fechado colocado em autoclave, o qual foi denominado “AID” (do inglês *autoclave-induced digestion*) e o compararam com o método de fusão alcalina para determinação de Si em tecido vegetal. Os autores utilizaram seis amostras de palha de arroz, previamente secas a 60 °C por 48 h, e moídas em moinho de facas tipo Wiley, obtendo-se amostras com partículas menores que 840 µm (20 mesh). O método consistiu em pesar 100 mg da amostra em tubos de polietileno (lavados previamente com solução 100 mL de solução de 0,1 mol L<sup>-1</sup> NaOH) e umedecidas com 2 mL de solução de 50 % v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em cada tubo de polietileno adicionaram-se 4,5 g de solução 50% m/v NaOH. Os tubos não foram totalmente fechados com as tampas plásticas. As amostras foram colocadas em autoclave em suporte apropriado e submetida a 138 kPa (~ 1,4 atm) e 126 °C, por 1 h. Após resfriamento, as amostras foram diluídas com água desmineralizada a 50 mL. No método de fusão alcalina, 100 mg de amostra de palha de arroz foram pesadas em cadinhos de níquel, e incineradas em mufla, inicialmente a 300 °C, por um período inicial de 30 min, e depois a 550 °C por 30 min. Após o resfriamento, adicionaram-se 4 g de solução de 50 % m/v NaOH às cinzas obtidas, com posterior evaporação em chapa aquecedora. O resíduo foi fundido com auxílio de bico de Mecker durante 10 min e, após novo resfriamento, adicionaram-se 35 mL de água desmineralizada sobre o vidro formado, deixando-se em repouso por uma noite.

As determinações de Si nas soluções preparadas após digestão com NaOH utilizando a AID e após fusão com NaOH (mufla) foram realizadas colorimetricamente a 650 nm. Coeficiente de correlação linear ( $r = 0,999$ ) foi obtido comparando os dois métodos e o CV dos resultados variaram de 2,3% a 3,6%. O grande atrativo do método proposto foi a redução das etapas de preparo da amostra e conseqüentemente, redução do tempo total de análise. Cabe ressaltar que o método proposto por Elliott e Snyder <sup>41</sup> é um dos mais utilizados para determinação de Si em material vegetal.

Korndörfer et al. <sup>34</sup> fizeram uma modificação no método proposto por Elliott e Snyder <sup>41</sup> para determinação de Si em tecido vegetal. A modificação consistiu em diminuir de 4,5 g para 1,5 g a massa da solução de NaOH 50 % m/v e colocar a mistura em banho maria a 85 °C por 1 h até a evolução total dos gases formados. Posteriormente, os tubos foram fechados e

colocados em autoclave a 123 °C e 1,5 atm durante 1 h. Para as amostras não digeridas completamente, recomendaram-se acrescentar mais 1 mL de solução 50% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e retornar os tubos para a autoclave. A determinação de Si foi realizada colorimetricamente a 410 nm. Além da digestão alcalina, métodos de decomposição para a determinação de Si empregando-se digestões assistidas por radiação micro-ondas são descritas na literatura, utilizando-se misturas de HNO<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HNO<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + HF+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, HNO<sub>3</sub>+HF, HCl + HF e HNO<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+HBF<sub>4</sub>.<sup>43</sup> Neste caso a determinação de Si nos digeridos pode ser feita por espectrometria de absorção atômica com chama acetileno-óxido nitroso (FAAS), ICP OES e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS).<sup>36, 44, 45</sup> Estas técnicas proporcionam limites de detecção e reprodutibilidade apropriadas para determinar Si em tecidos vegetais.<sup>46</sup> No caso das determinações de Si por ICP OES após digestão ácida contendo HF, o excesso de fluoreto deve ser removido do digerido ou complexado com H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

Haysom et al.<sup>47</sup>, compararam o método da fusão com NaOH com um método de digestão assistida por radiação micro-ondas para a determinação de Si em amostras de folhas de arroz e de cana-de-açúcar. O método da fusão com NaOH consistiu em pesar 0,5 g da amostra em cadinho de níquel com posterior aquecimento em mufla a 600 °C, inicialmente por 4 h. Após resfriamento, 2,5 g de NaOH pura foram adicionadas no cadinho e recolocados em mufla a 500 °C por 1h, e permanecendo mais 30 min. na mufla. A amostra foi retomada com água deionizada e o excesso de NaOH foi neutralizado com solução 2 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>, utilizando-se solução de fenolftaleína indicador de neutralização. A solução foi transferida para balão volumétrico de 500 mL e o Si foi determinado por ICP OES a 251,611nm. No método de decomposição assistida por micro-ondas utilizaram-se 200 mg da amostra, 3 mL de solução 70% HNO<sub>3</sub> e 2 mL de solução 30 % v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após finalização do programa de aquecimento e resfriamento da solução da amostra, adicionaram-se 20 mL de uma solução 10% m/v NaOH, e completou-se a digestão assistida por radiação micro-ondas. Após finalização do programa de aquecimento e resfriamento, a amostra foi neutralizada com solução de 2 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. A solução foi transferida para balão volumétrico de 500 mL e a concentração de Si foi determinada por ICP OES a 251,611nm. Os autores obtiveram um coeficiente de correlação linear de  $r = 0,9998$  ao compararem ambos os métodos. Para validação do método proposto empregou-se CRM NCS DC 73350 (folha de álamo), com valor certificado de  $(7,1 \pm 0,06)$  g kg<sup>-1</sup> Si, e o resultado encontrado foi de  $(6,0 \pm 0,03)$  g kg<sup>-1</sup> Si.

Kraska e Breitenbeck<sup>44</sup> propuseram um método de preparo de amostra para

determinação de Si em tecidos vegetais, o qual foi comparado com procedimentos propostos por Elliott e Snyder<sup>41</sup> e por Haysom et al.<sup>47</sup> O método proposto consistiu em digerir 100 mg de amostra em tubo de polietileno, utilizando 2 mL de 30% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 5 gotas de álcool octílico (para redução da espuma formada durante a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O tubo de polietileno foi transferido para estufa a 95 °C por 30min. Após este período foram adicionados 4 mL de solução 50 % m/v NaOH e os tubos retornados à estufa por mais 4 h. As amostras foram retiradas e 1 mL de solução 5 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>F foram adicionados. O método de adição de analito foi utilizado para verificar a exatidão do procedimento proposto. O Si foi determinado pelo método colorimétrico do azul de molibdênio a 660 nm e por ICP OES. A porcentagem de recuperação obtida do método foi de 98%. Os autores recomendaram que as soluções-padrão utilizadas para calibração do ICP OES devem ser preparadas em meio alcalino.

Feng et al.<sup>48</sup> determinaram Si e outros elementos em amostras de tecidos vegetais por ICP-MS após digestão assistida por radiação micro-ondas. No método proposto, utilizaram-se 0,5 g de amostras, 5 mL de HNO<sub>3</sub> e 0,1 mL de HF. O excesso de HF foi neutralizado com 6 mL de 5% m/v H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e as soluções foram analisadas por ICP-MS. Para a determinação de Si, foram utilizados CRMs de folha de macieira (NIST 1515) e acículas de pinho (NIST 1575). Cabe destacar que os CRMs analisados não apresentam propriedade certificada para Si apenas o NIST 1575 apresenta valor consensual de 814 mg kg<sup>-1</sup> Si. Os valores de Si encontrados no método proposto foram de 944 ± 200 mg kg<sup>-1</sup> no NIST 1515 e 1119 ± 282 mg kg<sup>-1</sup> no NIST 1575.

Guntzer et al.<sup>49</sup> propuseram método para dissolução de fitólitos<sup>49</sup> de Si em tecidos vegetais utilizando mistura de Tiron, nome comercial do reagente (ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benzenodissulfônico, sal sódico monohidratado). Para obtenção dos fitólitos, pesaram-se 0,5 g de amostras em tubos de PTFE (polytetrafluoroetileno), e fizeram-se a decomposição com 8,5 mL de 65% v/v HNO<sub>3</sub> e 1,5 mL de 70% v/v HClO<sub>4</sub>. A decomposição das amostras no tubo de PTFE foi realizada em três etapas: Na primeira etapa, os tubos foram aquecidos a 60 °C, durante 40 min. Na segunda etapa, os tubos foram aquecidos a 100 °C durante 40 min, e na terceira etapa os tubos foram aquecidos a 115 °C durante 90 min. Após a decomposição, a solução da amostra foi filtrada em membrana de 0,45 µm. Os fitólitos retidos na membrana foram analisados por microscopia óptica. O filtrado foi diluído 15 vezes e analisado por ICP OES com vaporização eletrotermica (ETV-ICP OES) para verificar a presença de Si solúvel. A massa dos fitólitos (69,1 e 76,1 mg) foi transferida para tubos de polipropileno, adicionaram-se 30 mL de solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> Tiron (pH 10,5) e a mistura foi aquecida em

banho maria a 85 °C sob agitação horizontal durante 1h. Após resfriamento, adicionaram-se 10 mL de solução 30% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com a finalidade de eliminação do Tiron e para reduzir possíveis efeitos de matriz durante as análises por ETV-ICP OES. Para comparar o método de extração com Tiron, utilizou-se o método de fusão com LiBO<sub>2</sub>. Para a fusão com LiBO<sub>2</sub> pesaram-se 200 mg de amostra e adicionaram-se 500 mg de LiBO<sub>2</sub> em cadinho de grafite e a mistura foi aquecida numa mufla a 1010 °C durante 25 min. Após resfriamento, o vidro foi diluído com 50 mL de solução 2,4 mol L<sup>-1</sup> HCl, completando-se o volume com água bidestilada a 100 mL, e filtrou-se a solução através de membrana de nitrato de celulose de 0,2 µm e determinou-se o Si por ETV-ICP OES. Os coeficientes de correlação lineares obtidos para ambos os métodos de comparação (extração de fitólitos e fusão por LiBO<sub>2</sub>) foram de r = 0,9956. Os autores concluíram que o método proposto pode ser empregado para análises de diversas matrizes.

Poucos trabalhos na literatura abordam métodos para a análise direta de material vegetal, visando à determinação de Si.

Margui et al.<sup>50</sup> fizeram uma revisão sobre o estado da arte de Fluorescência de raios-X (XRF) para a análise elementar de tecidos vegetais, incluindo o Si, abordando os efeitos de matriz, e comentando as vantagens e limitações da técnica.

Recentemente, Reidinger et al.<sup>51</sup> (2012) propuseram um método para determinação direta de Si em pastilhas de material vegetal por XRF empregando equipamento portátil. Para o preparo das amostras, 700 mg das amostras previamente moídas foram prensadas aplicando-se 11 t cm<sup>-2</sup> por 2 s, obtendo-se pastilhas de 13 mm de diâmetro e 5 mm de altura. Os padrões para a curva de calibração foram feitos com pastilhas de metil-celulose contendo até 10 % m/m Si. Para avaliar a exatidão, os autores elegeram a decomposição por fusão com NaOH de cinco amostras de tecido vegetal, sendo uma amostra de *D. caepitosa* (espécie de cactus), duas de *Lolium perene* (grama) e duas de *Triticum aestivum* (folhas de trigo), e as determinações de Si foram feitas por colorimetria. Os resultados obtidos por XRF foram então comparados com os dados obtidos colorimetricamente após fusão com NaOH, sendo que a correlação de Pearson foi de 0,644 para n = 5. O LOD estimado foi de 140 mg kg<sup>-1</sup> Si.

Outra alternativa foi proposta por Kucera et al.<sup>52</sup> empregando-se a reação nuclear <sup>29</sup>Si(n,p)<sup>29</sup>Al para a determinação de Si em folhas de macieira (NIST 1515) por ativação neutrônica instrumental (INAA). O principal fator que contribui para a limitação da INAA na determinação de Si em materiais biológicos é a interferência nuclear causada por fósforo, cuja correção é bastante desafiadora.<sup>53</sup> Esta dificuldade é acentuada, pois a concentração de P é da

mesma ordem de magnitude que a de Si em amostras vegetais. Uma tentativa de minimizar esta interferência é promover a irradiação do material em uma coluna térmica. Entretanto, esta facilidade encontra-se disponível em poucos reatores no mundo e proporciona baixa irradiação de nêutrons térmicos. Outros procedimentos utilizados para determinação de Si em tecidos vegetais descritos na literatura são mostrados na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** - Procedimentos utilizados para determinação de Si em amostras de tecidos vegetais.

Matriz	Preparo de amostra	Método instrumental	Ref
Folhas de cana-de-açúcar	Fusão com NaOH	Colorimétrico (azul de molibdênio)	40
Palha de arroz	Digestão com solução de NaOH+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Colorimétrico (azul de molibdênio)	41
Folhas de pessegueiro e do tomateiro, acículas de pinus, farinhas de trigo e de arroz	Digestão assistida por radiação micro-ondas com HNO <sub>3</sub> -HF e HNO <sub>3</sub> -HF-H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	ICP MS	48
Folhas de maçã	Fusão com Na <sub>2</sub> O + NaOH	INAA	52
Folhas de maçã, tomate, pimenta, melancia, haste de milho e grama	Digestão com solução de NaOH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Colorimétrico (azul de molibdênio)	45
Folhas de cana-de-açúcar	Extração por HCl+HF Digestão com solução de NaOH+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ICP OES Colorimétrico (azul de molibdênio)	36
Madeira	Extração com HCl+HF+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Colorimétrico (azul de molibdênio)	
	Extração com HCl+HF+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	FAAS	54
Folhas de arroz	Digestão com solução de NaOH e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Colorimétrico (azul de molibdênio)	55
Musgo, plâncton, planta aquática, líquen, feno, folhas de pessegueiro, espinafre, tomateiro e acículas de pinheiro.	Digestão assistida por micro-ondas HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +HF+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> e HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + HBF <sub>4</sub>	ICP-MS	
	Digestão assistida por micro-ondas HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +HF+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> e HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + HBF <sub>4</sub>	ICP OES	43
Folhas de grama e oliveira.	Amostragem direta	ETV-ICP-OES	56
Folhas de cana-de-açúcar, arroz, soja, trigo, grama.	Digestão com solução de NaOH+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Colorimétrico (azul de molibdênio)	57

Continuação

**Tabela 2.3** - Procedimentos utilizados para determinação de Si em amostras de tecidos vegetais.

Matriz	Preparo de amostra	Método instrumental	Ref
Plantas ornamentais, folhas de tomateiro e espinafre	Digestão assistida por micro-ondas com solução de NaOH ou KOH+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ICP OES	
Plantas ornamentais, folhas de tomateiro e espinafre	Digestão com solução de NaOH+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Colorimétrico (azul de molibdênio)	58
Folhas de trigo	Extração com Tiron	ICP OES	49
Folhas de arroz e de cana-de-açúcar	Digestão com solução de NaOH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Colorimétrico (azul de molibdênio)	
Folhas de arroz e de cana-de-açúcar	Digestão com solução de NaOH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + NH <sub>4</sub> F	ICP OES	44
Folhas de cana-de-açúcar	Digestão com solução de NaOH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Colorimétrico (azul de molibdênio)	
Folhas de cana-de-açúcar	Amostragem sólida	Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)	59
Plantas ornamentais, acículas de pinheiro, folhas do pessegueiro e palha de arroz	Fusão com NaOH	Colorimétrico (azul de molibdênio) e ICP OES	60
Ramos e folhas de arbustos, folhas de alamo e de milho	Decomposição assistida por micro-ondas por HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + HF	ICP-MS	61
Folhas de alface, gramínea e trigo	Pastilhas	XRF	51

## 2.6 Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser

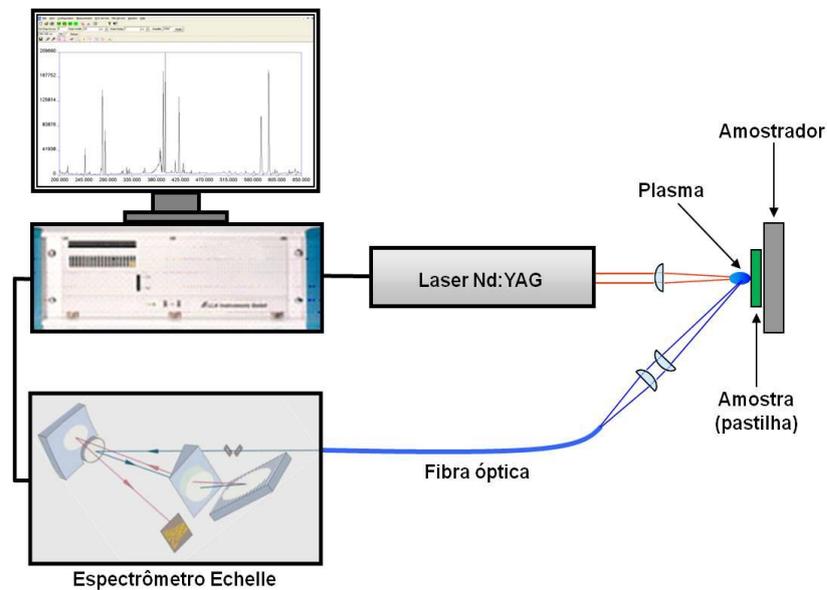
Em 1962, Brech<sup>62</sup> utilizou um laser de rubi para produzir vapores na superfície de materiais metálicos e não metálicos. Os vapores foram excitados por uma fonte de energia auxiliar para formar um microplasma com objetivo de detectar seu espectro de emissão. Esse experimento é considerado como sendo um dos pioneiros a utilizar o laser como fonte de excitação propondo a técnica de LIBS (do inglês *Laser Induced Breakdown Spectroscopy*). Runge et al.<sup>63</sup> utilizaram LIBS pela primeira vez como ferramenta para proporcionar ablação (microamostragem) em amostras de aço e como fonte de excitação baseadas nas intensidades de emissão das linhas atômicas ou iônicas para análise direta de Cr e Ni. LIBS tem despertado

grande interesse da comunidade científica mundial e considerado como uma das técnicas espectroanalíticas multielementares de maior destaque nas áreas de aplicações analíticas por lasers possibilitando análise direta em grandes variedades de amostras, sendo uma alternativa viável aos métodos já consolidados em espectrometria atômica.<sup>64</sup>

LIBS é uma técnica espectroanalítica que emprega a micro amostragem por ablação com laser e subsequente excitação dos átomos e íons presentes no microplasma induzido durante e após a ablação. LIBS utiliza laser pulsado com energia geralmente entre 10 e 250 mJ como fonte de energia para vaporizar uma certa quantidade da amostra. O laser é focalizado por uma lente convergente, resultando em irradiâncias da ordem de  $\text{GW cm}^{-2}$  para pulsos de duração de ns, formando um plasma de altas temperaturas (i.e. 9000 a 20000K). Durante a relaxação, os átomos, íons e fragmentos de moléculas excitados no plasma emitem um espectro de emissão de radiação eletromagnética a partir de seus elementos ou fragmentos moleculares, a qual é capturada por um sistema óptico e direcionada para um espectrômetro que dispersa as radiações emitidas pelas espécies atômicas e iônicas excitadas no plasma. Geralmente, esse espectro é analisado nas regiões ultravioleta e visível (UV-VIS) do espectro eletromagnético, mas vale ressaltar que emissões de raios X também são possíveis, dependendo das características do laser incidente na amostra.<sup>65, 66</sup> Alguns espectrômetros de bancada com montagem Echelle, equipados com detectores ICCD, apresentam resolução óptica ( $\lambda/\Delta\lambda$ ) entre 10000 e 20000, permitindo separação entre linhas de, aproximadamente, 10 pm (na região próxima de 200 nm), o que é recomendável face à melhor seletividade espectral. Os sinais de emissão são medidos por um detector de estado sólido com tempo mínimo de resposta entre 0,1 e 1,0  $\mu\text{s}$ .<sup>67</sup> Para análise espectral nas regiões UV-VIS, o conjunto óptico pode ser um monocromador convencional (Czerny-Turner, por exemplo) ou espectrômetro com montagem óptica do tipo Echelle. A evolução dos componentes eletrônicos tem permitido o desenvolvimento de espectrômetros com dimensões reduzidas (i.e. 15 cm x 10 cm x 4 cm) equipadas com detectores CCD (*Charge coupled device*) com até 3648 elementos. Esses equipamentos possibilitam o uso de versões portáteis para uso em campo com resolução óptica ( $\lambda/\Delta\lambda$ ) entre 1000 e 10000. Existe a possibilidade de ser utilizado lasers pulsados com duração de ps e fs. Os lasers pulsados de fs resultam irradiâncias da ordem de  $\text{TW cm}^{-2}$ .<sup>68</sup>

A Figura 2.3 mostra um esquema típico de um espectrômetro LIBS constituído por um laser de Nd:YAG, lente plano-convexa para focalizar o pulso do laser na superfície da amostra fixada em um suporte em uma câmara de ablação, um telescópio para coletar a

radiação emitida pelo plasma, um espectrômetro com montagem Echelle e um computador para o controle temporal do laser, controle do espectrômetro, para aquisição e processamento dos dados.



**Figura 2.3** - Diagrama de um sistema LIBS.

Neste sistema, quando a lente convergente focaliza um pulso de laser na superfície da amostra, as moléculas componentes do material são dissociadas, tanto em seus constituintes atômicos, devido à ruptura das ligações moleculares, como em íons e elétrons devido à ruptura das ligações eletrônicas (*breakdown*) promovida pelo campo elétrico do laser no ponto focal da lente.<sup>6</sup> Existe uma grande variedade de lasers ( $N_2$ ,  $CO_2$ , KrF, XeCl), porém o mais comum em LIBS é o laser pulsado de Nd:YAG no comprimento de onda fundamental (1064 nm) e em regime temporal de ns.<sup>5, 68</sup>

O acrônimo LIBS pode ser considerado como uma forma reduzida de LIB-OES, *Laser Induced Breakdown Optical Emission Spectrometry*. O termo *breakdown* se refere a um fenômeno coletivo relacionado à ruptura dielétrica das ligações moleculares do material, que ocorre anteriormente à formação do plasma, e envolve propriedades da amostra, tais como elasticidade e compressibilidade. As propriedades da amostra também determinam os mecanismos de deposição e dissipação de energia relacionada ao processo de ablação, formação do plasma, excitação, emissão atômica e/ou molecular. Essa ruptura (*breakdown*) é promovida pelo gradiente do campo elétrico intenso do laser que acompanha a focalização. A

distância focal do laser incidente na amostra pode variar de poucos centímetros em versões portáteis a dezenas de metros em versões utilizando telescópios.

