

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

MARIA ISABEL VEGA MARTINEZ

**Desenvolvimento e produção de material de referência certificado de
folhas de cana-de-açúcar para avaliação da qualidade nutricional**

Piracicaba

2016

MARIA ISABEL VEGA MARTINEZ

**Desenvolvimento e produção de material de referência certificado de
folhas de cana-de-açúcar para avaliação da qualidade nutricional**

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 Doutora em Ciências**

**Área de Concentração: Química na Agricultura e
no Ambiente**

**Orientadora: Profa. Dra. Elisabete A. De Nadai
Fernandes**

Piracicaba

2016

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

Martinez, Maria Isabel Vega

Desenvolvimento e produção de material de referência certificado de folhas de cana-de-açúcar para avaliação da qualidade nutricional / Maria Isabel Vega Martinez; orientadora Elisabete A. De Nadai Fernandes. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

180 f. : 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. Avaliação nutricional 2. Certificação 3. Metrologia I. Título

CDU 641.1 : 633.61 (088.77)

DEDICATÓRIA

*A meus pais, Juan e Zenobia, por todo o amor e compreensão eternamente dedicados
A minhas irmãs, Ana, Yolanda e Angelica, por estarem sempre presentes em minha vida
A meus irmãos, Wilber, Juan e Francisco, pelas palavras de ânimo e confiança em mim*

Sem vocês eu não teria voado tão alto e tão distante de casa

Dedico

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus mais nobres e sinceros agradecimentos a todos aqueles que me ajudaram, incentivaram e torceram por mim ao longo destes anos.

- A Deus, por estar sempre ao meu lado e permitir mais essa conquista em minha vida
- À Universidade de São Paulo – USP
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA
- Ao Laboratório de Radioisótopos – LRI, pelo suporte técnico-científico
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo suporte financeiro
- Especialmente à Profa. Dra. Elisabete A. De Nadai Fernandes, pela orientação, oportunidades oferecidas, confiança, incentivo e amizade
- Ao Dr. Márcio Arruda Bacchi, pela dedicação ao longo de todo o trabalho, valiosos ensinamentos e amizade
- Ao Prof. Dr. Rolf Zeisler, pela oportunidade inesquecível do doutorado sanduíche no National Institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg, MD, USA, ensinamentos, amizade, carinho e sábios conselhos
- Ao Prof. Dr. Gabriel Adrián Sarriés e Andrés Enrique Lai Reyes, pela contribuição fundamental na análise estatística e amizade
- Ao Prof. Dr. Francisco José Krug, por permitir realizar meus experimentos no Laboratório de Química, ensinamentos, conselhos e amizade
- Às minhas amigas Camila Elias, Lilian Seiko Kato, Silvana Regina Vicino Sarriés e Gabriela de Matuoka e Chiocchetti, pelos conhecimentos compartilhados, apoio incondicional, companheirismo e amizade
- Aos amigos do Laboratório de Radioisótopos Adriana de Angelis Fogaça, Cláudio Luiz Gonzaga, Felipe Almeida Biguzzi, Luis Gustavo Cofani dos Santos, Mateus Boscaro, Pedro Thiago Zambom Américo e Simone Silveira Nery da Silva Cofani dos Santos, pela convivência de vários anos e amizade
- Aos amigos do National Institute of Standards and Technology Charles Oliveira, Danyal Turkoglu, Gregory Downing, Juscelino Leão, Martin Shetty, Pamela Chu, Rabia Olfaz, Rick Paul e Wan Si Tang, pela amizade, ajuda nos experimentos e momentos inesquecíveis vividos nos Estados Unidos

- À técnica Maria Regina Santos Rodeiro Peçanha, do Laboratório de Nutrição Animal, CENA/USP, pela ajuda na parte experimental
- Ao técnico Dr. Eduardo de Almeida, do Laboratório de Instrumentação Nuclear, CENA/USP, pelo apoio na parte experimental e amizade
- Aos amigos do Laboratório de Fitotecnia Ana Paula Neto, Rafaela Roma e Tiago Tezotto, pelo apoio na parte experimental e amizade
- A todos os funcionários da Secretaria de Pós-Graduação do CENA, pela disposição e constante ajuda
- À bibliotecária Sra Marília R. Garcia Henyei, pela compreensão e auxílio na revisão
- Às minhas queridas amigas Jéssica Caroline Gonzaga, Gabriela da Silva, Lidiane Nunes, Ligia Bueno e Maribel Hilasaca, Natália Protti e Nathalia Luccas, pelo apoio incondicional, amizade, companheirismo e por estarem presente em minha vida