A inicialização, formação e decaimento do plasma são processos complexos. A absorção da radiação incidente do laser ocorre por mecanismos de *bremstrahlung* inverso e envolve colisões entre fótons, elétrons e átomos ou moléculas.<sup>53 67-69</sup> A excitação eletrônica para níveis específicos de energia depende de fatores como o equilíbrio termodinâmico e interações com outros átomos e moléculas, geralmente influenciados pelas características da matriz. Após o término do pulso do laser, tipicamente menor que 10 ns, o plasma decai em um intervalo compreendido por alguns microssegundos, dependendo da energia depositada e pressão da atmosfera de ablação.<sup>63</sup> O espectro de emissão altera-se em função da evolução temporal do plasma. Nos primeiros instantes, o espectro é caracterizado pela emissão de radiação do *continuum* e de espécies iônicas excitadas. O *continuum* é a “luz branca” emitida pelo plasma, proveniente, principalmente, de reações de recombinação dos elétrons livres com os íons e de fenômenos de reações de freamento (“*bremstrahlung*”). Ao longo do decaimento do plasma, o espectro começa a ser caracterizado por radiação emitida por átomos neutros e/ou íons gasosos excitados, e, eventualmente, por moléculas simples excitadas, formadas pela recombinação de espécies atômicas. Na prática, durante o decaimento, observa-se uma diminuição da intensidade de emissão de radiação de fundo devida ao *continuum*.<sup>68</sup>

Os principais fatores que afetam as determinações feitas por LIBS são as propriedades intrínsecas do laser (*e.g.* comprimento de onda, duração do pulso, número de pulsos, taxa de repetição, configuração do conjunto óptico de focalização e respectiva fluência), as propriedades da amostra (*e.g.* distribuição do tamanho das partículas, densidade e porosidade das pastilhas) a atmosfera de ablação (*e.g.* tipo de gás e pressão) e as condições das medidas de emissão óptica (*e.g.* coleta da radiação emitida pelo plasma, seleção de linhas atômicas e iônicas, tempo de atraso e tempo de integração das medidas). Esses fatores devem ser estudados e cuidadosamente selecionados para cada aplicação analítica.<sup>70-73</sup>

Os processos físicos envolvidos na interação entre o laser e a amostra, na expansão dinâmica do plasma e em outros fenômenos envolvidos na ablação com laser, são dependentes da matriz e, principalmente, da fluência do laser. Neste sentido, para cada aplicação, selecionam-se a energia por pulso e o diâmetro de focalização do laser que resultem na fluência que proporcionará as melhores características analíticas como, por exemplo, a melhor razão sinal-ruído (SNR) e os menores coeficientes de variação das medidas.<sup>53, 69, 70</sup>

### 2.6.1 Vantagens e limitações de LIBS

LIBS tem sido empregada sem grandes dificuldades em análises qualitativas. No entanto, ainda requer esforço considerável em análises quantitativas.<sup>74</sup> LIBS é muito versátil e apresenta as seguintes características:

- a) Análises relativamente rápidas (< 3s por replicata);
- b) Análise direta de materiais sólidos de difícil dissolução e/ou decomposição;
- c) Análises *in situ*;
- d) O preparo da amostra é desnecessário em muitas aplicações ou é restrito ao procedimento de moagem e prensagem para obtenção de pastilhas das amostras;
- e) Aplicável para análise de gases, líquidos, além de sólidos condutores e sólidos não-condutores;
- f) Amostragem direta de pequenas massas (0,1 a 250 µg, por replicata);
- g) Possibilidade de avaliação de micro-homogeneidade de analitos.

Face às características que permitem a análise multielementar simultânea *in situ* com equipamentos portáteis e a realização de medidas de forma remota e/ou à distância, é de se esperar que a técnica LIBS ocupe um lugar de destaque nos laboratórios de desenvolvimento de materiais, de processos tecnológicos, nos laboratórios móveis para monitoramento ambiental *in situ*, entre outras aplicações. A maioria das aplicações com LIBS está direcionada para a análise de ligas metálicas, análise de materiais geológicos, monitoramento ambiental, aplicações nas áreas biomédicas, controle de processos químicos, análises de objetos de arte, perícia criminal (química forense) e indústria farmacêutica.<sup>75, 76</sup>

### 2.6.2 LIBS para análise de tecidos vegetais

A primeira contribuição para a análise de materiais vegetais por LIBS foi proposta por Q-Sun et al.<sup>77</sup> Neste trabalho, os autores analisaram amostras moídas fixadas, com o auxílio de fita adesiva dupla-face, em uma lâmina de vidro, aplicando-se pulsos de laser de 100 mJ

com um laser de Nd:YAG@1064 nm, sobre a superfície da amostra para a determinação de macronutrientes (Ca, Mg e P), micronutrientes (Cu, Fe, Mn, Zn e Al). A calibração foi feita com CRMs (NIST 1547 – folhas de pessegueiro, NIST 1570a – folhas de espinafre, NIST 1573 – folhas de tomateiro, e misturas destes materiais, em diferentes proporções. A melhor razão sinal ruído (SNR) foi observada quando os tempos de atraso e integração foram fixados em 1 e 10  $\mu$ s, respectivamente, e o coeficiente de variação (CV) das medidas variou entre 8 e 15 %. Nesse trabalho, o CRM NIST 1575 (folhas de pinus) foi utilizado para validar os resultados obtidos por LIBS e, apesar de o trabalho relatar a determinação de 8 elementos em materiais vegetais, os autores forneceram informações apenas para Al, Cu, Fe e P. Além disso, resultados de Mn e Zn obtidos por LIBS em amostra de musgo espanhol foram comparados aos determinados por ICP OES após digestão com 1,0 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. Os limites de detecção (LODs) foram 0,08 mg kg<sup>-1</sup> Cu, 0,8 mg kg<sup>-1</sup> Mn, 0,02 g kg<sup>-1</sup> Ca e 0,27 g kg<sup>-1</sup> Mg. De maneira geral, este trabalho mostrou a viabilidade de LIBS para a determinação de macro e micronutrientes em materiais vegetais, e aponta as dificuldades existentes para calibração e análise quantitativa.

Trevizan et al.<sup>78</sup> descreveram a determinação de macronutrientes (P, K, Ca, Mg) em material foliar por LIBS na forma de pastilhas. As pastilhas foram preparadas com folhas moídas criogenicamente e analisadas aplicando-se 8 pulsos (5 ns, 1064 nm) consecutivos de 200 mJ. Os CRMs (folhas e ramos de arbusto - GBW07603), repolho (IAEA 359), farinha de soja (IAEA 361), farinha de arroz (NIES 10-c), folha de macieira -NIST 1515), folhas de pessegueira (NIST 1547), folha de trigo (NIST 1567a) e folhas de espinafre (NIST 1570a) foram utilizados para construção das curvas de calibração e os resultados obtidos por LIBS comparados com os determinados por ICP OES após digestão ácida das amostras assistida por radiação micro-ondas. Os autores atribuíram alguns resultados discrepantes, principalmente, à pequena massa da porção total amostrada (estimada em 360  $\mu$ g) que pode dificultar a amostragem de materiais cujos elementos constituintes podem estar distribuídos de maneira heterogênea na matriz. Posteriormente, a determinação de micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) por LIBS também foi avaliada por Trevizan et al.<sup>79</sup> O preparo de amostra, condições instrumentais, método de calibração foram os mesmos utilizados por Trevizan et al.<sup>78</sup>. Os resultados obtidos por LIBS foram comparados com os determinados por ICP OES após digestão ácida das amostras. Alguns resultados não concordantes foram observados e, inicialmente, associados aos efeitos de matriz provocados, principalmente, pela variação na interação laser-amostra. Os LOD obtidos foram 2,2 mg kg<sup>-1</sup> B, 3,0 mg kg<sup>-1</sup> Cu, 3,6 mg kg<sup>-1</sup> Fe,

1,8 mg kg<sup>-1</sup> Mn e 1,2 mg kg<sup>-1</sup> Zn, todos considerados apropriados para a determinação de micronutrientes em material foliar.

Pouzar et al.<sup>80</sup> avaliaram o sistema LIBS de duplo-pulso para determinar P, K, Ca, Mg em tecidos foliares. As amostras foram moídas criogenicamente e posteriormente prensadas. Foram aplicados 2 pulsos (12ns, 1064 nm) co-lineares consecutivos com 7 μs de intervalo entre cada pulso. Os autores utilizaram pulsos com diferentes energias variando de 65 a 78 mJ/pulso. Sete amostras foliares de cevada e 3 amostras foliares de álamo foram utilizadas como padrões de calibração. As amostras foram decompostas por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas e os elementos presentes nas soluções da amostra foram determinados por ICP OES e FAAS. Seis CRMs (GBW 07605-folhas de chá, GBW 07603-folhas de arbusto, NIST 1575 – acículas de pinus, NCS DC 73550-folhas de álamo, QCM 3- folhas de morango e grama) foram utilizados para validar os métodos. Para os elementos K e P obtiveram recuperações de 96 a 101 % sendo os resultados concordantes em comparação com os valores certificados e entre LIBS e FAAS / ICP OES quando as amostras apresentaram composição química similar. Resultados discrepantes foram observados e atribuídos às diferenças na composição entre os CRMs utilizados na calibração. Outras contribuições importantes dos autores foram às observações referentes à distribuição do tamanho de partículas para a obtenção de resultados adequados.

Braga et al.<sup>81</sup> compararam o desempenho de métodos de calibração univariada e multivariada utilizando regressão pelos mínimos quadrados parciais (PLSR) para determinação de B, Cu, Fe, Mn, Zn em pastilhas de material vegetal. Para desenvolver os modelos de calibrações foram utilizadas quinze amostras compostas dos CRMs planta aquática (Community Bureau of Reference-BCR 60), musgo (BCR 061), folhas e galhos de árvore (National Research Centre for CRM - GBW 07603), folhas de repolho (International Atomic Energy Agency - IAEA 359), farinha de soja (IAEA 361), farinha de arroz (National Institute for Environmental Studies - NIES 10-c), farinha de trigo (NIST 1567a), folha de espinafre (NIST 1570a), amostras de grama (*Brachiaria decumbens*), folhas de bananeira (*Musa Paradisiaca sapientum*), folhas de café (*Coffea arabica*), folhas de milho (*Zea mays*), folhas de manga (*Mangifera indica*), folhas de pimenta (*Piper nigrum*) e folhas de soja (*Glycine max*). Para validação foram utilizados dois CRMs (folhas de oliveira BCR 62 e folhas de macieira NIST 1515) e três amostras, folhas de goabeira (*Psidium guaiava*), grama (*Axonopus obtusifolius*) e folhas de jaca (*Artocarpus integrifolia*). As amostras e CRMs foram decompostas por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas e analisadas

posteriormente por ICP OES. Pastilhas, contendo celulose como agente aglutinante, foram analisadas por LIBS empregando o procedimento descrito por Nunes et al.<sup>82</sup> As comparações entre os dois métodos (PLSR e calibração univariada) apresentaram resultados similares (precisão e exatidão), porém a calibração usando PLRS apresentou maior robustez e menores ocorrências de resultados anômalos (*outliers*). O desenvolvimento de modelos de PLSR específicos para cada elemento e a seleção de regiões de comprimento de onda contendo somente a linha de emissão de interesse resultou nas melhores condições analíticas para a determinação de micronutrientes. Os autores observaram que o método é dependente da matriz e sugeriram que o emprego de amostras de calibração semelhante deveria ser avaliado.<sup>82</sup>

Estas observações foram realizadas por Nunes et al.<sup>29, 82</sup> que otimizaram e validaram um método para a determinação de macro e micronutrientes em folhas de cana-de-açúcar por LIBS. Os autores utilizaram a calibração univariada e multivariada com regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) e mínimos quadrados parciais por intervalos (iPLS) para selecionar as melhores regiões espectrais para a determinação dos elementos. Foram empregadas vinte e seis amostras para calibração e quinze para validação. As pastilhas foram analisadas empregando laser de Nd:YAG@1064 nm (5 ns, 10 Hz), aplicando 25 pulsos de 110 mJ (25 J cm<sup>-2</sup>). Ambos os métodos utilizando calibração univariada e multivariada apresentaram resultados semelhantes. A calibração multivariada proporcionou melhores resultados apenas para Fe. Os autores concluíram que LIBS é um método alternativo bastante viável para a determinação de macro e micronutrientes em material foliar, especialmente quando as amostras utilizadas na calibração e na validação apresentarem composições e/ou características físicas e químicas semelhantes.<sup>29</sup>

Gomes et al.<sup>83</sup> avaliaram o preparo de amostras empregando moinho criogênico e planetário com bolas para análise de folhas de laranja, soja e cana-de-açúcar para obtenção de pastilhas e determinação de P, Ca, Mg, K, Fe, Cu, Zn e B por LIBS. Os autores sugeriram que o grau de cominuição das amostras está associado às propriedades químicas e físicas das mesmas, tais como o conteúdo de fibra, lignina e celulose e que ambos os métodos de moagens são apropriados para obtenção de pastilhas. Efeitos de matriz podem ser reduzidos utilizando partículas com tamanhos < 75 µm, proporciona aumento em até 50% do sinal de emissão de intensidade para a maioria dos elementos.<sup>14, 83</sup>

Kaiser et al.<sup>84</sup> utilizaram LIBS (Nd:YAG, 532 nm, 10mJ, 10 Hz) e LA-ICP-MS com resolução espacial de 200 µm para avaliar a distribuição espacial de Pb, Mg e Cu em folhas de

girassol, *Helianthus annuus* L. cultivadas em casa de vegetação. Os autores concluíram que os dois métodos utilizados podem ser empregados de maneira rápida para análise espacial multielementar em superfícies foliares para investigar a migração dos elementos químicos nas diferentes partes da planta e também em análises ambientais.

Chauhan et al.<sup>85</sup> utilizou LIBS (Nd:YAG, 532 nm, 4ns, 10 Hz) para monitorar *in situ* a deposição de sílica em diferentes partes (limbo foliar, bainha da folha e caule) de folhas frescas de gramínea (*Cynodon dactylon*). É um dos únicos trabalhos em que, além de verificar em qual posição da folha o Si é depositado, os autores posteriormente realizam sua extração para fins comparativos. Estes espectros foram comparados com fitólitos depositados em diferentes partes de *Cynodon dactylon* após sua obtenção. Os autores demonstraram que LIBS pode ser uma alternativa viável para substituir o método de extração de fitólitos.

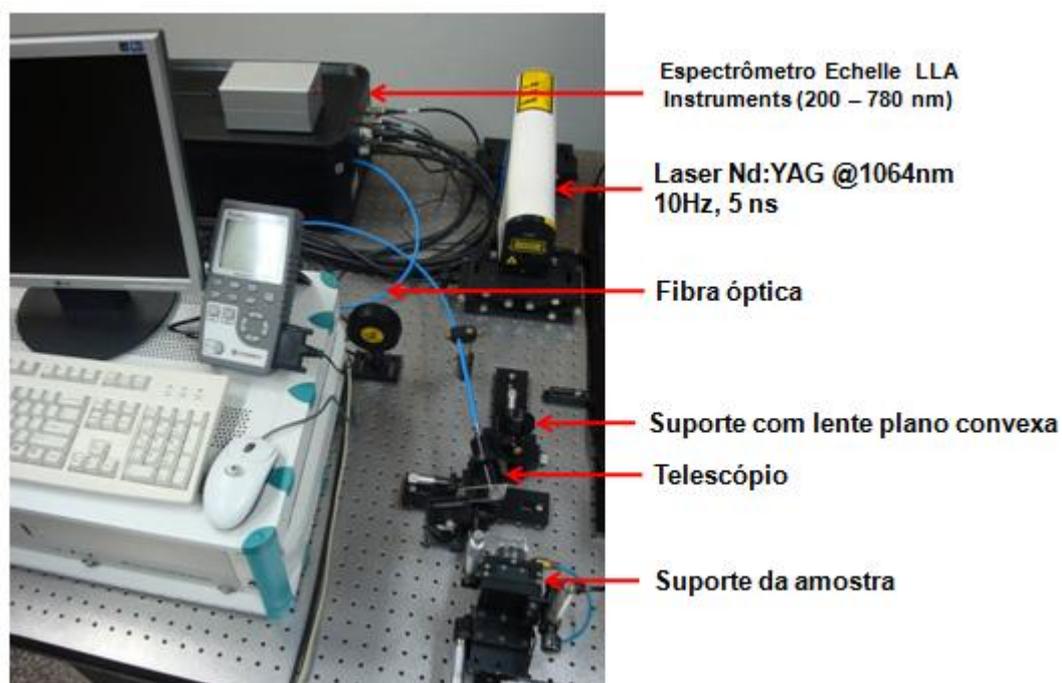
Recentemente, os desenvolvimentos de LIBS em análises de materiais vegetais foram revisadas por Santos Jr et al.<sup>7</sup>. De maneira geral, diferentes aplicações de LIBS foram abordadas, assim como seu emprego em mapeamento elementar em tecidos vegetais e os aspectos relevantes à análise quantitativa das pastilhas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

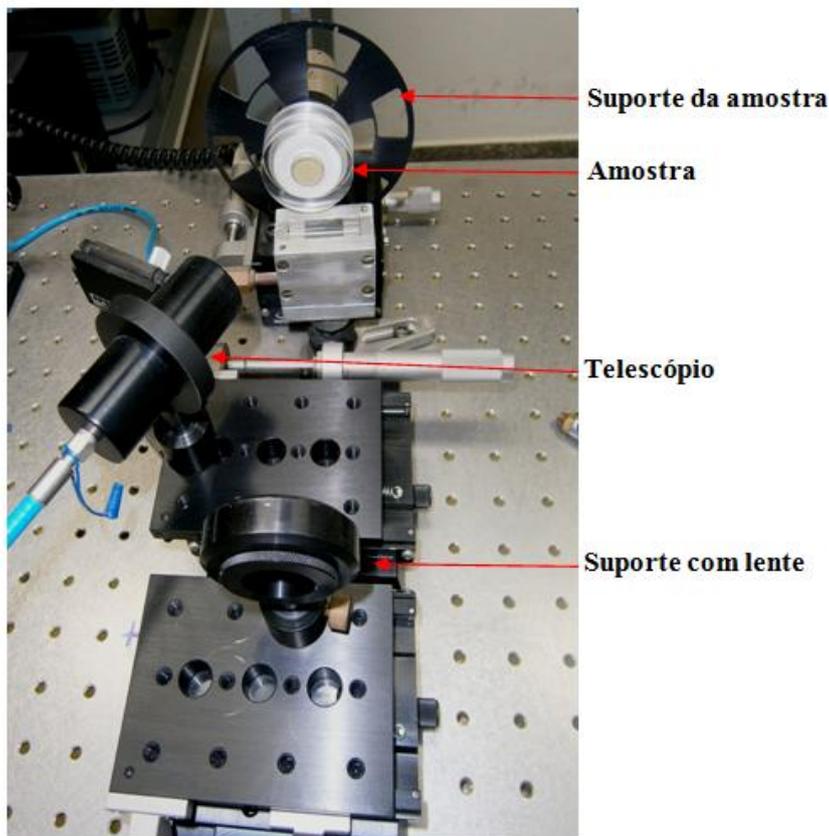
#### 3.1 Instrumentação

Os resultados apresentados nesta tese foram obtidos utilizando sistema LIBS configurado no próprio laboratório como mostra a Figura 3.1. Utilizou-se um laser pulsado de Nd:YAG (Brilliant, Quantel, França) operando no comprimento de onda fundamental (1064 nm) e produzindo pulsos de laser com 6 mm de diâmetro (fator de qualidade  $M^2 < 2$ ), energia máxima de  $365 \pm 3$  mJ, 5 ns de duração (*full width at half maximum* - FWHM) e taxa de repetição de 10 Hz. Os pulsos de laser foram focalizados na superfície da pastilha com uma lente convergente plano-convexa de sílica fundida de 2,54 cm de diâmetro e distância focal de 20,0 cm (Newport, EUA). A Figura 3.2 mostra conjunto de lente de focalização do laser, telescópio e suporte para amostra. A emissão do plasma foi coletada por um sistema óptico

composto por lentes plano convexas convergentes de sílica fundida com distância focal de 50 e 80 mm (LLA Instruments GmbH, Alemanha) acoplado, com o auxílio de uma fibra óptica, na fenda de entrada de um espectrômetro. Utilizou-se um espectrômetro ESA 3000 (LLA Instruments GmbH, Alemanha) equipado com óptica Echelle (distância focal de 20 cm e abertura numérica de 1:10) e detecção por um ICCD Kodak KAF 1001 de 1024 x 1024 pixels. Este sistema proporciona uma imagem plana de 24.5 x 24.5 mm<sup>2</sup>. O espectrômetro possibilita a aquisição de sinais de emissão na região entre 200 e 780 nm, com resolução ( $\lambda/\Delta\lambda$ ) entre 10000 e 20000. A dispersão linear por pixel varia de 5 pm a 200 nm e 19 pm a 780 nm. Os sinais de imagem foram digitalizados em sistema de 16 bits e processados por computador. A corrente de fundo do detector foi automaticamente subtraída. A energia dos pulsos do laser foi monitorada com um detector de energia equipado com sensor piroelétrico (FieldMax II-P Coherent, USA). A calibração dos comprimentos de onda foi feita com as linhas Hg I 253,652 nm e Zn I 213,855 nm emitidas por lâmpadas de descarga sem eletrodo (EDL II System, Perkin Elmer, Alemanha). Os sinais de imagem foram digitalizados em sistema de 16 bits e processados por computador.



**Figura 3.1-** Sistema LIBS utilizado no Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho” do CENA-USP.



**Figura 3.2** - Vista aproximada do sistema LIBS mostrando o suporte da lente de focalização do laser, telescópio para coleta dos sinais de emissão e suporte para a amostra.

Para determinação de Si em folhas de cana-de-açúcar após digestão alcalina, empregou-se um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente modelo Vista RL (Varian, Mulgrave, Austrália) simultâneo com vista radial. Os resultados obtidos por ICP OES foram usados para as devidas calibrações.

Para comparação de resultados nas mesmas pastilhas analisadas por LIBS, utilizou-se um espectrômetro de microfluorescência de raios-X modelo  $\mu$ EDX-1300 (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um tubo de raios-X de Rh e um detector semi-condutor de Si(Li) resfriado por nitrogênio líquido ( $N_2$ ). As determinações de Si por microfluorescência de raios-X foram feitas no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa - MG). A micro fluorescência de raios-X ( $\mu$ XRF) é uma técnica analítica multielementar não destrutiva que permite obter informações da distribuição de elementos simultaneamente em diversos tipos de matrizes. A técnica se baseia na medida das intensidades de raios X característicos emitidos por elementos químicos presentes na amostra quando a mesma é irradiada adequadamente com um feixe proveniente de um tubo de raios-X.<sup>86 87</sup>

A distribuição do tamanho das partículas foi feita no Instituto de Pesquisa Tecnológica (IPT) São Paulo, SP, utilizando-se um analisador por difração de laser modelo LS 13 320 Tornado Dry Powder System (Beckman Coulter).

A moagem das folhas de cana-de-açúcar, previamente lavadas e secas, foi feita em moinho de facas (Marconi, Piracicaba, SP), e a cominuição foi feita em moinho criogênico modelo Freezer Mill 6800 (Spex).

Para obtenção das pastilhas utilizou-se prensa hidráulica modelo 3624B X-Press (Spex, EUA) com capacidade máxima de 35 t. O material moído foi pressionado no interior de uma matriz de aço inoxidável com diâmetro interno de 150 mm.

As micrografias das crateras produzidas por ablação com laser foram feitas por microscopia eletrônica de varredura (Stereoscan 440, LEO) utilizando detector de elétrons secundários no Departamento de Engenharia de Minas e Petróleo da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, após serem recobertas com platina durante 80s no equipamento MED 020 (Bal-tec).

Para pesagem das amostras utilizou-se uma balança Mettler modelo AE 40 (Greifensee, Suíça) com precisão de décimo de miligrama.

As digestões alcalinas foram feitas em estufa (Marconi, Piracicaba), empregando-se tubos de polietileno (tipo Falcon).

### **3.2 Reagentes e soluções**

Água purificada em sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA, EUA) com resistividade maior que 18,2 MΩ cm foi utilizada nos procedimentos. O sistema Milli-Q<sup>®</sup> foi alimentado com água proveniente de sistema de purificação por osmose reversa Purelab Prima modelo DV35 (Elga, UK). Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 % m/m grau analítico (Merck, Brasil), álcool octílico (Merck, Brasil), hidróxido de sódio (NaOH), (Merck, Brasil), fluoreto de amônio (NH<sub>4</sub>F) (Carlo Erba), foram utilizados nos procedimentos de digestão. Perclorato de magnésio anidro Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (Vetek, Brasil) foi utilizado para manter as amostras com baixo teor de umidade no interior de um dessecador.

As soluções de referência de Si foram preparadas em meio alcalino a partir de diluições apropriadas da solução estoque contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> Si (Specsol, Brasil).

### **3.3 Amostras de folhas de cana-de-açúcar**

Foram analisadas amostras de folhas de cana-de-açúcar das variedades: CTC1, CTC2, CTC3, CTC4, CTC5, CTC6, CTC7, CTC8, CTC9, CTC10, CTC11, CTC12, CTC13, CTC14, CTC15, CTC16, CTC17, CTC18, SP81-3250, RB85-5433, IAC87-3396, RB86-7515, IAC93-6006, RB84-5486 e RB85-5113.

## **4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **4.1 Coleta e pré-tratamento das amostras de folhas de cana-de-açúcar**

Foram coletadas amostras de folhas de cana-de-açúcar aos nove meses de idade de 18 variedades (CTC1 a CTC18) no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), localizado em Piracicaba, SP, Fazenda Santo Antonio e de 7 variedades aos nove meses de idade (SP81-3250, RB85-5433, IAC87-3396, RB86-7515, IAC93-6006, RB84-5486 e RB85-5113) na APTA - Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio, Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico do Centro Sul. Coletaram-se 40 folhas (folha +1) de cada variedade, aleatoriamente dentro de cada talhão.

Cada amostra de folha de cana-de-açúcar foi dividida em três partes, selecionando-se a parte central (terço médio) com aproximadamente 30 cm. Ambos os procedimentos de coleta foram empregados no CTC e na APTA. No laboratório, a nervura central das folhas frescas foi removida. As folhas frescas foram lavadas em água corrente, enxaguadas individualmente com água purificada e colocadas sobre papel absorvente. Em seguida, elas foram transferidas para sacos de papel perfurados, devidamente identificados, e colocados em estufa (Marconi, Piracicaba) com circulação forçada de ar a 65 °C por 72 h. Após a secagem, o material foi moído em moinho de facas contendo malha com abertura de 600 µm. Após homogeneização, as amostras foram acondicionadas em frascos de plásticos, identificados e fechados hermeticamente. Estas amostras previamente homogeneizadas (partículas < 600 µm) foram cominuídas criogenicamente por 40 min, em moinho criogênico conforme recomendado por

Nunes et al.<sup>29, 82, 88</sup> Para tanto, 2g de amostra foram moídos, fixando a etapa de pré-congelamento em 5 min e moagem de 20 ciclos 2 min cada, intercalados por 1 min de recongelamento.

#### **4.2 Decomposição das amostras de folhas de cana-de-açúcar**

As amostras foram decompostas em triplicata empregando-se o procedimento descrito por Kraska e Breitenbeck.<sup>44</sup> Porções de 100 mg de cada amostra cominuída criogenicamente foram transferidas para tubos de polietileno (tipo Falcon) de 50 mL. Os tubos foram lavados previamente com solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> NaOH, enxaguados com água purificada e secos. Para reduzir a formação de espuma foram adicionadas 5 gotas de álcool octílico a cada tubo, antes da adição de 2 mL de solução 30 % m/m H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posteriormente, os tubos Falcon foram fechados e aquecidos em estufa a 95 °C por 30 min. Após este período, retiraram-se os tubos da estufa e 4 mL de solução 50 % m/v NaOH foram adicionados. Os tubos foram agitados mecanicamente e aquecidos a 95 °C por 4 h. Em temperatura ambiente, adicionou-se 1 mL de solução 5 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>F e o volume foi completado para 50 mL com água. Esta solução foi diluída 100 vezes.

#### **4.3 Determinação de silício por ICP OES**

Para a determinação de Si nos digeridos de folhas por ICP OES empregou-se um espectrômetro simultâneo com vista radial, e nebulizador tipo V-groove em condições robustas de análise, como recomendado por Silva et al.<sup>89</sup> e Trevizan et al.<sup>90</sup> As determinações de Si foram feitas na Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos-SP). A Tabela 4.1 mostra os parâmetros operacionais utilizados no espectrômetro Varian modelo Vista RL.

**Tabela 4.1** – Parâmetros operacionais utilizados no ICP OES modelo Vista RL.

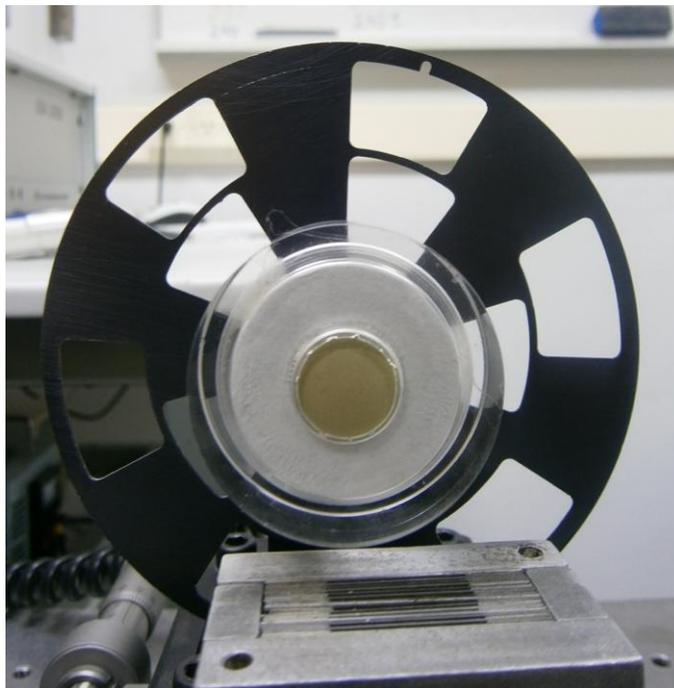
Potência da radiofrequência (kW)	1,30
Fluxo de argônio (plasma) (L min <sup>-1</sup> )	15,0
Fluxo de gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,5
Fluxo de gás para nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,6
Vazão da amostra (mL min <sup>-1</sup> )	1,0
Altura de observação (mm)	8,0
Linha de emissão (nm)	Si I 250,690

#### 4.4 Preparo das pastilhas

As pastilhas foram obtidas a partir da prensagem de 0,5 g das amostras previamente moídas criogenicamente. Aplicou-se pressão equivalente a 8 t cm<sup>-2</sup> em cada amostra por 5 min. Desta forma obtiveram-se pastilhas de 15 mm de diâmetro e 2 mm de espessura.

#### 4.5 Análises das pastilhas por LIBS

As pastilhas de 15 mm de diâmetro foram posicionadas em um amostrador fixado em um controlador manual com translação em 2 eixos, movendo-se ortogonalmente em relação ao feixe do laser. A ablação foi feita em atmosfera de argônio com fluxo laminar de 0,5 L min<sup>-1</sup> tangencialmente à superfície da pastilha fixada em um porta-amostra (Figura 4.1), evitando-se, assim, a presença de ar atmosférico no ambiente de reação. Os espectros de emissão foram coletados em 30 pontos diferentes, 1,5 mm equidistantes, sobre a superfície de cada pastilha, incidindo-se 25 pulsos de laser por ponto de amostragem. O sistema óptico de coleta da radiação emitida pelo plasma foi posicionado a 25° em relação ao feixe do laser. O tempos de atraso e de integração foram fixados em 2,0 e 4,5 μs, respectivamente. As determinações foram feitas com 25 pulsos acumulados e taxa de repetição de 10 Hz.<sup>29</sup>



**Figura 4.1** – Imagem da pastilha de folha de cana-de-açúcar (diâmetro = 15 mm) fixada no suporte do porta-amostra do sistema LIBS utilizado na presente tese.

#### **4.6 Determinação direta de silício por $\mu$ ED-XRF**

A Tabela 4.2 mostra os parâmetros operacionais utilizados para determinação de Si por  $\mu$ ED XRF.

Para a análise das pastilhas de folha de cana-de-açúcar programou-se uma linha central virtual na superfície, composta por 30 pontos com auxílio do software do equipamento (PCMEDX Versão 1.04 Shimadzu Corp. Japão). Em cada ponto utilizou-se um tempo de irradiação longitudinal de 20 s (descontando-se o tempo morto) com passo de 100  $\mu$ m. O resultado, expresso em cps/ $\mu$ A, foi a média dos 30 espectros obtidos. A linha para obtenção da intensidade de Si foi a  $K_{\alpha} = 1,740$  keV.

**Tabela 4.2** - Parâmetros operacionais utilizados para determinação de Si por  $\mu$ ED XRF.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Numero de pontos	30
Passo ( $\mu\text{m}$ )	100
Tempo de aquisição por ponto (s)	10
Diâmetro do feixe ( $\mu\text{m}$ )	50
Corrente ( $\mu\text{A}$ )	100
Tensão (kV)	50
Detector	Semi-condutor de Si(Li)
Linha de Si	$K_{\alpha} = 1,740 \text{ keV}$
Raios-X	Tubo de Rh
Região de aquisição (keV)	0 - 40

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação de Si por ICP OES e $\mu$ ED-XRF

Devido às dificuldades e incertezas encontradas na determinação de Si em plantas, neste trabalho as determinações de Si foram feitas tanto por ICP OES como por  $\mu$ ED-XRF para fins de comparação.

As determinações por ICP OES foram feitas conforme os parâmetros instrumentais mostrados na Tabela 4.1, após as amostras moídas de folhas de cana-de-açúcar terem sido decompostas em meio alcalino, conforme o procedimento descrito no item 4.2. A Tabela 5.1 mostra os resultados das determinações de Si por ICP OES, que foram utilizados para a calibração univariada e validação dos métodos de análise por LIBS e por  $\mu$ ED-XRF. Para avaliar a possibilidade de perdas de Si durante as decomposições, 250  $\mu$ L e 500  $\mu$ L da solução estoque contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> Si (Specsol, Brasil) foram transferidos para três frascos de digestão contendo porções de 100 mg da amostra cominuída da variedade CTC13 e os reagentes. O volume foi completado para 50 mL. As recuperações para ambas as concentrações equivalentes a 5 mg kg<sup>-1</sup> e 10 mg kg<sup>-1</sup> variaram entre 103 $\pm$ 2% e 101 $\pm$ 1%.

Neste ponto, cabe mencionar que muitas dificuldades foram encontradas para a definição de um método de referência e, conseqüentemente, para o desenvolvimento desta tese. Antes de se definir o método recomendado por Kraska e Breitenbeck<sup>44</sup>, foram testados vários procedimentos descritos na literatura e já mencionados na revisão bibliográfica, mas os resultados encontrados não permitiam que se estabelecesse uma curva de calibração confiável face à enorme dispersão dos dados e falta de reprodutibilidade dos resultados. No artigo de Kraska e Breitenbeck<sup>44</sup> ficou evidente aquilo que se observava em todas as tentativas de se usar o método originalmente proposto por Elliott e Snyder.<sup>41</sup>, e naquele modificado por Korndörfer et al.<sup>34</sup>

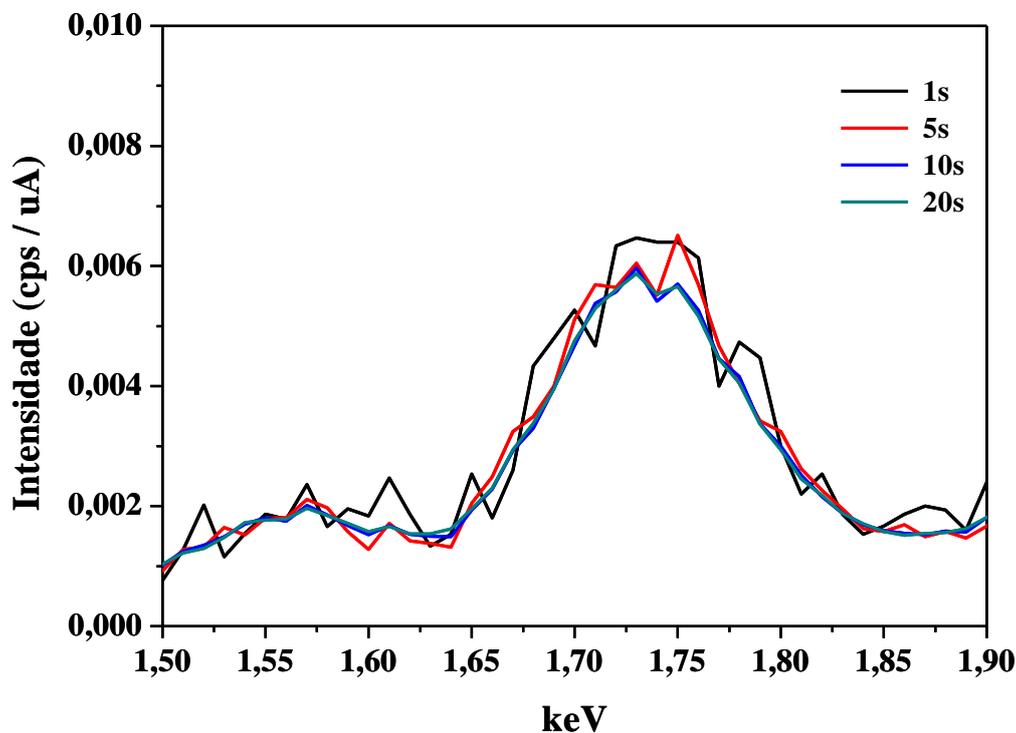
**Tabela 5.1** – Resultados da determinação de Si por ICP OES após decomposição por digestão alcalina em folhas de cana-de-açúcar.

Amostra	Variedade	Si (g kg <sup>-1</sup> )*
1	CTC1	6,98 ± 0,02
2	CTC2	4,82 ± 0,02
3	CTC3	6,36 ± 0,05
4	CTC4	6,24 ± 0,02
5	CTC5	5,26 ± 0,03
6	CTC6	5,74 ± 0,03
7	CTC7	8,83 ± 0,06
8	CTC8	6,39 ± 0,04
9	CTC9	4,09 ± 0,02
10	CTC10	6,49 ± 0,03
11	CTC11	7,74 ± 0,01
12	CTC12	5,20 ± 0,02
13	CTC13	8,72 ± 0,06
14	CTC14	7,64 ± 0,02
15	CTC15	6,63 ± 0,02
16	CTC16	9,77 ± 0,05
17	CTC17	6,49 ± 0,03
18	CTC18	9,70 ± 0,02
19	SP81-3250	4,56 ± 0,04
20	RB85-5433	7,34 ± 0,01
21	IAC87-3396	3,38 ± 0,02
22	RB86-7515	3,68 ± 0,03
23	IAC93-6006	6,80 ± 0,02
24	RB84-5486	3,63 ± 0,02
25	RB85-5113	2,29 ± 0,02

\*n = 3 digeridos; concentração média ± 1 desvio padrão.

Com referência à técnica de  $\mu$ ED-XRF, que também foi utilizada para comparar os resultados de Si nas amostras de folhas de cana-de-açúcar selecionadas, fez-se também a calibração tomando-se por base os resultados obtidos por ICP OES aos digeridos alcalinos (Tabela 5.1). Para definição das condições de medida por  $\mu$ ED-XRF, utilizaram-se pastilhas de folhas de cana-de-açúcar da variedade CTC12, preparadas a partir de amostras cominuídas com 10 min e 40 min de moagem criogênica, e variou-se o tempo de aquisição do sinal de fluorescência de 1 a 20 s. Com a pastilha obtida com 40 minutos de moagem criogênica, a intensidade média dos sinais de Si foi de  $0,052 \pm 0,0043$  cps/ $\mu$ A (contagens por segundo por microampéres), e para 10 minutos de moagem criogênica, a intensidade média foi de  $0,043 \pm 0,0023$  cps/ $\mu$ A. A Figura 5.1 mostra o perfil dos sinais de fluorescência obtidos para os diferentes tempos de aquisição de sinal, descontando-se o tempo morto (tempo onde o detector não atua na aquisição do sinal) e utilizando-se pastilha confeccionada com amostra cominuída por 40 min em moinho criogênico.

Os coeficientes de variação (CV) das medidas para amostras submetidas a 10 min de moagem criogênica foi de 7,5 % e para amostras submetidas a 40 min de moagem criogênica foi de 5,1%. Optou-se por escolher a amostra que foi submetida a um tempo maior de moagem criogênica, pois propiciou menor CV. A Tabela 5.2 mostra as intensidades dos sinais de fluorescência utilizando amostras submetidas a um tempo de moagem criogênica de 40 min e seus respectivos CVs.



**Figura 5.1** – Perfis dos sinais de fluorescência de silício (passo de 100  $\mu\text{m}$ ) obtidos para diferentes tempos de aquisição. Dados para pastilha da variedade CTC12 moída criogenicamente durante 40 min.

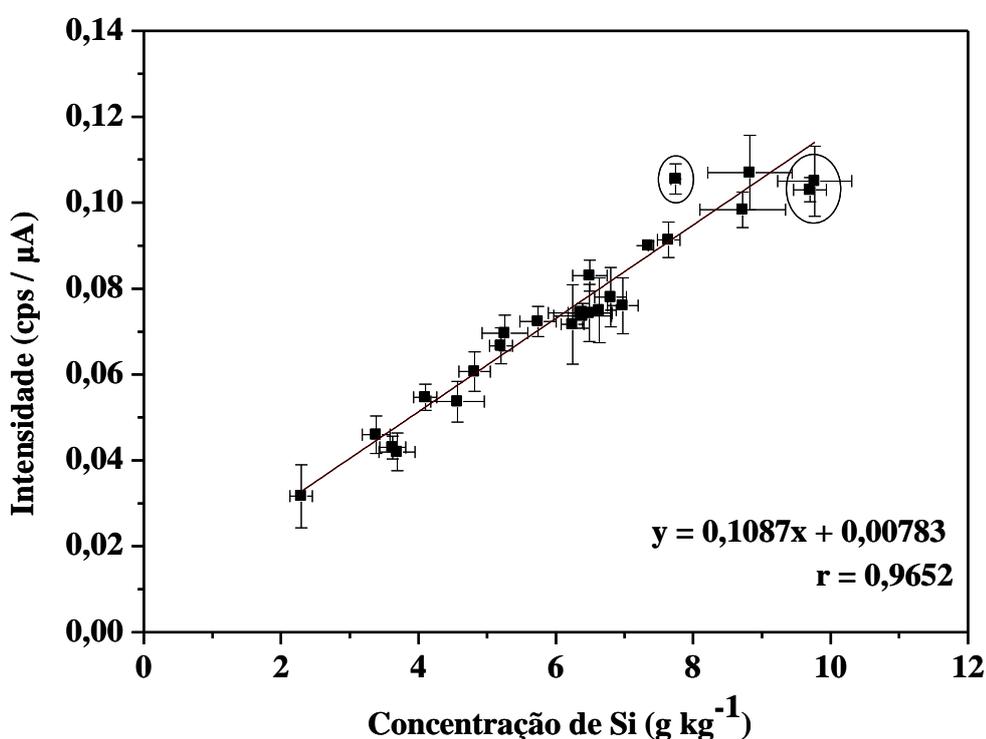
**Tabela 5.2** - Comparação dos coeficientes de variações na aquisição de sinais de fluorescência por  $\mu\text{ED-XRF}$ .

Tempo (s)	Intensidade média (cps/uA)	SD	CV
1	0,059	0,006	9,7
5	0,057	0,006	9,9
10	0,053	0,004	8,2
20	0,054	0,004	7,5

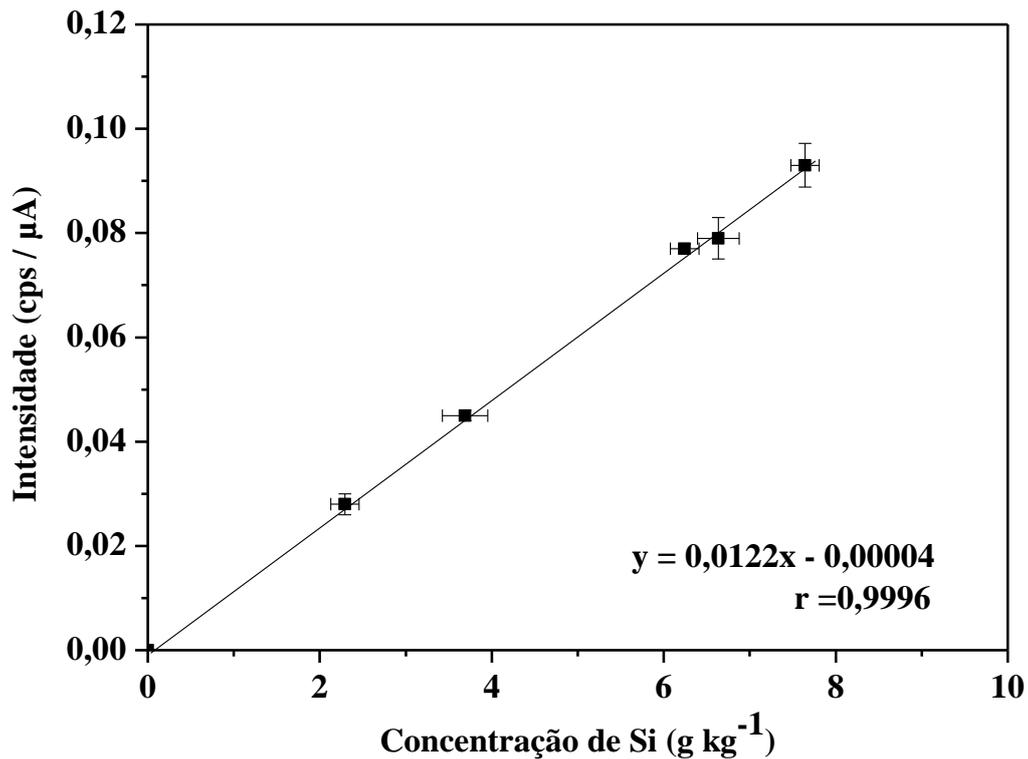
SD: Desvio padrão, CV: coeficiente de variação

As intensidades cps/ $\mu\text{A}$  obtidas por  $\mu\text{ED-XRF}$  com as pastilhas de folhas de cana-de-açúcar foram correlacionadas com as concentrações de Si determinadas por ICP OES após decomposição em meio alcalino. A Figura 5.2 mostra a correlação entre as intensidades

(cps/ $\mu$ A) e as concentrações de Si ( $\text{g kg}^{-1}$ ) das amostras utilizadas neste trabalho. Observou-se boa correlação entre os dados, exceto para as amostras marcadas com círculo: CTC11 [ $(7,74 \pm 0,01) \text{ g kg}^{-1} \text{ Si}$ ], CTC16 [ $(9,77 \pm 0,05) \text{ g kg}^{-1} \text{ Si}$ ] e CTC18 [ $(9,70 \pm 0,02) \text{ g kg}^{-1} \text{ Si}$ ], as quais podem ter apresentado erros aleatórios durante as determinações por ICP OES. A Figura 5.3 mostra a curva analítica de calibração obtida por  $\mu$ ED-XRF utilizando 05 amostras de folhas de cana-de-açúcar moídas e prensadas na forma de pastilhas.