*Descobri como é bom chegar quando se tem paciência.
E para se chegar, onde quer que seja,
aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.
É preciso, antes de mais nada, querer.*

Amyr Klink

RESUMO

MARTINEZ, M. I. V. **Desenvolvimento e produção de material de referência certificado de folhas de cana-de-açúcar para avaliação da qualidade nutricional**. 2016. 180 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

A cana-de-açúcar e produtos derivados são de grande relevância econômica para o Brasil e vários outros países. Inúmeras variedades de cana-de-açúcar são cultivadas e novas variedades têm sido desenvolvidas para buscar ganhos de produtividade. Nesse sentido, são indispensáveis materiais de referência certificados (CRMs) para o controle da qualidade de sistemas de medição e validação de métodos, objetivando o estudo do estado nutricional das diferentes variedades de cana-de-açúcar, de modo a otimizar os procedimentos de fertilização e incrementar a produção. Contudo, segundo a base de dados internacional de materiais de referência certificados (COMAR) não existe um CRM que atenda adequadamente a avaliação do estado nutricional da cana-de-açúcar. Assim, este trabalho investigou a possibilidade de produção de um material de referência de folhas de cana-de-açúcar que supra essa demanda. O trabalho foi dividido em duas etapas principais: 1) estudo de variedades de cana-de-açúcar quanto à composição elementar e 2) desenvolvimento do material de referência. Doze variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Estado de São Paulo foram abrangidas no estudo: CTC2, CTC4, CTC11, CTC14, CTC15, CTC17, CTC20, IACSP955000, RB855156, RB965902, RB966928 e SP832847. As técnicas analíticas utilizadas para a avaliação foram a análise por ativação neutrônica instrumental (INAA) e a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES), além do método de Kjeldahl para determinação de N. Em geral, os resultados mostraram macronutrientes em níveis adequados, enquanto, dentre os micronutrientes, Cu e Zn foram encontrados no limite crítico para quase todas as variedades estudadas. A seleção da variedade RB966928 para produção do material de referência candidato foi baseada nas características nutricionais para alta produtividade, nos menores valores de coeficientes de variação de amostragem em campo ($CV < 30\%$) e nas características agrônomicas. A produção do material candidato foi realizada a partir de 90 kg de folhas, utilizando apenas 15 cm da parte central sem a nervura principal. Após diversos testes para determinar o melhor procedimento de preparo, as folhas foram liofilizadas, moídas e homogeneizadas, obtendo-se 410 frascos do material candidato contendo 20 g cada. A caracterização física mostrou umidade residual do material de 3,8 % e tamanho de partículas $< 115 \mu\text{m}$. Testes de homogeneidade dentro do frasco e entre frascos foram realizados utilizando INAA e método de Kjeldahl. Os resultados de fração de massa demonstraram a homogeneidade do material dentro de frascos para dezoito elementos, usando massas de 180 mg a 200 mg. Já a homogeneidade entre frascos foi comprovada para vinte elementos. Estudos de estabilidade a curto e a longo prazo demonstraram que o material manteve-se estável nas três condições avaliadas (40°C com umidade relativa a 100%, 20°C e -20°C). A caracterização química final do material foi realizada no *National Institute of Standards and Technology (NIST)*, Estados Unidos, onde foram atribuídos valores para dezoito elementos com respectivas incertezas expandidas associadas: Al, Br, Ca, Ce, Cl, Co, Cs, Fe, K, La, Mg, Mn, Na, Rb, Sc, Sm, Th e Zn. Além disso, foram atribuídos valores estimativos para Hf, N, P, Sb, Sr e V determinados pelo método de Kjeldahl e INAA.

Palavras-chave: Variedades. Nutrientes. Homogeneidade. Estabilidade. Incertezas.