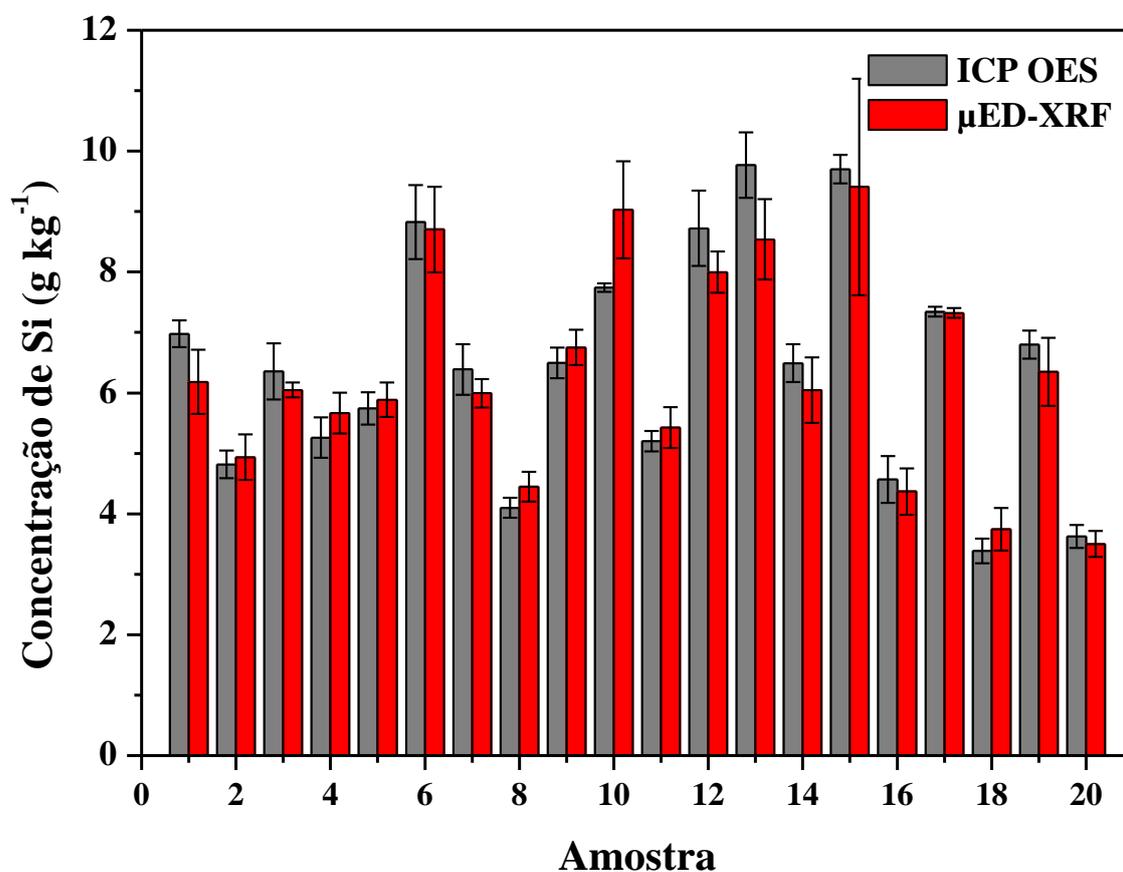


**Figura 5.2** – Correlação entre as intensidades (cps/ $\mu$ A) obtidas por  $\mu$ ED-XRF ( $K_{\alpha} = 1,740 \text{ keV}$ ) na análise das pastilhas e as concentrações de Si ( $\text{g kg}^{-1}$ ) determinadas por ICP OES após digestão alcalina. As barras verticais correspondem a  $\pm 1$  desvio-padrão dos resultados obtidos por  $\mu$ ED-XRF ( $n = 3$ ). As barras horizontais representam o intervalo de confiança das concentrações determinadas por ICP OES ( $n = 3$ ).



**Figura 5.3** - Curva analítica de calibração para Si por  $\mu$ ED-XRF ( $K_{\alpha} = 1,740$  keV). As barras verticais correspondem a  $\pm 1$  desvio-padrão dos resultados obtidos por  $\mu$ ED-XRF ( $n = 3$ ). As barras horizontais representam o intervalo de confiança das concentrações determinadas por ICP OES ( $n = 3$ ).

A Figura 5.4 mostra o gráfico de barras comparando os resultados para determinação de Si entre  $\mu$ ED-XRF e ICP OES. Para comparação dos resultados foram utilizadas 20 amostras na forma de pastilhas de cana-de-açúcar.



**Figura 5.4** - Comparação entre as concentrações de Si determinadas por ICP OES empregando-se a linha Si I 212,412 nm e por  $\mu$ ED-XRF empregando-se  $K_{\alpha} = 1,740$  keV. As barras verticais correspondem a  $\pm 1$  desvio-padrão dos resultados obtidos por  $\mu$ ED-XRF ( $n = 3$ ) e por ICP OES ( $n=3$ ).

Os resultados encontrados nos dois métodos, ICP OES e  $\mu$ ED-XRF, mostraram boa correlação de acordo com o teste *t-Student* pareado ao nível de 95 % de confiança. O valor calculado de *t* foi de 0,84, enquanto o valor crítico para distribuição *t-Student* é 2,09.

## 5.2 Determinação de silício em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar por LIBS

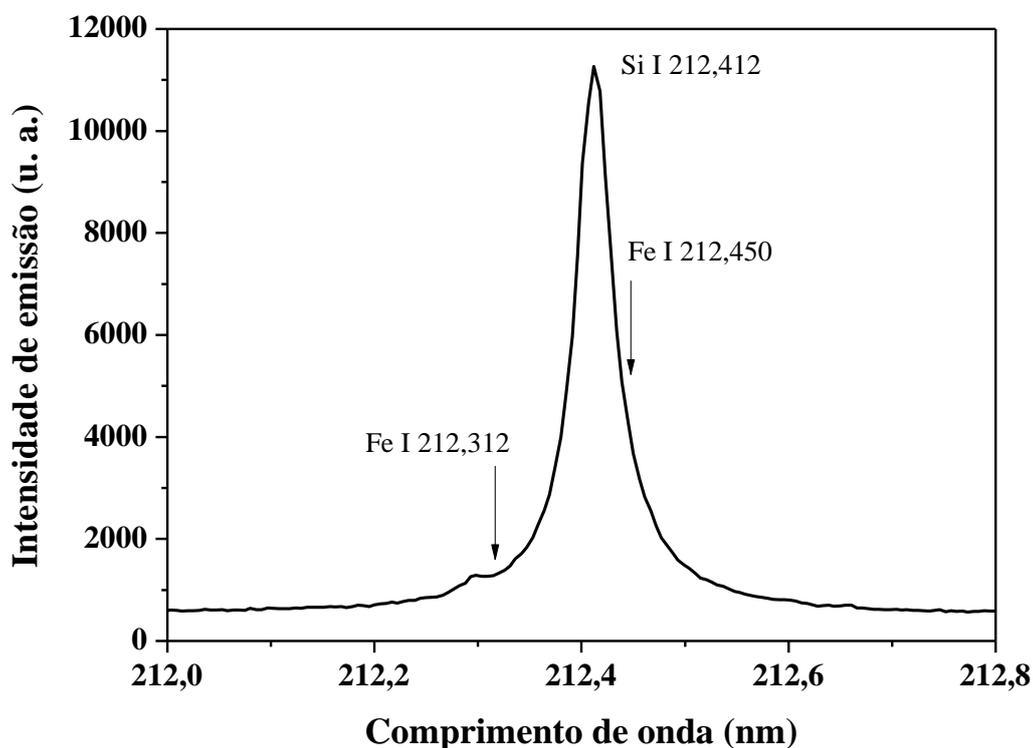
### 5.2.1. Avaliação de interferências espectrais nas linhas de emissão de silício.

Possíveis interferências espectrais foram avaliadas nas linhas de emissão mais intensas de silício (Tabela 5.3). Esta avaliação foi feita com base no banco de dados do National Institute of Standards and Technology (NIST)<sup>91</sup> tomando-se por base a energia de excitação e de ionização dos possíveis interferentes presentes em amostras vegetais. Considerando-se as altas relações de concentrações analito / interferente nas amostras (*e.g.* Si / Fe = 50) e que, em geral, as linhas de emissão desses interferentes são as de menor intensidade relativa, pode-se afirmar que as interferências espectrais desses elementos são desprezíveis na determinação de Si em folhas de cana-de-açúcar.

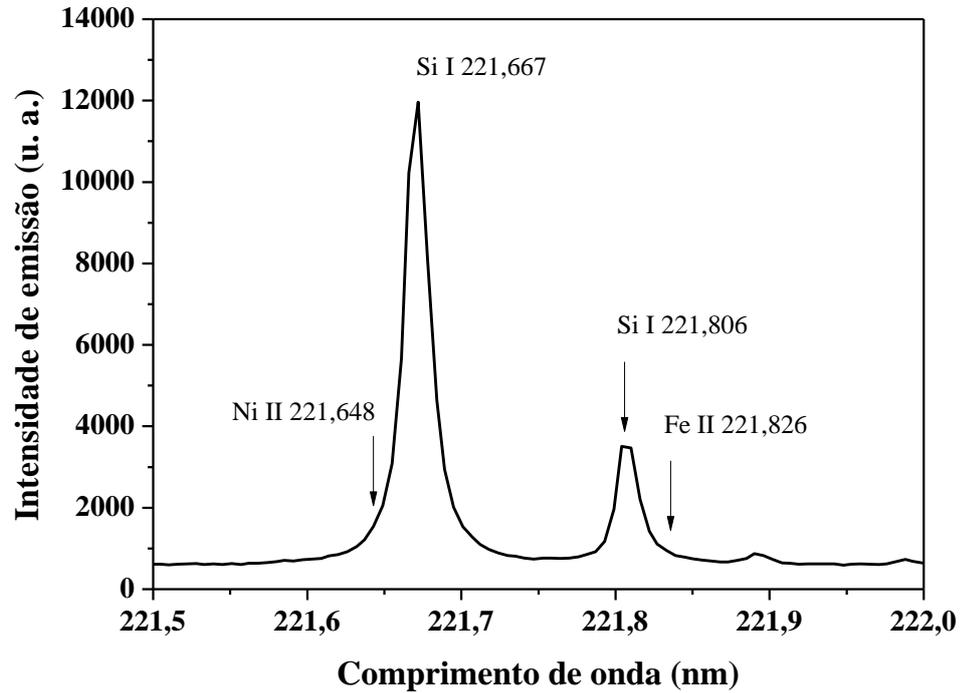
As Figuras 5.5 a 5.8 mostram os sinais de emissão obtidos na determinação de Si. Em geral, como ressaltado, embora a possibilidade teórica de interferências exista, fatores como a energia de excitação ou ionização/excitação e concentração dos interferentes comparados às energias de excitação e concentrações do analito indicaram que não houve interferências significativas. Para validar esta hipótese também foram feitas deconvoluções dos sinais de emissão (PeakFit Software)<sup>92</sup> e não foram observadas interferências significativas. As deconvoluções dos sinais não foram feitas para as linhas Si I 251,432 e Si I 251,611 nm devido à proximidade em comprimento de onda (*i.e.* < 10 pm) entre as linhas do analito e dos possíveis interferentes. Deve-se ressaltar que as linhas de emissão Si I 251,611 e Si I 288,158 nm apresentam excelentes intensidades relativas. No entanto, quando a fluência do laser é de  $50 \text{ J cm}^{-2}$ , o uso destas linhas não é adequado para amostras com alta concentração de Si (*e.g.*  $9,77 \pm 0,05 \text{ g kg}^{-1}$ ) devido à saturação do detector ICCD. A linha Si I 288,158 nm apresenta teoricamente interferência da linha Fe I 288,180 nm. Contudo, de acordo com os dados do NIST<sup>91</sup>, as relações de intensidades relativas entre essas linhas é Si/Fe = 1000. Deve-se ressaltar que as intensidades relativas fornecidas pelo NIST servem apenas como uma referência de comparação qualitativa, uma vez que foram propostas para condições físicas diferentes daquelas encontradas em plasmas induzidos por lasers.

**Tabela 5.3** – Linhas de emissão de interferentes nas determinações de Si em folhas de cana-de-açúcar.

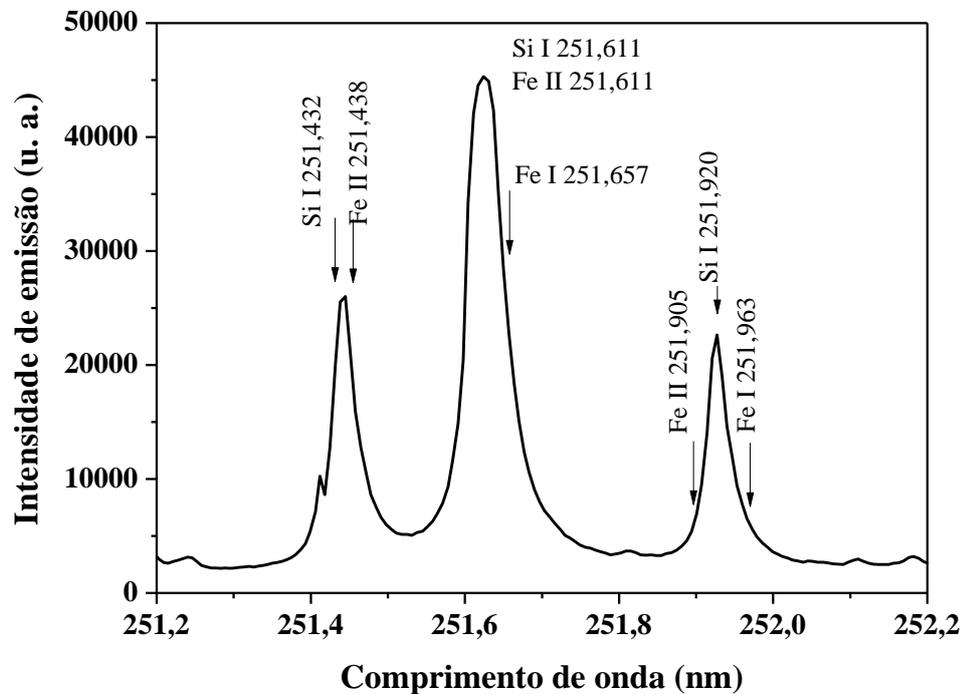
<b>Analito</b>	<b>Interferências</b>
Si I 212,412 nm	Fe I 212,312 e Fe I 212,450 nm
Si I 221,667 nm	Ni II 221,648 nm
Si I 221,806 nm	Fe II 221,826 nm
Si I 251,432 nm	Fe II 251,438 nm
Si I 251,611 nm	Fe II 251,611 e Fe I 251,625 nm
Si I 251,920 nm	Fe II 251,905 e Fe I 251,963 nm
Si I 288,158 nm	Fe I 288,180 nm



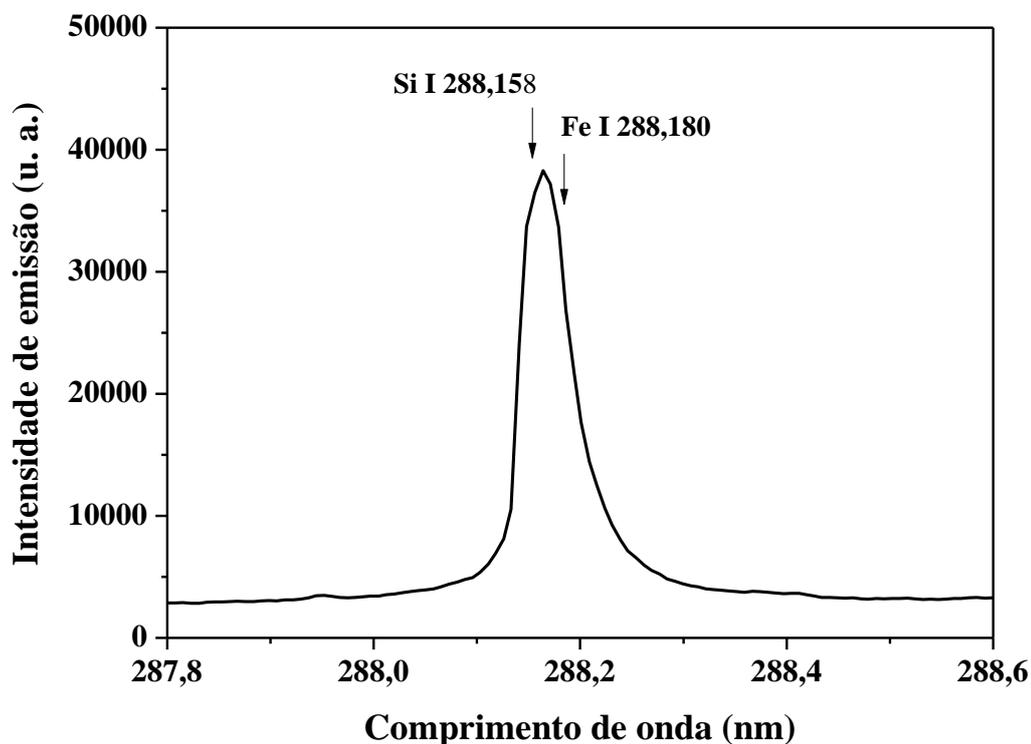
**Figura 5.5** - Fragmento do espectro de emissão obtido em pastilha de folhas de cana-de-açúcar (CTC16) mostrando o sinal de emissão de Si I 212,412 nm ( $9,77 \pm 0,05 \text{ g kg}^{-1}$ ) aplicando-se 25 pulsos de  $50 \text{ J cm}^{-2}$ . Tempo de atraso  $2,0 \mu\text{s}$  e tempo de integração  $4,5 \mu\text{s}$ .



**Figura 5.6** - Fragmento do espectro de emissão obtido em pastilha de folhas de cana-de-açúcar (CTC16) mostrando os sinais de emissão de Si I 221,667 e Si I 221,806 nm ( $9,77 \pm 0,05 \text{ g kg}^{-1}$ ) aplicando-se 25 pulsos de  $50 \text{ J cm}^{-2}$ . Tempo de atraso  $2,0 \mu\text{s}$  e tempo de integração  $4,5 \mu\text{s}$ .



**Figura 5.7** - Fragmento do espectro de emissão obtido em pastilha de folhas de cana-de-açúcar (CTC16) mostrando os sinais de emissão de Si I 251,432, Si I 251,611 e Si I 251,920 nm ( $9,77 \pm 0,05 \text{ g kg}^{-1}$ ) aplicando-se 20 pulsos de  $50 \text{ J cm}^{-2}$ . Tempo de atraso  $2,0 \mu\text{s}$  e tempo de integração  $4,5 \mu\text{s}$ .

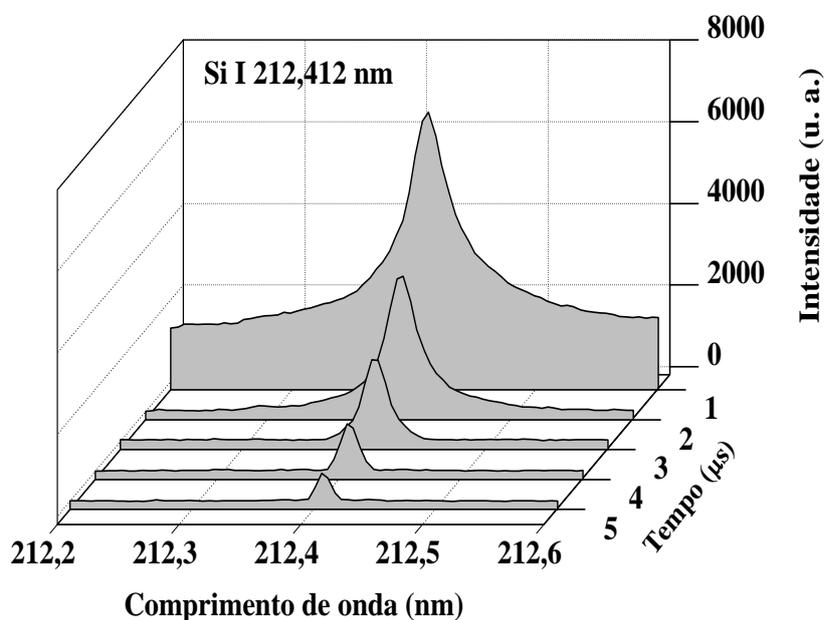


**Figura 5.8** - Fragmento do espectro de emissão obtido em pastilha de folhas de cana-de-açúcar (IAC87-3396) mostrando os sinais de emissão de Si I 288,158 nm ( $3,38 \pm 0,02 \text{ g kg}^{-1}$ ) aplicando-se 25 pulsos de  $50 \text{ J cm}^{-2}$ . Tempo de atraso  $2,0 \mu\text{s}$  e tempo de integração  $4,5 \mu\text{s}$ .

### 5.2.2 Avaliação da evolução temporal dos sinais de emissão

O tempo de atraso é definido como o tempo decorrido a partir do pulso do laser a partir do qual é (são) feita(s) a(s) medida(s) da(s) intensidade(s) dos sinais de emissão e é um dos fatores que afetam as determinações feitas por LIBS. O tempo de abertura do detector para aquisição do sinal é definido como tempo de integração. Imediatamente após o pulso do laser, uma contribuição do *continuum* que é a luz branca emitida pelo plasma proveniente de dois fatores: efeito *bremmsstrahlung* que é provocado por colisões entre elétrons, íons e átomos e a recombinação de elétrons com íons. A recombinação ocorre quando um elétron livre é capturado em um nível energético atômico ou iônico, liberando energia na forma de um fóton. Este evento favorece positivamente o aumento da temperatura do plasma e a emissão de linhas de elevada energia de excitação. Os espectros de emissão do *continuum* e dos elementos químicos presentes no plasma alteram-se com a evolução temporal do plasma.

Neste sentido, embora trabalhos recentes já tenham demonstrado o perfil de evolução temporal de macro e micronutrientes em plasmas induzidos por laser em folhas de tecidos vegetais, foram realizados experimentos variando o tempo de atraso de 1 a 5  $\mu\text{s}$  com a finalidade de discriminar o sinal de emissão de emissão de silício e a razão sinal/ *continuum* e sinal/ruído. A Figura 5.9 mostra a evolução temporal da linha de emissão de Si I 212,412 nm em uma pastilha de cana-de-açúcar. O tempo de integração foi mantido em 4,5  $\mu\text{s}$  conforme recomendado por Nunes et al.<sup>88</sup>



**Figura 5.9** - Evolução temporal da linha de emissão Si I 212,412 nm em plasma induzido por laser em pastilha da variedade CTC7. Fluência:  $50 \text{ J cm}^{-2}$  e tempo de integração: 4,5  $\mu\text{s}$ .