ABSTRACT

MARTINEZ, M. I. V. **Development and production of certified reference material of sugarcane leaves for assessment of nutritional quality**. 2016. 180 f. Thesis (Doctorate) - Nuclear Energy Center for Agriculture, University of São Paulo, Piracicaba, 2016.

The sugarcane and derived products are of great economic importance for Brazil and several other countries. Many varieties of sugar cane are grown and new varieties have been developed to seek productivity gains. In this sense, certified reference materials (CRMs) are necessary for the quality control of measurement systems and validation of methods, aiming at the study of the nutritional status of the different sugarcane varieties for optimizing fertilization and increasing production. However, according to the international database of certified reference materials (COMAR) there is not a suitable CRM for the assessment of nutritional status of sugarcane. Thus, this work investigates the possibility of producing a reference material from leaves of sugarcane to fulfill such a demand. The work was divided into two main steps: 1) study of sugarcane varieties regarding elemental composition and 2) development of the reference material. Twelve varieties of sugarcane grown in the State of São Paulo were covered in the study: CTC2, CTC4, CTC11, CTC14, CTC15, CTC17, CTC20, IACSP955000, RB855156, RB965902, RB966928 and SP832847. The analytical techniques used for the assessment of composition were neutron activation analysis (NAA) and optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP OES), in addition to the Kjeldahl method for determination of N. In general, the results showed macronutrients in adequate levels, while, among the micronutrients, Cu and Zn were found in the critical limit for almost all the varieties studied. The selection of the variety RB966928 for producing the candidate reference material was based on the nutritional characteristics for high productivity, on the lower coefficients of variation of sampling in the field ($RSD < 30\%$) and on the agronomic characteristics. The candidate material was produced from 90 kg of leaves, using only 15 cm from the central part without the main rib. After various tests for determining the best preparation procedure, the leaves were lyophilized, milled and homogenized, obtaining 410 bottles of the candidate material containing 20 g each. The physical characterization found residual moisture of 3.8 % and particle size $< 115 \mu\text{m}$. Homogeneity tests within and between bottles were performed using NAA and Kjeldahl method. The results confirmed the within bottle homogeneity of the material for all eighteen elements, using masses from 180 mg to 200 mg, while the homogeneity between bottles was confirmed for twenty elements. Stability studies in the short and the long term demonstrated that the material was stable in the three conditions used (40°C with a relative humidity of 100%, 20°C and -20°C). The final characterization of the candidate material was performed at NIST, National Institute of Standards and Technology, United States, where values were assigned for eighteen elements with respective expanded uncertainties: Al, Br, Ca, Ce, Cl, Co, Cs, Fe, K, La, Mg, Mn, Na, Rb, Sc, Sm, Th, and Zn. In addition, estimated values were also assigned for Hf, N, P, Sb, Sr and V determined by the Kjeldahl method and INAA.

Keywords: Varieties. Nutrients. Homogeneity. Stability. Uncertainties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização das usinas de cana-de-açúcar e refinarias de etanol no Brasil	25
Figura 2. Países produtores e CRMs produzidos (COMAR, 2016)	31
Figura 3. Fluxograma das etapas gerais de coleta e preparação de RMs (STOEPLER et al., 2001) .	39
Figura 4. Grupos de variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Estado de São Paulo, safra 2012/13 (RIDESA, 2013).....	49
Figura 5. Variedades de cana-de-açúcar coletadas na Usina Iracema no período 2012/13	50
Figura 6. Condições climáticas durante 2012 e início de 2013 na Usina Iracema.....	53
Figura 7. Etapas de coleta e preparo de amostra de folhas de cana-de-açúcar.....	54
Figura 8. Mapa da variedade RB966928 cultivada em Latossolo Vermelho, com destaque para a gleba de 11,86 ha, onde foi realizada a amostragem em sete pontos, identificados com “x”	62
Figura 9. Fotografias da gleba plantada com a variedade RB966928 que foi amostrada para produção do candidato a material de referência.....	63
Figura 10. Sequência de procedimentos para obtenção de folhas de cana-de-açúcar sem nervuras....	63
Figura 11. Material de referência de folhas de cana-de-açúcar produzido, pronto para caracterização química.....	67
Figura 12. Frascos selecionados para testes de irradiação gama, homogeneidade, estabilidade e caracterização final do material candidato	68
Figura 13. Preparação do material de referência candidato de folhas de cana-de-açúcar para irradiação com nêutrons	69
Figura 14. Preparação de folhas de cana-de-açúcar e materiais de referência certificados.....	71
Figura 15. Preparação de soluções padrões e brancos analíticos para determinação elementar por INAA.....	72
Figura 16. Posição da amostra no suporte de alumínio e dentro da caixa para irradiação gama	73
Figura 17. Preparação de amostras, padrões e CRMs para a determinação de Si, N e B.....	74
Figura 18. Amostras, micro-amostras, padrões e CRMs analisados por INAA.....	77
Figura 19. Estabilidade a curto prazo do material de referência de folhas de cana-de-açúcar.....	78
Figura 20. Distribuição do tamanho de partícula no material de folha de cana-de-açúcar, determinada por difração laser, dispersão úmida, no equipamento Analysette 22 MicroTec plus, da Fritsch, Alemanha	84
Figura 21. Umidade residual obtida para dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade RB965902 em Podzólico e SP832847 em Quartzarênico.....	86
Figura 22. Umidade residual obtida para variedades de cana-de-açúcar CTC11 e CTC15 cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV).....	86
Figura 23. Fração de massa de Ca em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho.....	88
Figura 24. Fração de massa de K em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho.....	88
Figura 25. Fração de massa de P em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho.....	89
Figura 26. Fração de massa de Mg em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho.....	89
Figura 27. Fração de massa de Mn em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho.....	90
Figura 28. Fração de massa de Fe em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho.....	90

Figura 29. Fração de massa de Zn em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho	91
Figura 30. Fração de massa de Cu em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho	91
Figura 31. Fração de massa de Ca em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV).....	93
Figura 32. Fração de massa de K em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV).....	93
Figura 33. Fração de massa de P em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV).....	94
Figura 34. Fração de massa de Mg em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV).....	94
Figura 35. Fração de massa de Fe em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV).....	95
Figura 36. Fração de massa de Mn em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV).....	95
Figura 37. Fração de massa de Zn em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV).....	96
Figura 38. Fração de massa de Cu em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV).....	96
Figura 39. Fração de massa de N em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade RB965902 em Podzólico Vermelho e SP832847 em Quartzarênico	99
Figura 40. Fração de massa de N em duas variedades de cana-de-açúcar (CTC11 e CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV). 100	
Figura 41. Fração de massa de S em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade RB965902 em Podzólico Vermelho e SP832847 em Quartzarênico	101
Figura 42. Fração de massa de S em duas variedades de cana-de-açúcar (CTC11 e CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV).....	102
Figura 43. Fração de massa de Si em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedades RB965902 em Podzólico Vermelho e SP832847 em Quartzarênico	103
Figura 44. Fração de massa de Si em duas variedades de cana-de-açúcar (CTC11 e CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV).....	104
Figura 45. Teor de cinzas em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedades RB965902 em Podzólico Vermelho e SP832847 em Quartzarênico	105
Figura 46. Teor de cinzas em duas variedades de cana-de-açúcar (CTC11 e CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho, Cambissolo (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)	106
Figura 47. LDA para seis variedades de cana-de-açúcar em função de Br, Ca, Co, Cr, Cs, Fe, K, La, Na, P, Rb, Sc e Zn	110
Figura 48. LDA para doze variedades de cana-de-açúcar em função de Ca, K, Mg, N e P.....	111
Figura 49. LDA para macronutrientes (Ca, K, Mg, N e P) e micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn) estabelecidos em doze variedades de cana-de-açúcar	112
Figura 50. LDA em função dos nutrientes Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, N, P e Zn estabelecido para as variedades CTC11 e CTC15 cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)	113
Figura 51. Amostra A, seca em estufa, processada em moinho de facas	115
Figura 52. Amostra B, seca em estufa, processada em moinho de facas e peneirada em nylon de 250 µm.....	115
Figura 53. Amostra C, seca em estufa, processada em moinho de facas e moinho de rotor, peneirada em nylon de 250 µm.....	116