Observou-se que, quanto maior o tempo de atraso, o sinal de emissão do *continuum* tende a diminuir. Os resultados obtidos para a evolução temporal da linha Si I 212,412 nm e do decaimento do *continuum* de radiação mostraram que em tempos de atraso maior que 2  $\mu\text{s}$  a razão sinal / *continuum* de radiação diminui continuamente. Observando que nestas condições a sensibilidade analítica é maior, optou-se por utilizar o tempo de atraso de 2,0  $\mu\text{s}$ .

### 5.2.3 Avaliação da fluência do laser e do diâmetro de focalização

Em geral as análises por LIBS são feitas com a superfície da amostra posicionada próximo ao ponto focal da lente convergente, pois a proximidade do foco pode originar pequenos diâmetros de focalização sobre a superfície da amostra (*e.g.* 20 a 100  $\mu\text{m}$ ). Nesta condição, geralmente, baixa energia do laser é necessária para alcançar altas fluências. Por exemplo, um laser de 25 mJ quando focalizado em diâmetro de 100  $\mu\text{m}$  gera uma fluência de  $241 \text{ J cm}^{-2}$ . Essa fluência é suficientemente alta para gerar plasma no ar, ou em qualquer outro material, e é muito maior do que as fluências geralmente usadas em LIBS, podendo causar efeitos de blindagem no plasma<sup>93</sup>. A focalização em baixos diâmetros tem um apelo comercial forte na construção de equipamentos LIBS de bancada e, principalmente, na construção de equipamentos portáteis, pois evita o uso de lasers de maior energia, os quais são mais caros e necessitam de uma unidade de refrigeração. No entanto, baixos diâmetros de focalização levam a ablação de pequenas massas de amostras (*i.e.*  $< 20 \mu\text{g}$ ) o que compromete a repetibilidade das medidas em amostras consideradas pouco homogêneas<sup>72, 94-96</sup>. Inicialmente optou-se por utilizar as condições previamente recomendadas por Nunes<sup>88</sup> com fluência do laser de  $25 \text{ J cm}^{-2}$  e diâmetros de focalização de 750  $\mu\text{m}$  para determinação de macro e micronutrientes em tecido vegetal (Tabela 5.4).

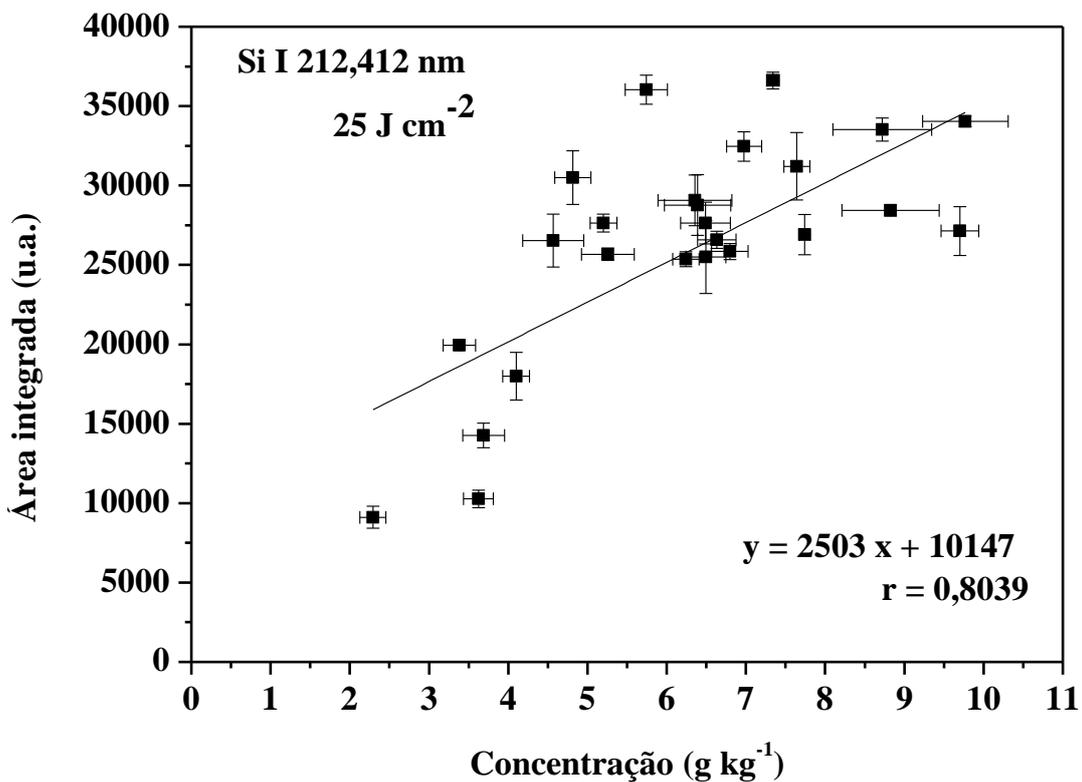
**Tabela 5.4** - Condições previamente recomendadas por Nunes<sup>88</sup> para determinação de macro e micronutrientes em tecido vegetal.

Variáveis otimizadas	
Energia por pulso de laser:	110 mJ
Distancia lente-amostra (LTSD):	17,5 cm
Diâmetro de focalização:	750 $\mu\text{m}$
Fluência do laser	$25 \text{ J cm}^{-2}$
Numero de pulsos acumulados por cratera ( $n_p$ ):	25
Tempo de integração do sinal ( $t_i$ ):	4,5 $\mu\text{s}$
Tempo de atraso ( $t_{\text{atraso}}$ ):	2,0 $\mu\text{s}$

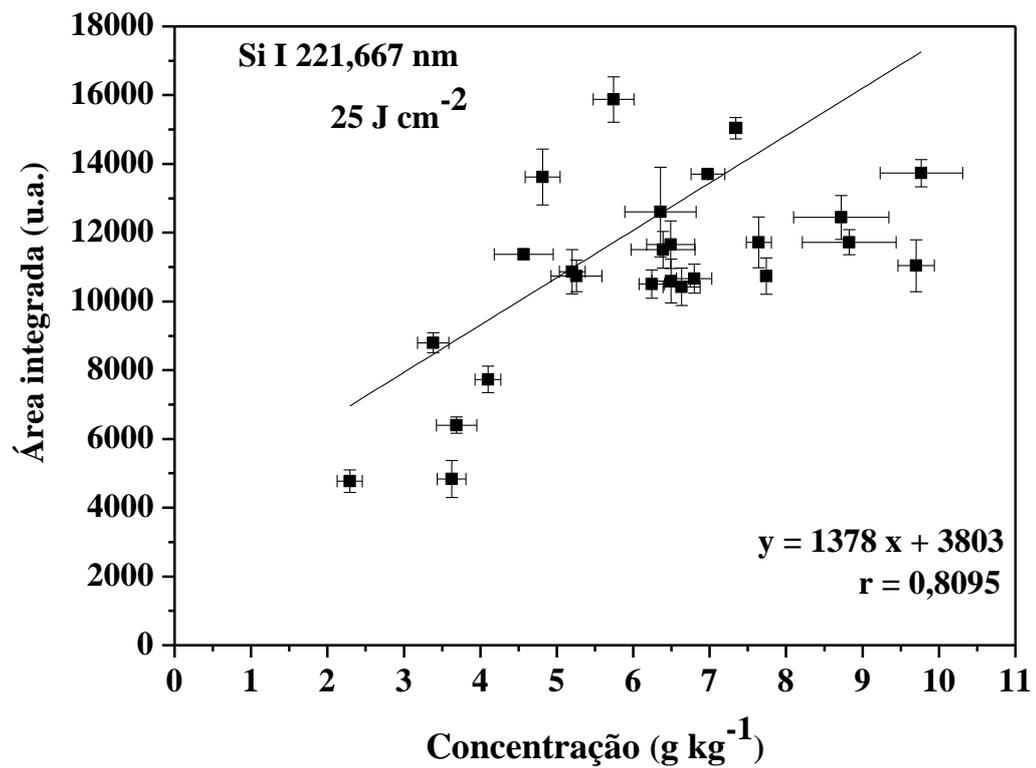
Após o tratamento dos dados utilizando o software ESAWIN e MATLAB<sup>®</sup>, as concentrações de Si ( $\text{g kg}^{-1}$ ) determinadas por ICP OES após decomposição alcalina foram correlacionadas com as áreas integradas dos sinais de emissão obtidos por LIBS.

As linhas de emissão avaliadas na análise das pastilhas por LIBS foram Si I 212,412, Si I 221,667 e Si I 288,158 nm. Essas linhas foram escolhidas em função da intensidade de emissão e faixa útil de calibração visando a não saturação do detector ICCD. As Figuras 5.10 a 5.12 mostram que houve grande dispersão dos resultados nas curvas de correlação.

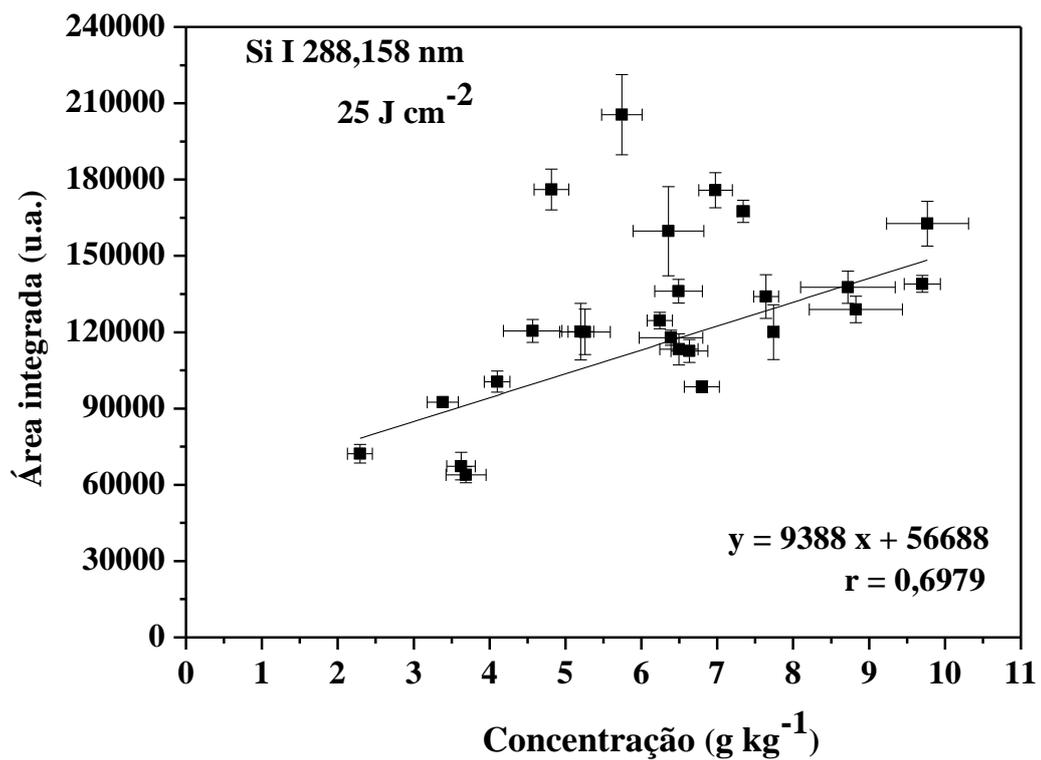
Esses efeitos foram provavelmente causados por interferências de matriz na interação entre o laser e as amostras.



**Figura 5.10** – Correlação entre as concentrações de Si determinadas por ICP OES após digestão alcalina e as áreas integradas dos sinais de emissão obtidos por LIBS usando a linha Si I 212,412 nm com 25 pulsos de  $25 \text{ J cm}^{-2}$ . As barras verticais correspondem a  $\pm 1$  desvio-padrão dos resultados obtidos por LIBS ( $n = 30$  crateras). As barras horizontais representam o intervalo de confiança das concentrações determinadas por ICP OES ( $n=3$ ).



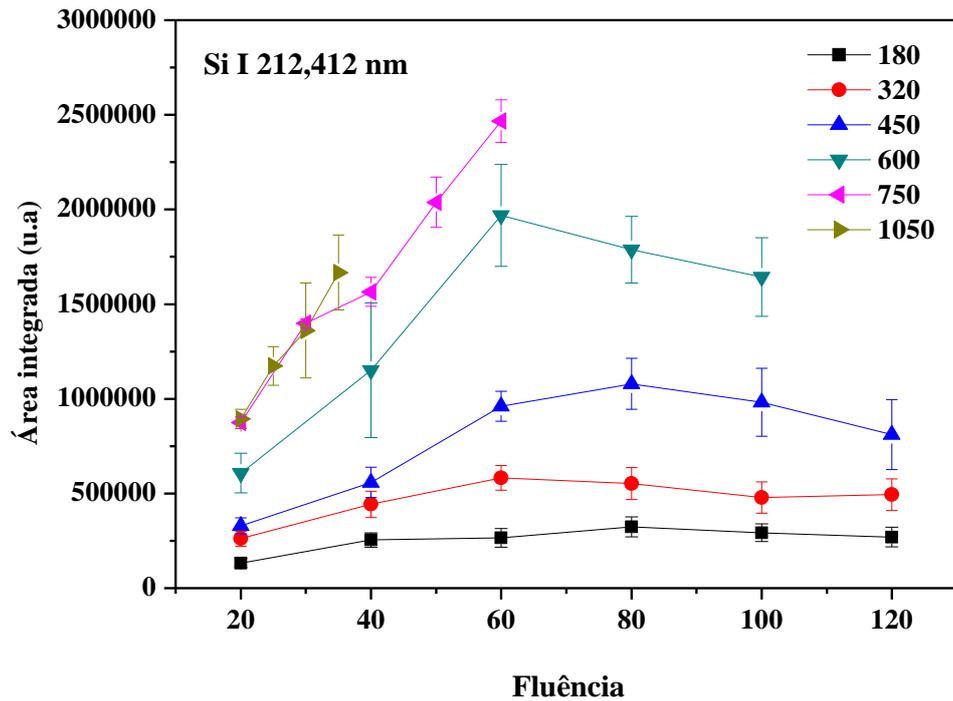
**Figura 5.11** - Correlação entre as concentrações de Si determinadas por ICP OES após digestão alcalina e as áreas integradas dos sinais de emissão obtidos por LIBS usando a linha Si I 221,667 nm com 25 pulsos de 25 J cm<sup>-2</sup>. As barras verticais correspondem a  $\pm 1$  desvio-padrão dos resultados obtidos por LIBS (n = 30 crateras). As barras horizontais representam o intervalo de confiança das concentrações determinadas por ICP OES (n=3).



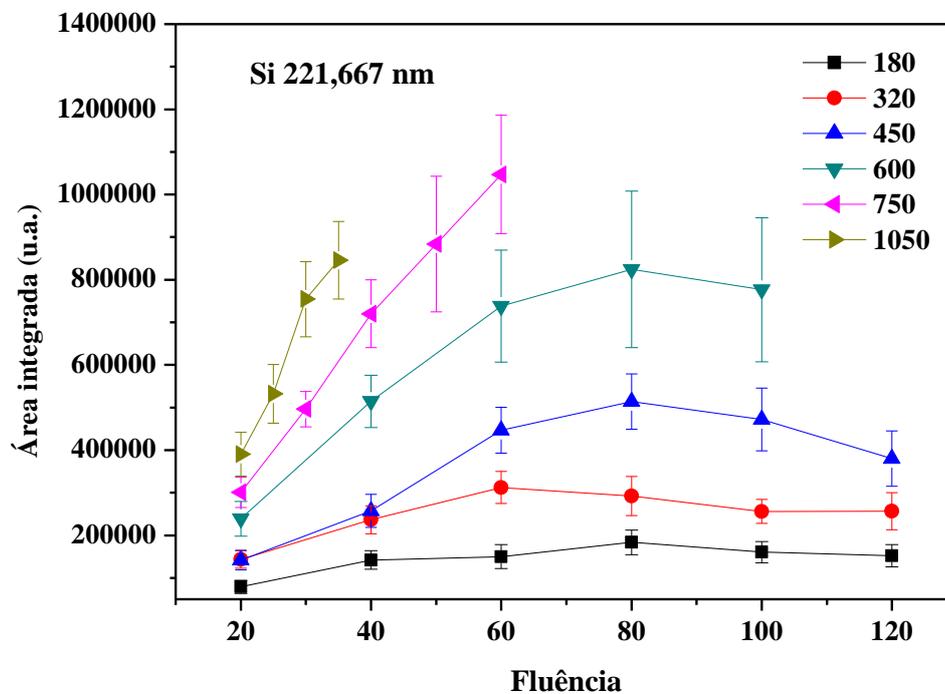
**Figura 5.12** - Correlação entre as concentrações de Si determinadas por ICP OES após digestão alcalina e as áreas integradas dos sinais de emissão obtidos por LIBS usando a linha Si I 288,158 nm com 25 pulsos de 25 J cm<sup>-2</sup>. As barras verticais correspondem a  $\pm 1$  desvio-padrão dos resultados obtidos por LIBS (n = 30 crateras). As barras horizontais representam o intervalo de confiança das concentrações determinadas por ICP OES (n=3).

Estudos recentes<sup>14</sup> mostraram que maiores fluências e diâmetros de focalização promovem a remoção de maior quantidade da amostra durante a ablação contribuindo para maior eficiência dos processos de vaporização, atomização, e excitação dos analitos. Alguns dados experimentais também indicaram que é possível aumentar a massa amostrada em pastilhas de tecido vegetal de 6 para 161  $\mu\text{g}$  apenas aumentando a fluência e o diâmetro de focalização do laser na superfície da pastilha,<sup>14</sup> proporcionando uma maior representatividade da massa amostrada. Conseqüentemente, ocorrem aumentos nos sinais de emissão característicos dos elementos químicos presentes na pastilha da amostra.<sup>97</sup> Alguns resultados indicam que os efeitos de matriz podem ser minimizados usando fluências do laser mais altas.<sup>14</sup> Além disso, existem indícios experimentais que demonstram que os aumentos da fluência e do diâmetro de focalização aumentam significativamente o volume do plasma, proporcionando maior eficiência de coleta dos sinais de emissão quando o plasma é espacialmente integrado pelo conjunto óptico. O aumento do volume do plasma pode proporcionar também maior transparência óptica ao plasma e maior tempo de decomposição das partículas que interagem com o plasma. Neste sentido, embora a otimização experimental proposta por Nunes<sup>88</sup> tenha sido adequada para determinação de macro e micronutrientes em folhas de cana-de-açúcar, optou-se por reavaliar os diâmetros de focalização e fluência do laser visando a determinação de Si. O diâmetro de focalização foi variado de 180 a 1050  $\mu\text{m}$  e a fluência do laser de 20 a 120  $\text{J cm}^{-2}$ .

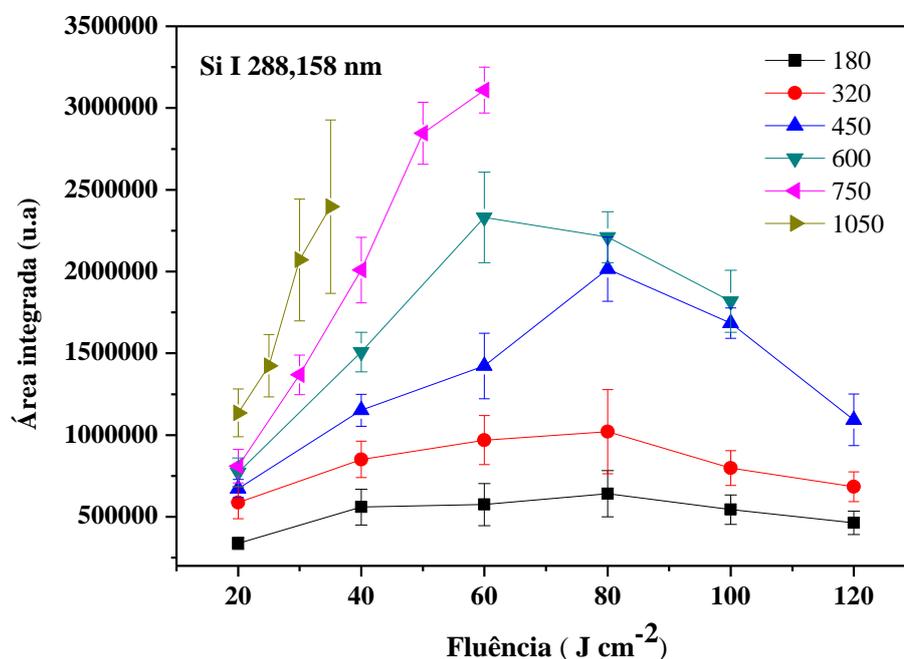
Observa-se nas Figuras 5.13 a 5.15 que ocorre uma ligeira redução da linearidade em todas as linhas de emissão para fluências maiores de 60  $\text{J cm}^{-2}$ . Esse efeito é provavelmente atribuído à blindagem do plasma (*shielding effect*) provocada pela elevada densidade eletrônica (i.e.  $10^{21} \text{ e}^-/\text{cm}^3$ ) e aos processos de auto-absorção.<sup>6, 68</sup> A alta densidade eletrônica resulta num plasma opaco levando ao espalhamento e absorção parcial da radiação do pulso do laser, favorecendo a diminuição do processo de ablação e conseqüentemente das intensidades de emissão do elemento de interesse a ser determinado por LIBS. De acordo com Meissner et al.<sup>98</sup> a temperatura do plasma induzido por laser sobre superfícies metálicas aumenta linearmente com a fluência.<sup>93, 99</sup> O aumento das intensidades, segundo Aguilera et al.,<sup>100</sup> é devido ao aumento da massa ablada e do número de átomos vaporizados no interior do plasma, e o volume dos plasmas induzidos é proporcional ao aumento da fluência. A remoção de massas maiores influencia nos processos de amostragem assistidos por ablação com laser tornando-os mais representativos.



**Figura 5.13** - Efeito da fluência na intensidade de emissão de Si I 212,412 nm em pastilha de folha de cana-de-açúcar (CTC12) para diâmetros de focalização entre 180 e 1050 µm. As barras de incerteza correspondem a  $\pm 1$  desvio-padrão (25 pulsos por ponto de ablação, n = 30 pontos).



**Figura 5.14** - Efeito da fluência na intensidade de emissão de Si I 221,667 nm em pastilha de folha de cana-de-açúcar (CTC12) para diâmetros de focalização entre 180 e 1050 µm. As barras de incerteza correspondem a  $\pm 1$  desvio-padrão (25 pulsos por ponto de ablação, n = 30 pontos).



**Figura 5.15** - Efeito da fluência na intensidade de emissão de Si I 288,158 nm em pastilha de folha de cana-de-açúcar (CTC12) para diâmetros de focalização entre 180 e 1050  $\mu\text{m}$ . As barras de incerteza correspondem a  $\pm 1$  desvio-padrão (25 pulsos por ponto de ablação,  $n = 30$  pontos).