Figura 54. Amostra D, seca em estufa, processada em moinho de facas e moinho de rotor, peneirada em nylon de 100 µm.....	116
Figura 55. Amostra E, liofilizada, processada em moinho de facas e moinho de rotor, peneirada em nylon de 100 µm	117
Figura 56. Amostra F, liofilizada, processada em moinho de facas e moinho de bolas.....	117
Figura 57. Amostra G, liofilizada, processada em moinho de facas e moinho de bolas, peneirada em nylon de 100 µm	118
Figura 58. RM1 - Distribuição do tamanho de partícula na amostra 1	119
Figura 59. RM2 - Distribuição do tamanho de partícula na amostra 2	120
Figura 60. RM3 - Distribuição do tamanho de partícula na amostra 3	120
Figura 61. Br - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg.....	122
Figura 62. Ca - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg.....	123
Figura 63. Ce - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg.....	123
Figura 64. Co - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg.....	124
Figura 65. Cs - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg.....	124
Figura 66. Fe - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg	125
Figura 67. Hf - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg.....	125
Figura 68. K - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg	126
Figura 69. La - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg.....	126
Figura 70. Na - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg.....	127
Figura 71. P - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg.....	127
Figura 72. Rb - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg.....	128
Figura 73. Sc - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg	128
Figura 74. Sm - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg.....	129
Figura 75. Sr - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg.....	129
Figura 76. Th - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg.....	130
Figura 77. Zn - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg.....	130
Figura 78. N - Estudo de massa mínima usando massas de 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg	131
Figura 79. N - Teste de homogeneidade entre frascos usando o método de Kjeldahl	136
Figura 80. Espectros típicos de boro (B) em SRMs, amostra de folhas de cana-de-açúcar e branco determinados por PGAA	139
Figura 81. Br - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses	140
Figura 82. Ca - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses.....	141
Figura 83. Ce - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses.....	141
Figura 84. Co - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses	142
Figura 85. Cs - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1, 2 meses.....	142
Figura 86. Fe - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses.....	143
Figura 87. Hf - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses.....	143
Figura 88. K - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses	144
Figura 89. La - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses.....	144
Figura 90. Na - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses	145
Figura 91. Rb - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses	145
Figura 92. Sc - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses	146
Figura 93. Sm - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses.....	146
Figura 94. Sr - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses	147
Figura 95. Th - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses.....	147
Figura 96. Zn - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses.....	148
Figura 97. N - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses	148

Figura 98. Br - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses ...	149
Figura 99. Ca - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses...	150
Figura 100. Ce - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses.	150
Figura 101. Cs - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses.	151
Figura 102. Co - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses.	151
Figura 103. Fe - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses .	152
Figura 104. Hf - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses.	152
Figura 105. K - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses ..	153
Figura 106. La - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses.	153
Figura 107. Rb - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses.	154
Figura 108. Na - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses.	154
Figura 109. Sm - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses	155
Figura 110. Sc - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses .	155
Figura 112. Th - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses.	156
Figura 111. Sr - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses..	156
Figura 113. Zn - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses.	157
Figura 114. N - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3 e 6 meses	157
Figura 115. Cinzas do material de referência de folhas de cana-de-açúcar, em intervalos de confiança de 95%, LCL ($\mu-2SD$) e ULC ($\mu+2SD$).	158
Figura 116. Comparação dos resultados de INAA com o valor certificado (COA) ou valores de literatura.....	168
Figura 117. Comparação dos resultados de INAA com o valor certificado (COA) ou valores de literatura.....	169
Figura 118. Comparação dos resultados de INAA com o valor certificado (COA) ou valores de literatura.....	169

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Função e deficiência dos nutrientes em cana-de-açúcar (BABU, 1990; BAKKER, 1999; SINGH et al., 2002; MOORE; BOTHA, 2014)	27
Tabela 2. Faixa de frações de massa adequadas de macronutrientes e micronutrientes para folhas de cana-de-açúcar (RAIJ et al., 1996).....	28
Tabela 3. Técnicas analíticas para avaliar a composição nutricional da cana-de-açúcar	30
Tabela 4. Frações de massa de macro e micronutrientes (mg/kg) em folhas associados à alta produtividade de cana-de-açúcar comparados com a composição de materiais de referência certificados disponíveis (RAIJ et al., 1996; MALAVOLTA, 2006; COMAR, 2016)	36
Tabela 5. Principais características das variedades de cana-de-açúcar (RIDESA, 2008; CTC, 2013)	52
Tabela 6. Programa de aquecimento utilizado para digestão de folhas de cana-de-açúcar.....	57
Tabela 7. Parâmetros instrumentais para determinação de macronutrientes e micronutrientes em folhas de cana-de-açúcar por ICP OES	58
Tabela 8. Programa de aquecimento utilizado para digestão de folhas de cana-de-açúcar em bloco digestor	59
Tabela 9. Parâmetros instrumentais otimizados para determinação de enxofre e silício de folhas de cana-de-açúcar por ED-XRF.....	60
Tabela 10. Características dos moinhos utilizados na produção do material candidato.....	64
Tabela 11. Programa de moagem de folhas de cana-de-açúcar.....	65
Tabela 12. Condições experimentais para determinação de Si, N e B usando PGAA	75
Tabela 13. Padrões preparados a partir de sais, lâminas e soluções-padrão empregados em INAA... 82	
Tabela 14. Nuclídeos medidos, energia dos raios gama e modo de ensaio. Energias marcadas em negrito foram usadas para a determinação dos elementos químicos	83
Tabela 15. Frações de massa de elementos traços determinados em seis variedades de cana-de-açúcar por INAA. Resultados médios e desvios padrões (n=10) expressos em mg/kg de massa seca.....	98
Tabela 16. Equação linear da curva de calibração de S e Si em folhas de cana-de-açúcar em função da fração de massa (mg/kg) e intensidade (cps/ μ A)	101
Tabela 17. Frações de massa de Si (mg/kg) em folhas de cana-de-açúcar na África do Sul (DINARDO-MIRANDA et al., 2010).....	103
Tabela 18. Valores de coeficientes de variação relativos (RSD) dos macronutrientes em doze variedades de cana-de-açúcar.....	108
Tabela 19. Valores de coeficientes de variação relativos (RSD) de micronutrientes e Si em doze variedades de cana-de-açúcar.....	109
Tabela 20. Tamanho de partículas estabelecido em folhas de cana-de-açúcar usando vários procedimentos de moagem.....	118
Tabela 21. Tamanho de partícula obtido para o material de referência candidato	119
Tabela 22. Composição do material de referência antes e após irradiação com raios gama (^{60}Co) em diferentes doses. Valores expressos em mg/kg de massa seca e respectivas incertezas expandidas... 121	
Tabela 23. ANOVA e teste Tukey aplicado em resultados de macronutrientes e micronutrientes para 4 massas de amostra	132
Tabela 24. Homogeneidade dentro do frasco dos elementos químicos no material de referência candidato, para massas de 180 mg e 10 replicatas, U representa a incerteza combinada	133
Tabela 25. Homogeneidade dos elementos químicos no material de referência candidato determinado por INAA, para massas de 180 mg e 20 replicatas. 1σ representa a incerteza da estatística de contagem para a área do fotopico.....	135

Tabela 26. Homogeneidade dos elementos químicos no material de referência candidato determinado por INAA (NIST), para massas de 3 mg e 12 replicatas, 1σ é a incerteza originada das contagens acumuladas na área do fotopico.....	137
Tabela 27. Fração de massa de Si e N em material de referência de folhas de cana-de-açúcar usando PGAA, expresso em mg/kg	138
Tabela 28. Frações de massa dos elementos químicos determinados por INAA no material candidato com incertezas associadas	160
Tabela 29. Frações de massa dos elementos químicos determinados por INAA no material candidato com incertezas associadas (continuação).....	161
Tabela 30. Frações de massa dos elementos químicos determinados por INAA no material candidato com incertezas associadas (continuação).....	162
Tabela 31. Frações de massa dos elementos químicos determinados por INAA no material candidato com incertezas associadas (continuação).....	163
Tabela 32. Frações de massa dos elementos químicos determinados por INAA no material candidato com incertezas associadas (continuação).....	164
Tabela 33. Frações de massa dos elementos químicos no material de referência candidato. Resultados médios e incertezas expandidas expressos em mg/kg de massa seca	165
Tabela 34. Comparação dos resultados obtidos para SRM 1515, SRM, 1570a e INCT-OBTL- 5 com os respectivos valores certificados	166
Tabela 35. Comparação dos resultados obtidos para SRM 1515, SRM, 1570a e SRM1573a com os respectivos valores certificados	167