As Figuras 5.13 a 5.15 mostram que existe um compromisso entre diâmetro de focalização e fluência do laser para alcançar maior sensibilidade analítica. Essa condição experimental pode não ser decisiva para determinação de elementos químicos em altas concentrações, mas mostram-se decisivas, por exemplo, para determinação de micronutrientes e elementos traço em amostras de interesse ambiental.<sup>70, 101</sup> Deve-se ressaltar que existe uma indicação que diâmetros maiores que 750  $\mu\text{m}$  proporcionam maior intensidade de emissão, contudo não foi possível avaliar fluências maiores que 35  $\text{J cm}^{-2}$  em diâmetros de 1050  $\mu\text{m}$ , devido à limitação de energia do laser usado neste trabalho. Neste sentido, observa-se que a utilização do diâmetro de focalização de 750  $\mu\text{m}$  e fluências mais altas proporcionaram maior sinal de intensidade das linhas de emissão de Si. Como já ressaltado, essas diferenças devem ter sido causadas face às maiores massas amostradas, ao maior volume de observação do plasma e, principalmente, a maior energia disponível para vaporização, atomização e excitação do analito, o que pode diminuir os efeitos de matriz.

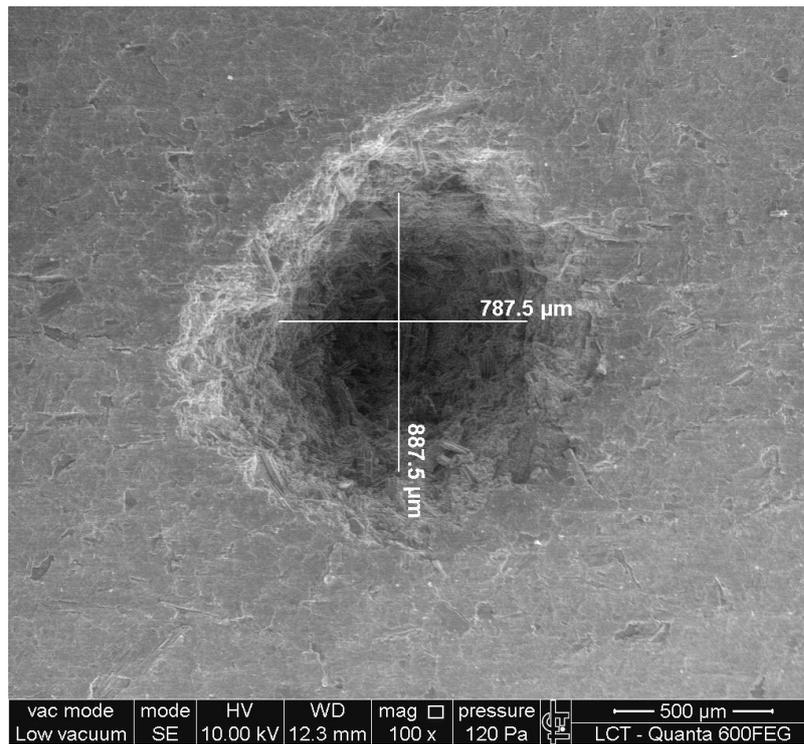
De acordo com Sirven et al.,<sup>71</sup> maiores fluências e diâmetros de focalização do laser

favorecem uma melhor razão sinal ruído (SNR), obtendo-se maior repetibilidade das medidas de intensidades em função das massas ablatadas. Para avaliar a massa ablada das pastilhas foi mantido o diâmetro de focalização de 750  $\mu\text{m}$  e fluências de 25  $\text{J cm}^{-2}$  e 50  $\text{J cm}^{-2}$ . Foram selecionadas duas amostras de folhas de cana-de-açúcar das variedades CTC18 e RB86-7515 que apresentaram concentrações de Si de  $9,70 \pm 0,02 \text{ g kg}^{-1}$  e  $3,68 \pm 0,03 \text{ g kg}^{-1}$ , respectivamente. Nestas variedades também foram determinados os teores de lignina, celulose e fibra como mostra a Tabela 5.5. De acordo com Gomes et al.<sup>83</sup>, as propriedades químicas e físicas das amostras tais como fibra, lignina e celulose podem ser associadas a possíveis efeitos de matriz durante o preparo das amostras influenciando, por exemplo, na redução do tamanho das partículas o que influenciaria posteriormente na interação do laser com a superfície das pastilhas. Os resultados obtidos indicam diferenças significativas, principalmente, para os valores de lignina e fibra nessas amostras. Essas diferenças podem ter provocado os efeitos de matriz observados quando foi feita a correlação das concentrações de silício determinadas por ICP OES com os resultados de intensidades de emissão obtidos por LIBS usando a fluência do laser de 25  $\text{J cm}^{-2}$ . No entanto, investigações mais aprofundadas devem ser feitas para comprovar esta hipótese. Neste caso, devem-se determinar os teores de lignina e fibras em todas as variedades de cana-de-açúcar investigadas neste trabalho e avaliar criteriosamente se os efeitos de matriz observados estão relacionados à redução do tamanho de partículas, à interação do laser com as pastilhas no processo de decomposição e vaporização do material, ou se ambos os efeitos são significativos. Dados obtidos recentemente demonstraram que variações na distribuição do tamanho das partículas de tecido vegetal podem proporcionar diferenças significativas nas intensidades dos sinais de emissão dos analitos. Além disso, os autores demonstraram que fluências mais elevadas podem minimizar os efeitos do tamanho das partículas.<sup>14</sup> Conhecendo se o problema pode ser relacionado ou não às distribuições dos tamanhos das partículas, poderiam ser conduzidas investigações sobre a influência dos teores de lignina e fibra nas amostras que ficaram fora das curvas de correlação entre concentração e intensidade de sinais de emissão obtidos por LIBS.

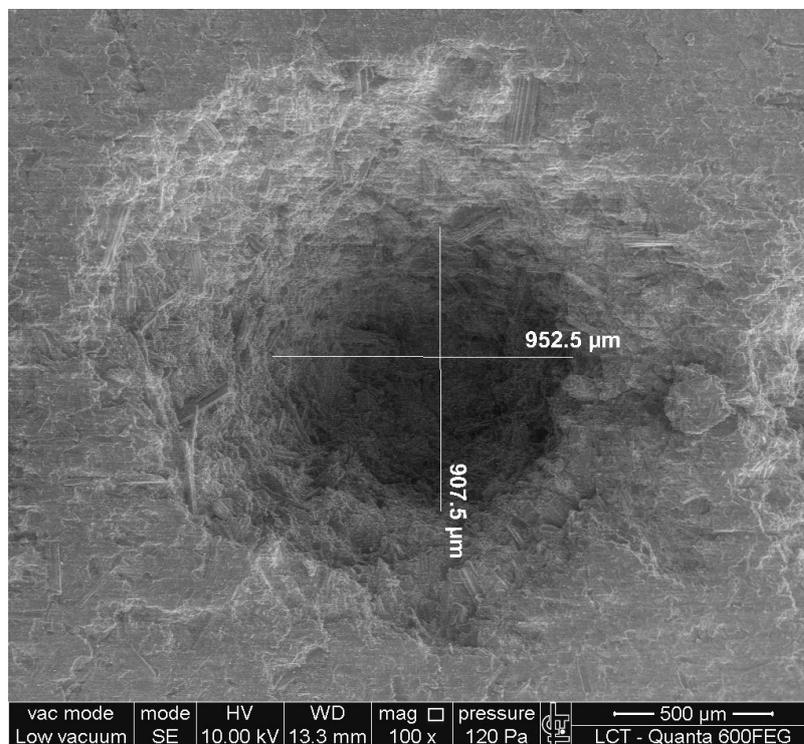
**Tabela 5.5** - Concentrações (%) de lignina, celulose e fibra em folhas de cana-de-açúcar.

<b>Variedade</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Fibra (%)</b>
CTC 18	5,9 ± 0,2	37,0 ± 0,6	44,6 ± 0,5
IAC 867515	4,0 ± 0,1	35,4 ± 1,0	39,7 ± 0,7

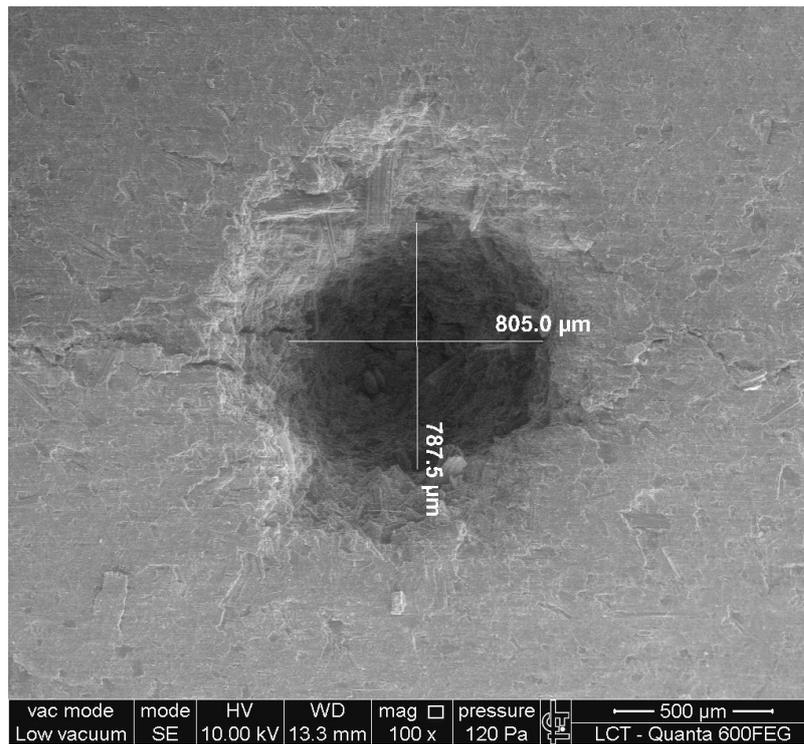
Foram obtidas imagens de microscopias eletrônicas de varredura (MEV) das crateras após ablação com laser em pastilhas das variedades CTC18 e RB86-7515 (Figuras 5.16 a 5.19). É possível inferir que, utilizando-se a fluência de  $25 \text{ J cm}^{-2}$ , menores diâmetros foram obtidos quando comparados ao uso de fluência de  $50 \text{ J cm}^{-2}$ . Com certa ressalva, pode-se também inferir que a ablação nas amostras RB86-7515, a qual possui menor teor de fibras e lignina, apresentou crateras de ablação mais homogêneas com menor efeito de borda decorrente da interação laser/amostra e da expansão da onda de choque e da pluma do plasma. Em geral, a remoção de massas por ablação é estimada em função da densidade da pastilha e do volume da cratera determinado a partir de dados obtidos utilizando perfilômetro ou microscópio óptico com software adequado para coleção e tratamento de imagens. Neste trabalho não foram feitas estimativas da massa da cratera devido a indisponibilidades destes equipamentos. Nunes<sup>88</sup> estimou a massa removida de uma cratera utilizando folhas de espinafre (CRM NIST 1570a) e fluência de  $25 \text{ J cm}^{-2}$  em  $110 \mu\text{g}$ . Posteriormente, Carvalho<sup>14</sup> estimou a massa de  $160 \mu\text{g}$  removida por cratera formada em pastilha de Boldo do Chile empregando-se fluência de  $50 \text{ J cm}^{-2}$ .



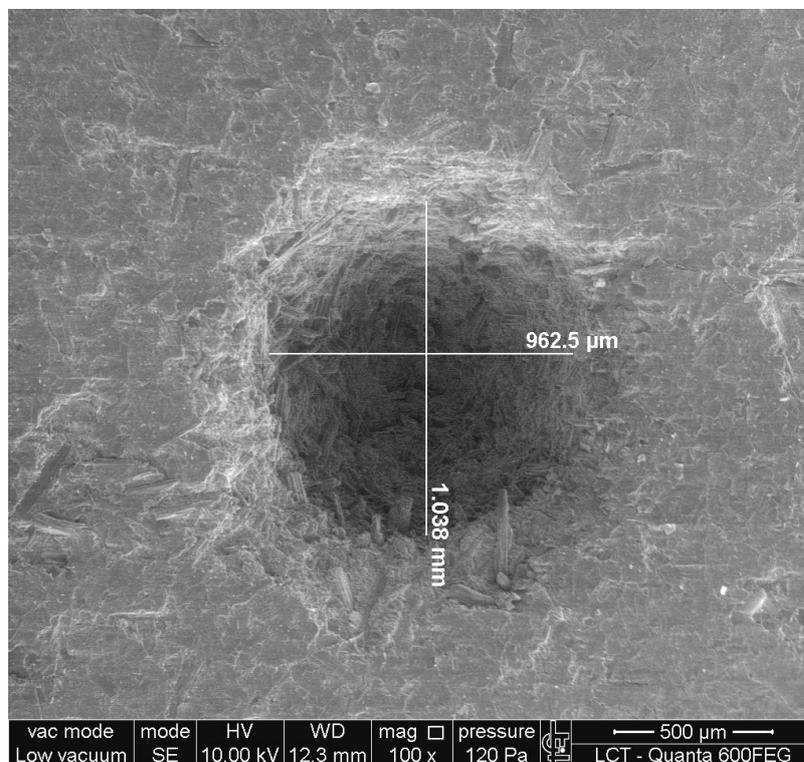
**Figura 5.16** – MEV da cratera formada em pastilha de folha de cana-de-açúcar (CTC18). 25 pulsos de laser (10 Hz) com  $25 \text{ J cm}^{-2}$ . Magnificação: 100x.



**Figura 5.17** - MEV da cratera formada em pastilha de folha de cana-de-açúcar (CTC18). 25 pulsos de laser (10 Hz) com  $50 \text{ J cm}^{-2}$ . Magnificação: 100x.

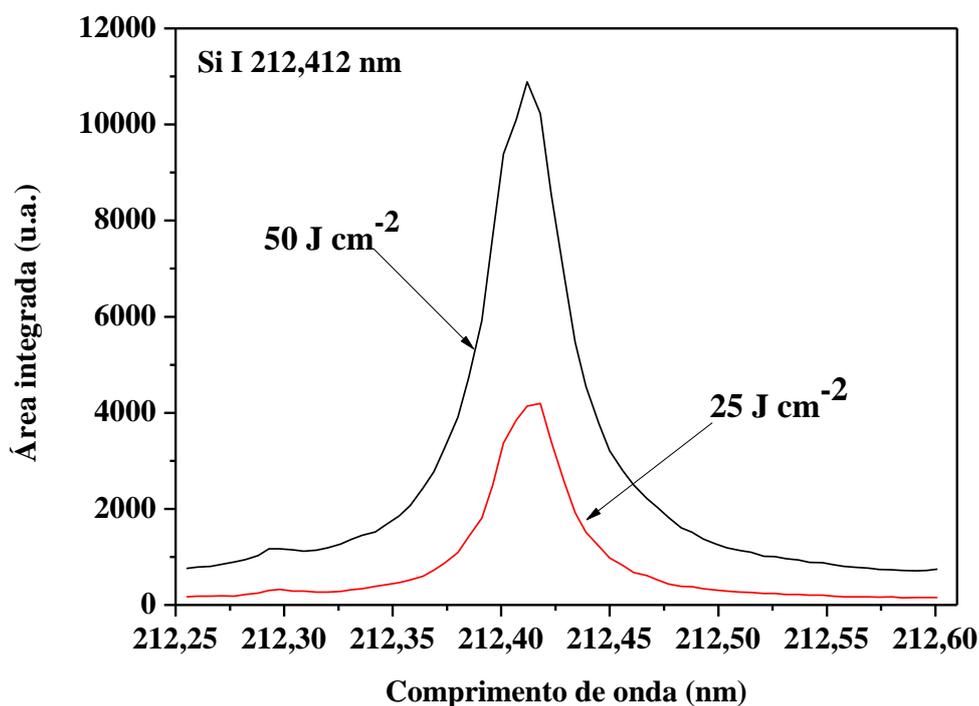


**Figura 5.18** - MEV da cratera formada em pastilha de folha de cana-de-açúcar (RB86-7515). 25 pulsos de laser (10 Hz) com  $25 \text{ J cm}^{-2}$ . Magnificação: 100x.

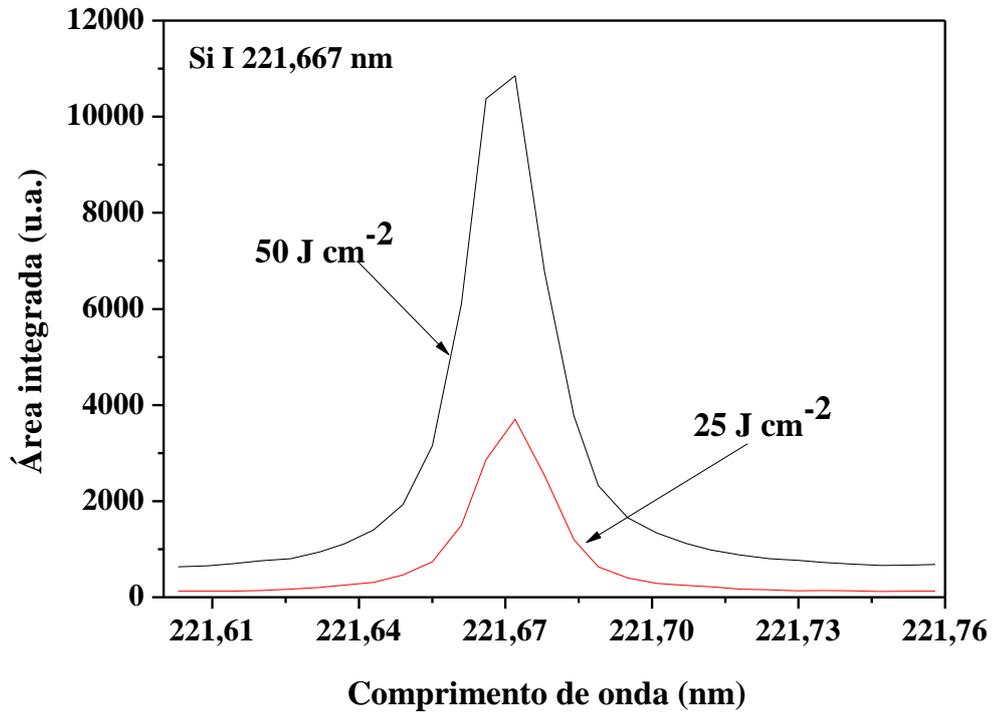


**Figura 5.19** - MEV da cratera formada em pastilha de folha de cana-de-açúcar (RB86-7515). 25 pulsos (10 Hz) de laser com  $50 \text{ J cm}^{-2}$ . Magnificação: 100x.

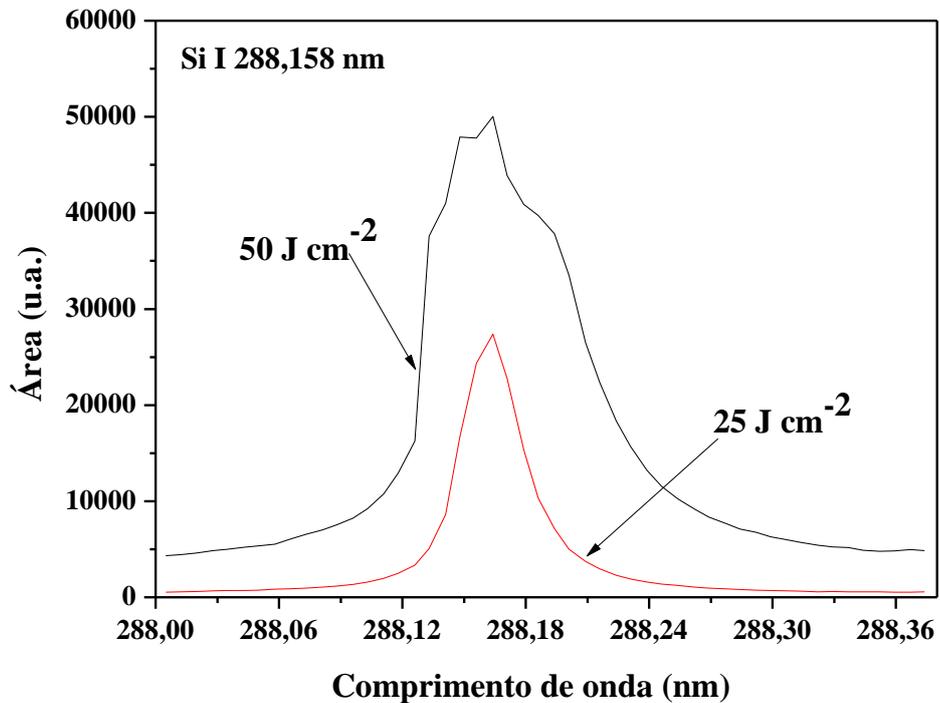
As Figuras 5.20 a 5.22 mostram as intensidades de emissão utilizando fluências de 25 e 50 J cm<sup>-2</sup> e diâmetro de focalização de 750 μm. Para a linha Si 288,158 nm observou-se saturação do detector ICCD e, possivelmente, efeitos de auto-absorção devido à elevada concentração de Si nesta amostra (8,72 ± 0,06 g kg<sup>-1</sup>). Em geral, o aumento de intensidade dos sinais para as linhas 212,412 e 221,667 nm foi de 2,5 vezes. Considerando-se as massas estimadas por Nunes<sup>88</sup> (i.e. 110 μg) para fluência de 25 J cm<sup>-2</sup> e por Carvalho<sup>14</sup> (i.e. 160 μg) para fluência de 50 J cm<sup>-2</sup>, assim como as diferenças nas microscopias mostradas nas Figuras 5.12 a 5.15, pode-se inferir que além do efeito da maior massa amostrada outros efeitos são produzidos quando fluências mais elevadas são usadas. Entre esses, destaca-se o maior volume do plasma e a maior quantidade de energia disponível para ablação. Esses efeitos, como já destacado, favorecem os processos de vaporização, atomização e excitação do analito, podendo minimizar os efeitos de matriz entre as amostras.



**Figura 5.20** – Fragmentos do espectro mostrando a comparação dos sinais de emissão de Si I 212,412 nm utilizando 25 pulsos de laser com 25 J cm<sup>-2</sup> e 50 J cm<sup>-2</sup> (amostra CTC13).