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1.Cana-de-açúcar	24
2.1.1. Variedades.....	25
2.1.2. Nutrientes	26
2.1.3. Diagnose nutricional	29
2.2.Material de Referência	30
2.2.1. Histórico de materiais de referência no mundo	30
2.2.2. Definição	32
2.2.3. Seleção e uso de CRMs.....	32
2.2.4. Material de Referência no Brasil	33
2.2.5. Importância do material de referência de cana-de-açúcar	34
2.3.Produção de material de referência.....	37
2.3.1. Homogeneidade	39
2.3.2. Estabilidade.....	41
2.3.3. Incerteza.....	42
2.4.Técnicas analíticas	43
2.4.1. Análise por ativação neutrônica instrumental.....	43
2.4.2. Análise por ativação com raios gama pronto	45
2.4.3. Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado	46
2.4.4. Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva	47
2.4.5. Método de Kjeldahl.....	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1.Estudo de variedades de cana-de-açúcar	49
3.1.1. Amostragem de folhas e solos	51
3.1.2. Preparação das amostras de cana	53
3.1.3. Determinação da umidade residual	55
3.1.4. Determinação de macronutrientes e micronutrientes.....	55
3.1.4.1.Análise por ativação neutrônica instrumental.....	55
3.1.4.2. Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado	56
3.1.4.3. Método de Kjeldahl.....	58
3.1.4.4. Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva	59
3.1.5. Determinação de cinzas	60
3.2.Produção do material de referência de folhas de cana-de-açúcar.....	61
3.2.1. Coleta do material	61
3.2.2. Preparação do material.....	62
3.2.3. Secagem	64
3.2.4. Moagem	64

3.2.5. Armazenamento.....	66
3.2.6. Estudo de homogeneidade.....	68
3.2.6.1. Estudo de massa mínima	68
3.2.6.2. Homogeneidade dentro do frasco	70
3.2.6.3. Homogeneidade entre frascos.....	70
3.2.6.4. Estudo de micro-heterogeneidade	76
3.2.7. Estudo de estabilidade	77
3.2.7.1. Estabilidade a curto prazo	78
3.2.7.2. Estabilidade a longo prazo	78
3.2.8. Umidade Residual	79
3.2.9. Determinação de cinzas.....	80
3.2.10. Caracterização química final do material	80
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
4.1. Estudo de variedades de cana-de-açúcar.....	84
4.1.1. Determinação de macronutrientes e micronutrientes	87
4.1.2. Determinação de nitrogênio por método de Kjeldahl	98
4.1.3. Determinação de enxofre e silício por ED-XRF	100
4.1.4. Determinação de cinzas.....	104
4.2. Seleção da variedade de cana-de-açúcar	106
4.2.1. Análise estatística	110
4.3. Produção de material de referência	113
4.3.1. Estudo de homogeneidade.....	121
4.3.1.1. Estudo de massa mínima	121
4.3.1.2. Homogeneidade dentro do frasco.....	132
4.3.1.3. Homogeneidade entre frascos.....	133
4.3.1.4. Estudo de micro-heterogeneidade	136
4.3.2. Determinação de nutrientes por PGAA.....	138
4.3.3. Estudo de estabilidade	139
4.3.3.1. Estabilidade a curto prazo	140
4.3.3.2. Estabilidade a longo prazo	149
4.3.4. Determinação de cinzas.....	158
4.3.5. Caracterização química final do material candidato	159
4.4. Controle da qualidade analítica	166
5. CONCLUSÕES.....	171
REFERÊNCIAS.....	173

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícolas do Brasil há muitas décadas. O país ocupa a primeira posição no ranking mundial da cultura, produzindo principalmente açúcar e etanol, e, mais recentemente bioeletricidade. A quantidade produzida e a tecnologia existente permitem que o país seja o maior exportador mundial de açúcar de cana, respondendo por 50% de todo o produto comercializado no mundo, consolidando-se assim como importante agente no mercado internacional (UNICA, 2016).