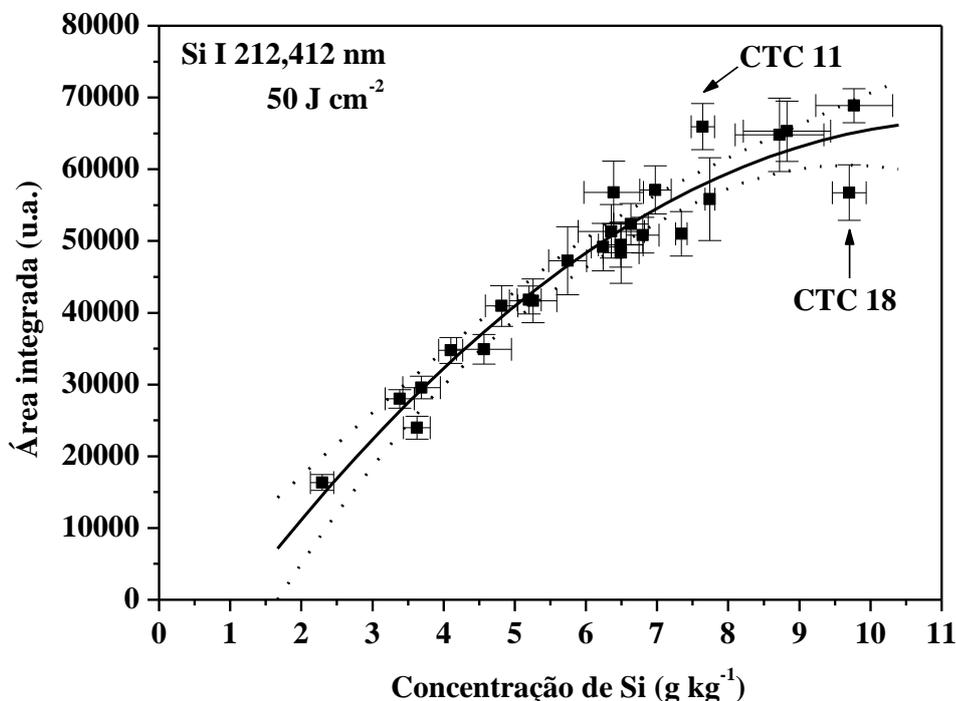


**Figura 5.21** – Fragmentos do espectro mostrando a comparação dos sinais de emissão de Si I 221,667 nm utilizando 25 pulsos de laser com 25 J cm<sup>-2</sup> e 50 J cm<sup>-2</sup> (amostra CTC13).

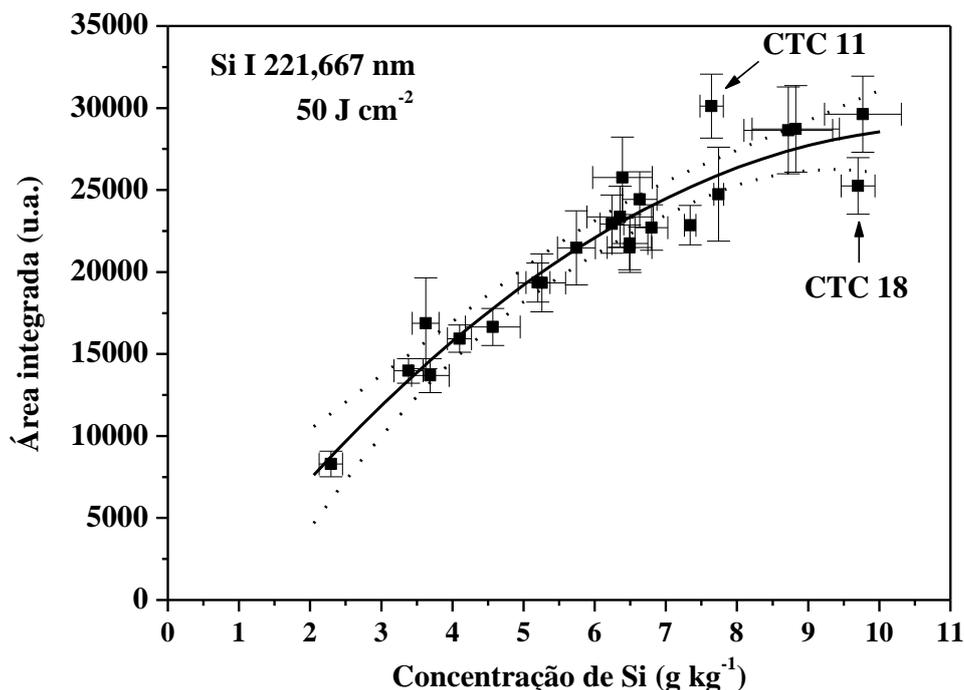


**Figura 5.22** – Fragmentos do espectro mostrando a comparação dos sinais de emissão de Si I 288,158 nm utilizando 25 pulsos de laser com 25 J cm<sup>-2</sup> e 50 J cm<sup>-2</sup> (amostra CTC13).

As Figuras 5.23 e 5.24 mostram as correlações entre concentrações e intensidade de emissão para as linhas Si 212,412 nm e 221,667 nm. A linha de emissão Si I 288,158 nm não foi usada devido à saturação do detector ICCD, mas deve-se ressaltar que esta linha de emissão pode ser usada para determinação de silício em baixas concentrações ou quando detector menos sensível for utilizado. Observa-se que utilizando fluência de  $50 \text{ J cm}^{-2}$  menores dispersões foram obtidas quando comparadas com as correlações obtidas usando fluência de  $25 \text{ J cm}^{-2}$ . Neste sentido, existe o indicativo que o uso de fluências mais altas pode, até certo limite, minimizar os efeitos de matriz. Observou-se também que existe uma região linear até aproximadamente  $6,50 \text{ g kg}^{-1} \text{ Si}$  e que após esta concentração efeitos de auto-absorção podem ser esperados. Considerando-se o perfil de auto-absorção e as bandas de confiança da função polinomial nas correlações obtidas usando as linhas de emissão Si I 212,412 e 221,667 nm, observa-se que efeitos de matriz ou resultados errôneos obtidos por ICP OES devem ser considerados, principalmente, para CTC11 [ $(7,74 \pm 0,01) \text{ g kg}^{-1} \text{ Si}$ ] e CTC18 [ $(9,70 \pm 0,02) \text{ g kg}^{-1} \text{ Si}$ ].



**Figura 5.23** - Correlação dos resultados de concentrações das amostras obtidos por ICP OES após digestão alcalina e áreas integradas obtidas por LIBS usando a linha Si I 212,412 nm e 25 pulsos de  $50 \text{ J cm}^{-2}$ . As linhas pontilhadas representam as bandas de confiança a 95%. As barras verticais correspondem a  $\pm 1$  desvio-padrão dos resultados obtidos por LIBS ( $n = 30$  crateras). As barras horizontais representam o intervalo de confiança das concentrações determinadas por ICP OES ( $n=3$ ).



**Figura 5.24** - Correlação dos resultados de concentrações das amostras obtidos por ICP OES após digestão alcalina e áreas integradas obtidas por LIBS usando a linha Si I 221,667 nm e 25 pulsos de  $50 \text{ J cm}^{-2}$ . As linhas pontilhadas representam as bandas de confiança a 95%. As barras verticais correspondem a  $\pm 1$  desvio-padrão dos resultados obtidos por LIBS ( $n = 30$  crateras). As barras horizontais representam o intervalo de confiança das concentrações determinadas por ICP OES ( $n=3$ ).

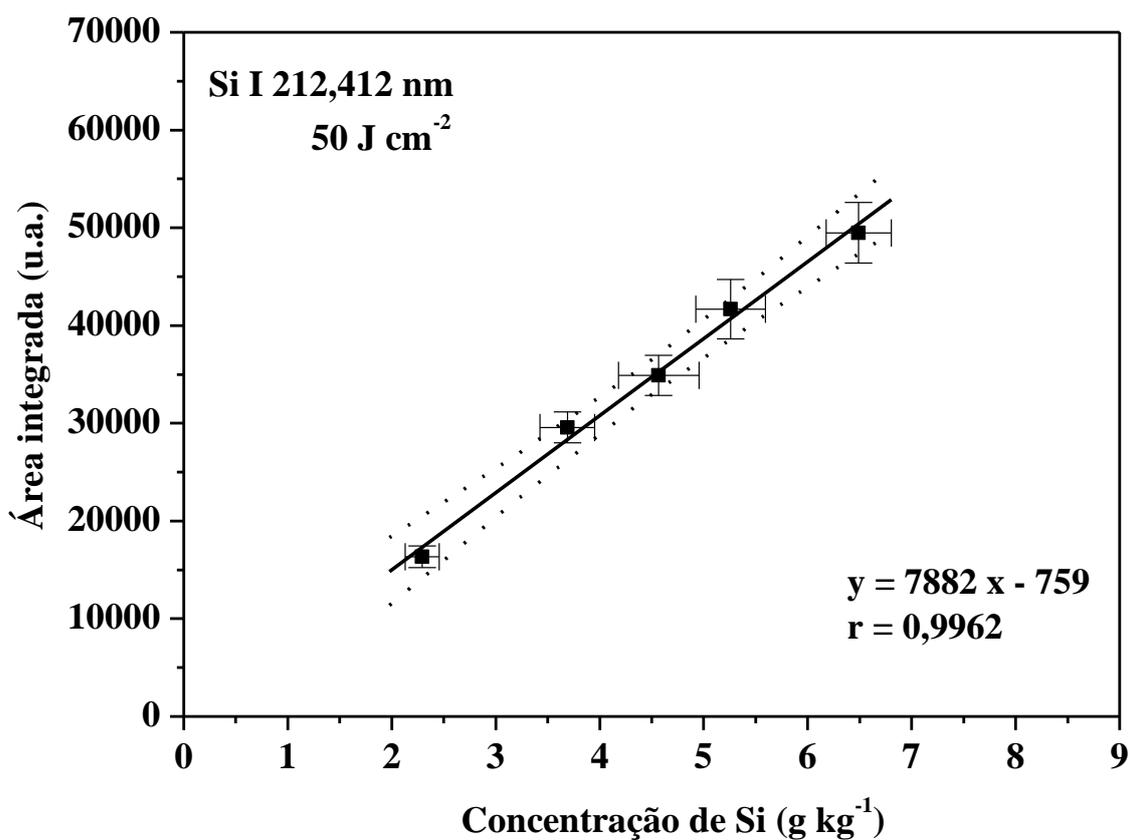
#### 5.2.4 Comparação de resultados de análises feitas por LIBS, ICP OES e $\mu$ ED-XRF

Após a avaliação do efeito da fluência sobre os resultados obtidos por LIBS iniciou-se a etapa de validação do método analítico. A Tabela 5.6 mostra as condições experimentais utilizadas para determinação de Si em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar. Para reduzir as variações das medidas optou-se por trabalhar com espectros médios. Em cada análise por LIBS são obtidos 3 espectros médios. Cada espectro médio corresponde à média de 10 espectros individuais de emissão com 25 pulsos acumulados. Foram avaliados em cada pastilha 30 pontos de amostragem, com um total de 750 pulsos de laser. Considerando-se a melhor correlação dos resultados e ao fato de que as linhas apresentaram intensidades relativas semelhantes, apenas a linha Si I 212,412 nm foi usada para as determinações.

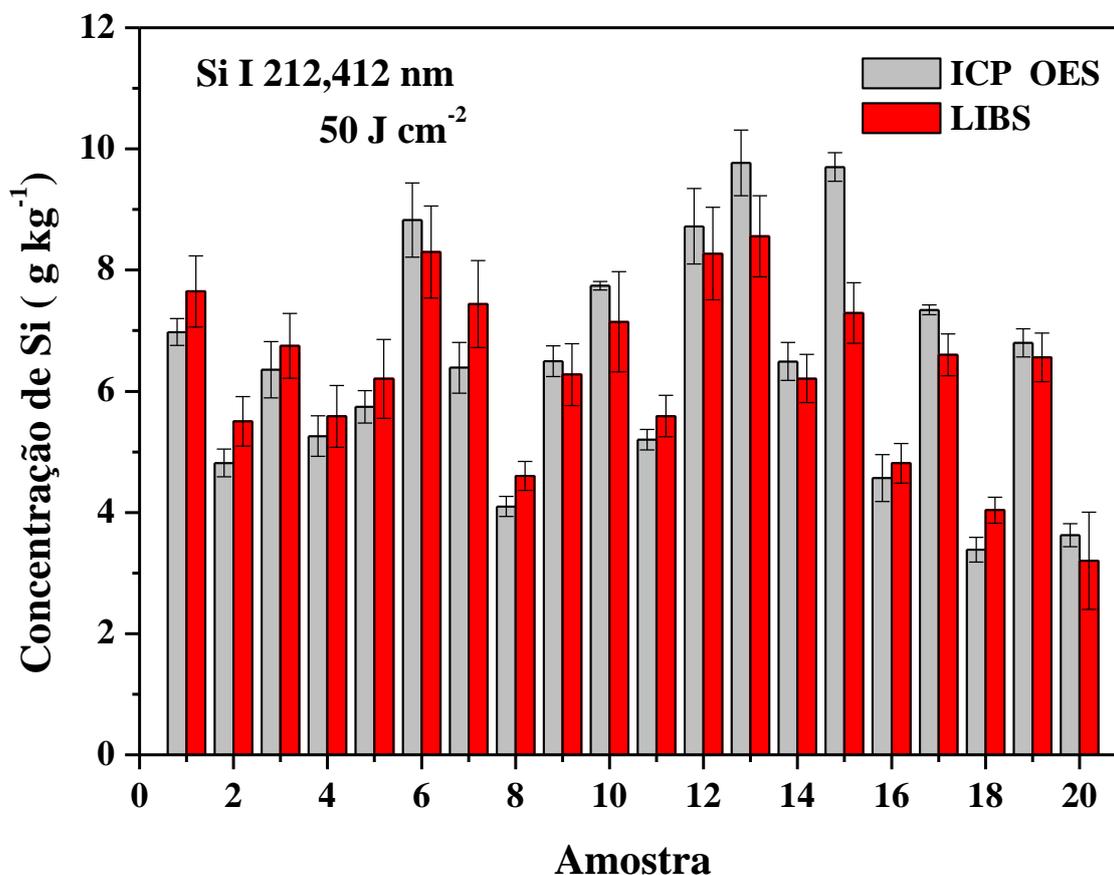
**Tabela 5.6** – Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de Si em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar utilizando LIBS.

<b>Parâmetros</b>	
Energia por pulso de laser:	230 mJ
Distancia lente-amostra (LTSD):	17,5 cm
Diâmetro de focalização:	750 $\mu\text{m}$
Fluência:	50 $\text{J cm}^{-2}$
Numero de pulsos acumulados por cratera ( $n_p$ ):	25
Tempo de integração do sinal ( $t_i$ ):	4,5 $\mu\text{s}$
Tempo de atraso ( $t_{\text{atraso}}$ ):	2,0 $\mu\text{s}$
Linha de emissão:	Si I 212,412 nm

A curva de calibração univariada foi elaborada utilizando 5 amostras com concentrações entre 2,30 e 6,50  $\text{g kg}^{-1}$  determinadas por ICP OES após digestão alcalina e correlacionando os valores de áreas integradas (u.a.) obtidas por LIBS utilizando a linha de emissão Si I 212,412 nm. A Figura 5.25 mostra a curva analítica de calibração obtida, onde é possível observar boa correlação linear entre os dados experimentais para este intervalo de concentrações. Para as validações dos resultados, foram utilizadas 20 amostras do conjunto de variedades de cana-de-açúcar utilizadas neste trabalho. As Figuras 5.26 e 5.27 mostram as comparações dos resultados obtidos por LIBS com aqueles obtidos por ICP OES e  $\mu\text{ED-XRF}$ .

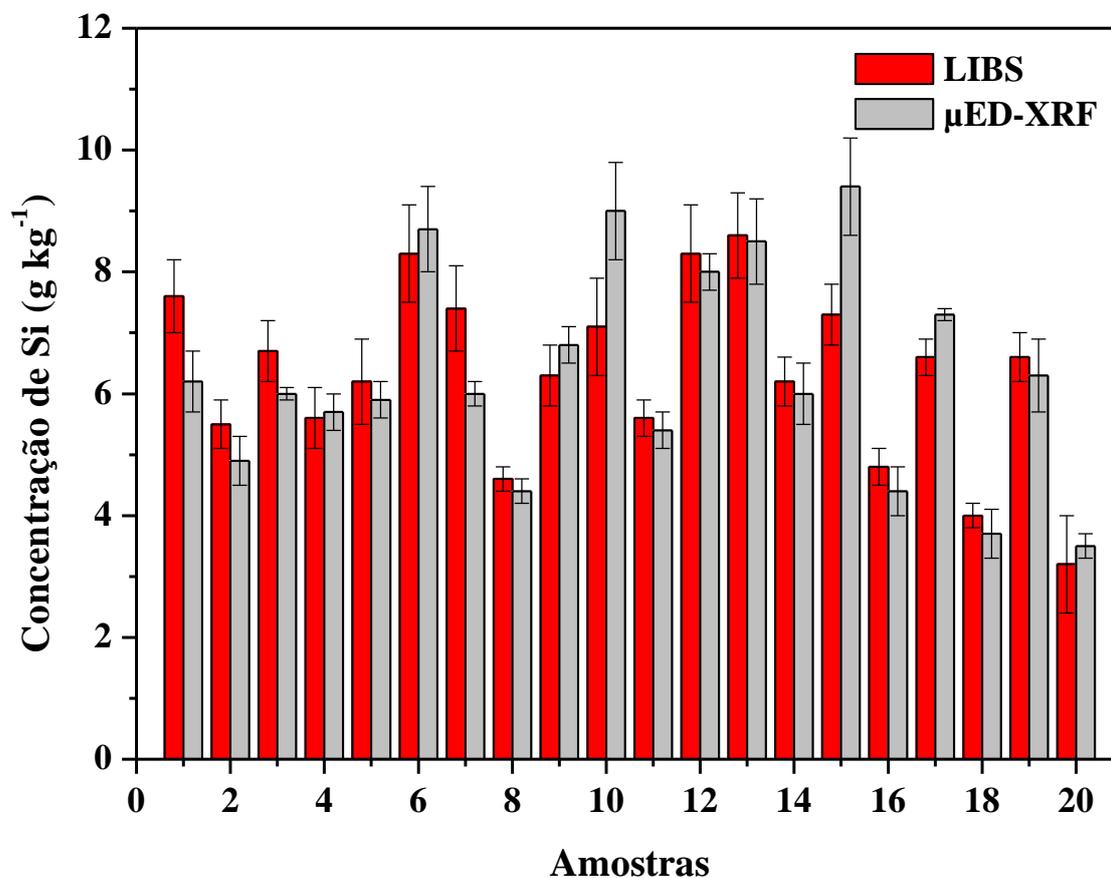


**Figura 5.25** - Curva analítica de calibração para determinação de Si usando a linha Si I 212,412 nm e 25 pulsos de 50 J cm<sup>-2</sup>. As linhas pontilhadas representam as bandas de confiança a 95%. As barras de incertezas verticais correspondem a  $\pm 1$  desvio-padrão dos resultados obtidos por LIBS (n = 30 crateras). As barras horizontais representam o intervalo de confiança das concentrações determinadas por ICP OES (n=3).



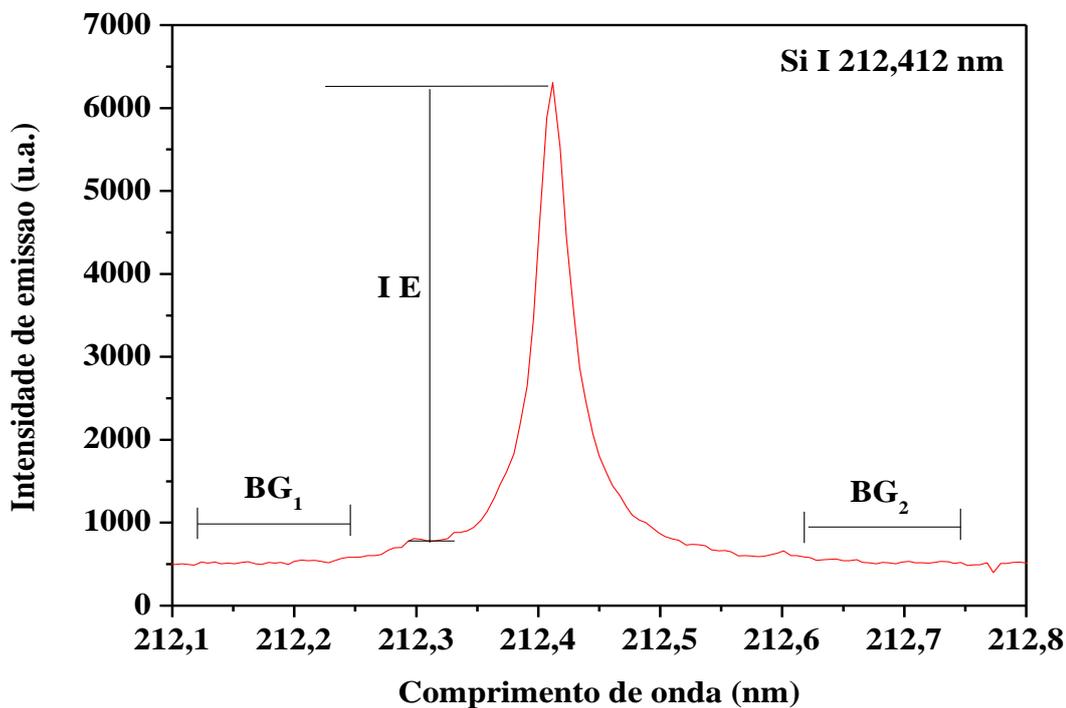
**Figura 5.26** - Comparação entre os resultados para as amostras de validação obtidos por ICP OES e LIBS usando 50 J cm<sup>-2</sup>. As barras de incertezas verticais correspondem a  $\pm 1$  desvio-padrão dos resultados obtidos por LIBS (n = 30 crateras) e por ICP OES (n=3).

Observou-se que melhores correlações entre os resultados foram obtidas para concentrações abaixo de 6,50 g kg<sup>-1</sup>. Os valores obtidos por LIBS e ICP OES, e LIBS e  $\mu$ ED-XRF foram comparados para todas as amostras aplicando-se o teste *t-Student* pareado ao nível de 95 % de confiança, o qual indicou que os resultados são geralmente concordantes. O valor calculado de *t* para a comparação LIBS e ICP OES foi 0,81, enquanto que para comparação LIBS e  $\mu$ ED-XRF o valor calculado foi 0,19. O valor crítico para distribuição *t-Student* é 2,09.



**Figura 5.27** – Comparação entre os resultados para as amostras de validação obtidos por  $\mu$ ED-XRF e LIBS usando  $50 \text{ J cm}^{-2}$ . As barras de incertezas verticais correspondem a  $\pm 1$  desvio-padrão dos resultados obtidos por LIBS ( $n = 30$  crateras) e por  $\mu$ ED-XRF ( $n=3$ ).

Para estimar o limite de detecção (LOD) na determinação de Si em folhas de cana-de-açúcar por LIBS os sinais médios de intensidade máxima de emissão (IE) foram subtraídos dos sinais de emissão médios obtidos em regiões espectrais independentes localizadas nas adjacências das linhas de emissão do analito ( $BG_1$  e  $BG_2$ ) conforme ilustrado na Figura 5.28. Neste caso foi utilizada a amostra RB85-5113 que contém a menor concentração Si em cana-de-açúcar ( $2,29 \pm 0,02 \text{ g kg}^{-1}$ ).



**Figura 5.28** - Fragmento do espectro mostrando a linha espectral Si I 212,412 nm e regiões nas vizinhanças desta linha ( $BG_1$  e  $BG_2$ ) para correção de fundo e cálculo do LOD. Amostra RB85-5113 ( $2,29 \pm 0,02 \text{ g kg}^{-1}$ ). 25 pulsos de  $50 \text{ J cm}^{-2}$ .

Os dados para obtenção do LOD foram obtidos em função da medida de área integrada dos sinais da linha de emissão baseados na média de 30 espectros obtidos pela ablação em 30 pontos diferentes na superfície da pastilha de folha de cana-de-açúcar incidindo-se 25 pulsos de laser. A Equação 1 foi utilizada para estimar o LOD.<sup>102</sup>

$$LOD = \frac{S_{BG} * k}{\alpha} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

$S_{BG}$  = desvio-padrão da média das intensidades de emissão da radiação de fundo nas vizinhanças da linha Si I 212,412 nm,  $k = 3,3$  e  $\alpha$  = coeficiente angular da curva de calibração.

O LOD estimado utilizando fluência de  $50 \text{ J cm}^{-2}$  e a linha Si I 212,412 nm foi de  $0,164 \text{ g kg}^{-1}$ , o que se mostrou adequado para determinação de Si em folhas de cana-de-

açúcar. Quando necessário, para outros tipos de amostras que apresentem menor concentração de Si, certamente melhores limites de detecção podem ser obtidos utilizando-se uma linha de maior intensidade de emissão como a Si I 288,158 nm.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta tese indicam que a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser pode ser recomendada para a determinação de Si em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar, preparadas a partir de material cominuído com distribuição de tamanho de partículas  $<100 \mu\text{m}$ . O procedimento proposto possui as vantagens dos métodos de análise direta de sólidos, diminuindo-se as etapas de preparo das amostras (menores riscos de erros sistemáticos), evitando-se a geração de resíduos químicos (digeridos) e o consumo de reagentes considerados perigosos como, por exemplo, ácido fluorídrico. O método proposto é mais rápido que os métodos tradicionalmente empregados, e deverá se constituir em alternativa relativamente simples do ponto de vista operacional para determinação de Si em plantas.

Experimentalmente, demonstrou-se que a utilização de fluências mais altas ( $50 \text{ J cm}^{-2}$ ) e de diâmetro de focalização do laser na superfície das pastilhas da ordem de  $750 \mu\text{m}$ , contribuíram significativamente para melhoria dos resultados analíticos (precisão e exatidão das medidas), permitindo a determinação quantitativa de Si por LIBS. O LOD estimado utilizando fluência de  $50 \text{ J cm}^{-2}$  e a linha Si I 212,412 nm foi de  $0,164 \text{ g kg}^{-1}$ , o que se mostrou adequado para determinação de Si em folhas de cana-de-açúcar, cujos teores situam-se geralmente entre 2 e  $10 \text{ g kg}^{-1}$ .

Cabe também destacar os resultados obtidos das determinações de Si por  $\mu\text{ED-XRF}$ , utilizando-se as mesmas pastilhas das amostras das variedades de cana-de-açúcar utilizadas na presente tese, com excelente correlação com os resultados obtidos por LIBS, o que é mais uma forte indicação da qualidade do método proposto.

Os resultados obtidos geraram subsídios para que o método também seja usado em análises de rotina de tecidos vegetais, determinando-se Si simultaneamente com macro (P, K, Ca, Mg) e micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Zn, B), tornando LIBS ainda mais competitivo.

**REFERENCIAS**

1. Um pacote para o etanol. Disponível em <<http://www.unica.com.br>> Acesso 25 de mar. 2012
2. KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H. S.; CAMARGO, M. S. Papel do silício na produção de cana-de-açúcar. *STAB*, Piracicaba, v. 21, p.6-9, 2002.
3. KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras**: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz, 2008.
4. NOMURA, C. S.; SILVA, C. S.; OLIVEIRA, P. V. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão. *Química Nova*, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 104-113, 2008.
5. CREMERS, D. A.; CHINNI, R. C. Laser-induced breakdown spectroscopy-capabilities and limitations. *Applied Spectroscopy Reviews*, London, v. 44, p. 457-506, 2009.
6. PASQUINI, C.; CORTEZ, J.; SILVA, L. M. C.; GONZAGA, F. B. Laser induced breakdown spectroscopy. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Campinas, v. 18, p. 463-512, 2007.
7. SANTOS, D.; NUNES, L. C.; CARVALHO, G. G. A.; GOMES, M. D.; SOUZA, P. F.; LEME, F. D.; SANTOS, L. G. C.; KRUG, F. J. Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: a review. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, Amsterdam, v. 71-72, p. 3-13, 2012.
8. Biorrefinarias do futuro. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br>> Acesso em: 24 mar. 2012.
9. Produção Brasileira. Disponível em: <<http://www.udop.com.br>> Acesso em: 03 abr. 2012.
10. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira**: cana-de-açúcar. Brasília: CONAB, 2011.
11. Cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 25 mar. 2012.
12. Área cultivada com cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://mdic.goc.br>>. Acesso: 24 Jun 2012.

13. UNIVERSIDADE DE CAMPINAS. Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético (NIPE/UNICAMP). 2010. Disponível em: <<http://nipeunicamp.org.br>>. Acesso em: 25 mar. 2010
14. CARVALHO, G. G. A. D. **Efeito da fluência na análise de pastilhas de materiais vegetais por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser**. 2011. 116 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
15. Diagnose foliar. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>> Acesso em: 10 Abr. 2012.
16. MALAVOLTA, E. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997.
17. BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Agrário. **Inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura**. Brasília: MDA, 2004.
18. LEWIN, J.; REIMANN, B. E. F. Silicon and Plant Growth. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 20, p. 289, 1969.
19. MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2006.
20. LINDSAY, W. L. **Chemical Equilibria in Soils**. New York: John Wiley 1970.
21. MITANI, N.; CHIBA, Y.; YAMAJI, N.; MA, J. F. Identification and Characterization of Maize and Barley Lsi2-Like Silicon Efflux Transporters Reveals a Distinct Silicon Uptake System from That in Rice. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 2133-2142, 2009.
22. KORNDÖRFER, G. H.; DATNOFF, L. E. Adubação com silício: uma alternativa no controle de doenças da cana-de-açúcar e do arroz. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 70, 1995.
23. NAIDOO, P. V.; MCFARLANE, S. A.; KEEPING, M. G.; CALDWELL, P. M. Deposition of silicon in leaves of sugar cane (*Saccharum* spp. Híbridos) and its effect on the severity of brown rust caused by *Puccinia melanocephala*. **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, Brisbane, v. 82, 2009.
24. YOSHIDA, S.; NAVASERO, S. A.; RAMIREZ, E. A. Effects of silica and nitrogen supply on some leaf characters of rice plant. **Plant and Soil**, The Hague, v. 31, p. 48, 1969.
25. DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. **Silicon in agriculture**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001.
26. KVEDARAS, O. L.; BYRNE, M. J.; COOMBES, N. E.; KEEPING, M. G. Influence of plant silicon and sugarcane cultivar on mandibular wear in the stalk borer *Eldana saccharina*. **Agricultural and Forest Entomology**, Oxford, v. 11, p. 301-306, 2009.

27. MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. New York: Academic Press, 1986.
28. MATICHENKOV, V. V.; CALVERT, D. V. Silicon as a beneficial element for sugarcane. **Journal American Society of Sugarcane Technologists**, v. 22, p. 2002.
29. NUNES, L. C.; BRAGA, J. W. B.; TREVIZAN, L. C.; DE SOUZA, P. F.; DE CARVALHO, G. G. A.; SANTOS, D.; POPPI, R. J.; KRUG, F. J. Optimization and validation of a LIBS method for the determination of macro and micronutrients in sugar cane leaves. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, p. 1453-1460, 2010.
30. SAVANT, N. K.; KORNDORFER, G. H.; DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H. Silicon nutrition and sugarcane production: A review. **Journal of Plant Nutrition**, v. 22, p. 1853-1903, 1999.
31. DATNOFF, L. E.; DEREN, C. W.; SNYDER, G. H. Silicon fertilization for disease management of rice in Florida. **Crop Protection**, Guildford, v. 16, p. 525-531, 1997.
32. MA, J. F. M. Y.; TAKAHASHI, E. **Silicon as a beneficial element for crop plant**. New York: Elsevier Science, 2001.
33. KORNDÖRFER, G. H. ; GASCHO, G. J. Avaliação de fontes de silício para o arroz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 1., 1999, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1999. p. 313-316.
34. KORNDÖRFER, G. H. ; PEREIRA, U. S.; CAMARGO, M. S. **Silicatos de cálcio e magnésio na agricultura**. Uberlândia: GPSi-ICIAG-UFU, 2002. 23 p.
35. SOUSA, R. T., X. ; KORNDÖRFER., H. S.; WANGEN, D. R. B. Recovery of silicon from metallurgy slag by sugarcane cultivars. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 669-676, 2010.
36. KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA. H. S.; NOLLA. A. **Análise de silício: solo, planta e fertilizante**. Uberlândia: GPSi-ICIAG-UFU, 2004. 34 p. (Boletim técnico, 2).
37. PEREIRA, H. S.; KORNDÖRFER, G., H.; MOURA, W. F.; CORREA, G. F. Extractors of available silicon in slags and fertilizers. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 265-274, 2003.
38. ANDERSON, D. L. Soil and Leaf Nutrient Interactions Following Application of Calcium Silicate Slag to Sugarcane. **Fertilizer Research**, Dordrecht : Kluwer, v. 30, p. 9-18, 1991.
39. MEYER, J. H.; KEEPING, M. G. Review of research into the role of silicon for sugarcane production. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Brisbane, v. 74, p. 29-40, 2000.
40. FURLANI, P. R.; GALLO, J. R. Determinação de silício em material vegetal. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 25., 1973, Rio de Janeiro. **Anais**. São Paulo: SBPC, 1973.

41. ELLIOTT, C. L.; SNYDER, G. H. Autoclave-induced digestion for the colorimetric determination of silicon in rice straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, p. 1118-1119, 1991.
42. FOX, R. L.; SILVA, J. A.; PLUCKNET.DL; TERANISH.DY. Soluble and Total Silicon in Sugar Cane. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 30, p. 81-&, 1969.
43. SUCHAROVA, J.; SUCHARA, I. Determination of 36 elements in plant reference materials with different Si contents by inductively coupled plasma mass spectrometry: Comparison of microwave digestions assisted by three types of digestion mixtures. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 576, p. 163-176, 2006.
44. KRASKA, J. E.; BREITENBECK, G. A. Simple, robust method for quantifying silicon in plant tissue. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 41, p. 2075-2085, 2010
45. TABER, H. G.; SHOGREN, D.; LU, G. Extraction of silicon from plant tissue with dilute HCl and HF and measurement by modified inductive coupled argon plasma procedures. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 33, p. 1661-1670, 2002.
46. HAUPTKORN, S.; PAVEL, J.; SELTNER, H. Determination of silicon in biological samples by ICP-OES after non-oxidative decomposition under alkaline conditions. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, Heidelberg, v. 370, p. 246-250, 2001.
47. HAYSOM, M. B.; OSTATEK-BOCZYNSKI, Z. A. Rapid, wet oxidation procedure for the estimation of silicon in plant tissue. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 37, p. 2299-2306, 2006.
48. FENG, X. B.; WU, S. L.; WHARMBY, A.; WITTMEIER, A. Microwave digestion of plant and grain standard reference materials in nitric and hydrofluoric acids for multi-elemental determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 14, p. 939-946, 1999.
49. GUNTZER, F. Determination of the silicon concentration in plant material using Tiron extraction. **New Phytologist**, London, v. 188, p. 902-906, 2010.
50. MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; HIDALGO, M. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 28, n. 3, 2009.
51. REIDINGER, S.; RAMSEY, M. H.; HARTLEY, S. E. Rapid and accurate analyses of silicon and phosphorus in plants using a portable X-ray fluorescence spectrometer. **New Phytologist**, London, v.195 p.699-706 2012.
52. KUCERA, J.; RANDA, Z. Possibilities of low-level determination of silicon in biological materials by activation analysis. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, Heidelberg, v. 370, p. 241-245, 2001.

53. SCHMID, W.; KRIVAN, V. Radiochemical neutron-activation method for the determination of silicon at microgram and nanogram levels in high-purity materials. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 58, p. 1468-1471, 1986.
54. RODRIGUES, L. C.; SANTANA, M. A. E. Metodologia para determinação do teor de sílica em materiais lignocelulósicos via espectrometria no ultravioleta-visível. **Floresta e Ambiente**, v. 12, n. 1, p. 57-62, 2005.
55. WEI-MIN, D.; HANG, B.-W.; CHENG-XIAO, S.; KANG-LE, R. Rapid determination of silicon content in rice. **Rice Science**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 145-147, 2005.
56. MASSON, P.; DAUTHIEU, M.; TROLARD, F.; DENAIX, L. Application of direct solid analysis of plant samples by electrothermal vaporization-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: determination of Cd and Si for environmental purposes. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 62, p. 224-230, 2007.
57. CARNEIRO, J. M. T.; ROSSETE, A. L. R. M.; OLIVEIRA, G. S.; BENDASSOLLI, J. A. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 38, p. 1411-1423, 2007.
58. FRANTZ, J. M.; LOCKE, J. C. D., L.; OMER, M. W. A.; STURTZ, D.; HORST, L.; KRAUSE, C. R. Detection, distribution, and quantification of silicon in floricultural crops utilizing three distinct analytical methods. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 39, n.17/18, p. 2734-2751, 2008.
59. 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. **Bioscience Journal**, Uberlândia v. 26, p. 100-108, 2010.
60. HOGENDORP, B.; SWIADER, J. M.; CLOYD, R. A. Plant alkaline fusion technique followed by colorimetric procedure for the detection and quantification of total silicon in ornamental plants **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 42, p. 75-92, 2011.
61. RODRIGUEZ ZULUAGA, J.; RODRÍGUEZ, N. An improved semiquantitative method for elemental analysis of plants using inductive coupled plasma mass spectrometry. **Biological Trace Element Research**, London, v. 144, p. 1302-1317, 2011.
62. BRECH, F.; CROSS, L. Optical microemission stimulated by a Ruby laser. **Applied Spectroscopy**, Bound Brook, v. 16, p. 59, 1962.
63. RUNGE, E. F.; MINCK, R. W.; BRYAN, F. R., in **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 20, n. 4, p. 733, 1964.
64. MOMEN, A. A.; ZACHARIADIS, G. A.; ANTHEMIDIS, A. N.; STRATIS, J. A. Investigation of four digestion procedures for multi-element determination of toxic and nutrient elements in legumes by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 565, p. 81-88, 2006.

65. REITZ, J. R.; MILFORD, F.; CHRISTY, R. W.; SANDERS, R. B. **Fundamentos da teoria eletromagnética**. Rio de Janeiro: Campus, 1982.
66. SJÖHOLM, M.; WEIBRING, P.; EDNER, H.; SVANBERG, S. Atomic mercury flux monitoring using an optical parametric oscillator based lidar system. **Optics Express**, Washington, v. 12, p. 551-556, 2004.
67. RADZIEMSKI, L. J. Laser-induced plasma expansion: theoretical and experimental aspects. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 57, p. 1109-1113, 2002.
68. CREMERS, D. A.; RADZIEMSKI, L. J. **Handbook of laser-induced breakdown spectroscopy**. Chichester: Wiley, 2006.
69. RUSSO, R. E.; MAO, X. L.; LIU, H. C.; GONZALEZ, J.; MAO, S. S. Laser ablation in analytical chemistry: a review. **Talanta**, Amsterdam, v. 57, p. 425-451, 2002.
70. CARVALHO, G. G. A.; SANTOS, D.; NUNES, L. C.; GOMES, M. D.; LEME, F. D.; KRUG, F. J. Effects of laser focusing and fluence on the analysis of pellets of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 74-75, p. 162-168, 2012.
71. SIRVEN, J. B.; MAUCHIEN, P.; SALLE, B. Analytical optimization of some parameters of a Laser-Induced Breakdown Spectroscopy experiment. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 63, p. 1077-1084, 2008.
72. TOGNONI, E.; PALLESCHI, V.; CORSI, M.; CRISTOFORETTI, G. Quantitative micro-analysis by laser-induced breakdown spectroscopy: a review of the experimental approaches. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 57, p. 1115-1130, 2002.
73. VADILLO, J. M.; ROMERO, J. M. F.; RODRIGUEZ, C.; LASERNA, J. J. Effect of plasma shielding on laser ablation rate of pure metals at reduced pressure. **Surface and Interface Analysis**, London, v. 27, p. 1009-1015, 1999.
74. SANTOS JUNIOR, D.; KRUG, F. J.; TARELHO, L. V. G.; VIEIRA JUNIOR, N. D.; MILORI, D. M. B. P.; MARTIN NETO, L. Quality and metrology concepts in analytical Chemistry. **Analytica**, São Paulo, v. 24, p. 72-81, 2006.
75. LEE, W.; WU, J.; LEE, Y.; SNEDDON, J. Recent applications of laser-induced breakdown spectrometry: a review of material approaches. **Applied Spectroscopy Reviews**, New York, v. 39, n. 1, p. 27-97, 2004.
76. WINEFORDNER, J. D.; GORNUSHKIN, I. B.; CORRELL, T. G., E.; SMITH, B. W.; OMENETTO, N. Comparing several atomic spectrometric methods to the super stars: special emphasis on laser induced breakdown spectrometry, LIBS, a future super star. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 19, p. 1061-1083, 2004.
77. Q-SUN, M. T., SMITH, B.W.; WINEFORDNER, J.D. Direct determination of p, al, Ca, Cu, Mn, Zn, Mg and Fe in plant materials by laser-induced plasma spectroscopy.

**Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy**, Ottawa, v. 44, p. 164-170. 1999.

78. TREVIZAN, L. C.; SANTOS JUNIOR, D.; SAMAD, R. E. V. J., N.D.; ; NOMURA, C. S., L.C.; NUNES,; RUFINI, I.A.; ; KRUG, F. J. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of macronutrients in plant materials. **Spectrochim. Acta Part B 63**, v. p. 1151-1158., 2008.

79. TREVIZAN, L. C.; SANTOS, D.; SAMAD, R. E.; VIEIRA, N. D.; NUNES, L. C.; RUFINI, I. A.; KRUG, F. J. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of micronutrients in plant materials. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 64, p. 369-377, 2009.

80. POUZAR, M.; CERNOHORSKY, T.; PRUSOVA, M.; PROKOPCAKOVA, P.; KREJCOVA, A. LIBS analysis of crop plants. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 24, p. 953-957, 2009.

81. BRAGA, J. W. B.; TREVIZAN, L. C.; NUNES, L. C.; RUFINI, I. A.; SANTOS, D.; KRUG, F. J. Comparison of univariate and multivariate calibration for the determination of micronutrients in pellets of plant materials by laser induced breakdown spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 65, p. 66-74, 2010.

82. NUNES, L. C.; SILVA, G. A. T., L.C.; ; SANTOS JUNIOR, D. P., R.J.;; KRUG, F. J. Simultaneous optimization by neuro-genetic approach for analysis of plant materials by laser induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 64, p. 565-572, 2009.

83. GOMES, M. D.; SANTOS, D.; NUNES, L. C.; CARVALHO, G. G. A.; LEME, F. D.; KRUG, F. J. Evaluation of grinding methods for pellets preparation aiming at the analysis of plant materials by laser induced breakdown spectrometry. **Talanta**, Amsterdam, v. 85, p. 1744-1750, 2011.

84. KAISER, J.; GALIOVA, M.; NOVOTNY, K.; CERVENKA, R.; REALE, L.; NOVOTNY, J.; LISKA, M.; SAMEK, O.; KANICKY, V.; HRDLICKA, A.; STEJSKAL, K.; ADAM, V.; KIZEK, R. Mapping of lead, magnesium and copper accumulation in plant tissues by laser-induced breakdown spectroscopy and laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 64, p. 67-73, 2009.

85. CHAUHAN, D. K.; TRIPATHI, D. K.; RAI, N. K.; RAI, A. K. Detection of biogenic silica in leaf blade, leaf sheath, and stem of bermuda grass (*Cynodon dactylon*) using libs and phytolith analysis. **Food Biophysics**, New York, v. 6, p. 416-423, 2011.

86. Micro X-ray Fluorescence ( $\mu$ XRF). Disponível em: <<http://www.xos.com>>. Acesso em: 10 Set. 2012.

87. NASCIMENTO FILHO, V. F. **Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios-X por dispersão de energia (ED-XRF) e por reflexão total**. Piracicaba: CENA/USP, 1999.

88. NUNES, L. C. **Estratégias quimiométricas para análises de plantas por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser**. 2011. 69 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
89. SILVA, F. V.; TREVIZAN, L. C.; SILVA, C. S.; NOGUEIRA, A. R. A.; NOBREGA, J. A. Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axially and radially viewed configurations. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 57, p. 1905-1913, 2002.
90. TREVIZAN, L. C.; VIEIRA, E. C.; NOGUEIRA, A. R. A.; NOBREGA, J. A. Use of factorial design for evaluation of plasma conditions and comparison of two liquid sample introduction systems for an axially viewed inductively coupled plasma optical emission spectrometer. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 60, p. 575-581, 2005.
91. NIST Atomic Spectra Database. Disponível em: <<http://www.nist.gov>> . Acesso em: 25 Ago. 2012.
92. PeakFit - The Automatic Choice For Spectroscopy, Chromatography and Electrophoresis. Disponível em: <<http://www.sigmaplot.com>>. Acesso em: 15 Out. 2012.
93. MIZIOLEK, A. W.; PALLESCHI, V.; SCHECHTER, I. **Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) - Fundamentals and applications**. New York: Cambridge University Press, 2006.
94. CAPITELLI, M.; CASAVOLA, A.; COLONIA, G.; GIACOMO, A. Laser-induced plasma expansion: theoretical and experimental aspects. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 59, p. 271-289, 2004.
95. STELMASZCZYK, K.; ROHWETTER, P.; MÉJEAN, G. Y. J.; SALMON, E.; KASPARIAN, J. A., R.; WOLF, J. P.; WÖSTE, L. Long-distance remote laser-induced breakdown spectroscopy using filamentation in air. **Applied Physics Letters**, Woodbury, v. 85, p. 3977-3979, 2004.
96. TOGNONI, E.; PALLESCHI, V.; CORSI, M.; CRISTOFORETTI, G. Quantitative micro-analysis by laser-induced breakdown spectroscopy: a review of the experimental approaches. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 57, p. 1115-1130, 2002.
97. ZEISLER, R. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**. Reference materials for small-sample analysis Heidelberg, v. 360, n. 3/4, p. 376-379, 1998.
98. MEISSNER, K.; LIPPERT, T.; WOKAUN, A.; GUENTHER, D. Analysis of trace metals in comparison of laser-induced breakdown spectroscopy with LA-ICP-MS. **Thin Solid Films**, Amsterdam, v. 453, p. 316-322, 2004.
99. D'ANGELO, C. A.; PACE, D. M. D.; BERTUCCELLI, G. Semiempirical model for analysis of inhomogeneous optically thick laser-induced plasmas. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 64, p. 999-1008, 2009.

100. AGUILERA, J. A.; ARAGÓN, C.; PEÑALBA, F. Plasma shielding effect in laser ablation of metallic samples and its influence on LIBS analysis. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. v. 127-129, p. 309-314, 1998.
101. SANTOS JR, D.; NUNES, L. C.; TREVIZAN, L. C.; GODOI, Q.; LEME, F. O.; BRAGA, J. W. B.; KRUG, F. J. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for cadmium determination in soils. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 64, p. 1073-1078, 2009.
102. CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. **Pure and Applied Chemistry**, London, v. 67, p. 1699-1723, 1995.