Em relação ao etanol, o país compartilha a liderança nas exportações com os Estados Unidos da América, sendo o segundo maior produtor responsável por 29,2 bilhões de litros na safra 2015/2016. Além da produção de açúcar e etanol, a cana-de-açúcar tem sido muito utilizada para a fabricação de cachaça, rapadura e açúcar-mascavo, alimentação de animais e adubos agrícolas (CONAB, 2015; UNICA, 2016).

Dada a relevância econômica da cana-de-açúcar e a demanda cada vez mais aquecida de açúcar e etanol, têm sido realizados muitos estudos de sistemas de plantio e desenvolvimento de novas variedades comerciais, com maior conteúdo de açúcar e resistência a doenças, buscando incremento da produtividade e suprimento do mercado nacional e internacional em expansão (CTC, 2011).

Segundo Malavolta (2006), existe uma relação estreita entre o conteúdo de nutrientes e a alta produtividade da cana-de-açúcar. Deve-se avaliar o estado nutricional da planta para corrigir as deficiências de nutrientes, planejar as quantidades e formas de aplicação de fertilizante, bem como otimizar o sistema de cultivo (OLIVIERA et al., 2007). Portanto, ter conhecimento da disponibilidade de nutrientes do solo é importante. Em relação à adubação da cana-de-açúcar, é preciso um fornecimento adequado e equilibrado de macronutrientes (Ca, K, Mg, N, P e S) e micronutrientes (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn), já que cumprem papel importante no crescimento das raízes, síntese de aminoácidos e proteínas, fotossíntese, metabolismo de carboidratos e fixação de nitrogênio (DINARDO-MIRANDA et al., 2010), sendo assim classificados como essenciais e benéficos. O silício é um macronutriente benéfico que desempenha um papel importante na cana-de-açúcar, conferindo maior tolerância a doenças e pragas e aumentando a produtividade (KORNDÖRFER; DATNOFF, 1995; MOORE; BOTHA, 2014).

Geralmente, estima-se a necessidade dos nutrientes na cana-de-açúcar pela análise química do solo, que é o método mais utilizado para avaliar a fertilidade do solo, recomendando-se a quantidade de adubo requerido para complementação. Não obstante, esse

tipo de análise apresenta algumas limitações, principalmente quanto à quantidade de amostra, uma vez que apenas alguns gramas de solo deverão representar muitos hectares (ORLANDO et al., 1994). Além disso, a amostragem do solo somente pode ser realizada em cana-planta, não sendo considerada a cana-soca devido a problemas na obtenção de amostras de solo representativas após aplicação de fertilizantes (MCCRAY et al., 2010). Nesse contexto, a determinação de nutrientes em folhas é considerada importante ferramenta na avaliação do estado nutricional, uma vez que elas apresentam alta atividade metabólica, refletindo na composição as mudanças nutricionais, sejam advindas do solo ou adubo (VITTI; MAZZA, 2002; OLIVEIRA, 2008).

A análise foliar na cultura da cana possibilita conhecer a faixa de variação dos macronutrientes e micronutrientes em folhas e identificar prováveis áreas deficientes destes elementos (GALLO; HIROCE, 1968). Para uma correta avaliação, alguns fatores como tipo de folha amostrada, época da amostragem, variedade de cana e tipo de solo devem ser considerados (ORLANDO et al., 1994).

A determinação dos elementos nutrientes pode ser feita por diferentes técnicas analíticas. Algumas delas requerem tratamento químico prévio da amostra antes da análise, enquanto outras fazem por análise direta de sólidos. Entre essas técnicas, têm-se análise por espectrometria de absorção atômica (AAS) (WAHEED et al., 2009), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) (COLLIN; DOELSCH, 2010), espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (CALDAS et al., 2009), espectrometria de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF) (CUNHA et al., 2004), análise por ativação neutrônica (NAA) (AWADALLAH et al., 1995) e espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) (NUNES et al., 2010). Para garantir a exatidão e a precisão do sistema de medição analítica, é necessário o uso de materiais de referência certificados (CRMs) para controle, otimização e validação de métodos, garantindo melhor aceitação e confiabilidade dos resultados (ZSCHUNKE, 2000).

Materiais de referência certificados (CRMs) têm papel essencial e aplicabilidade específica nos procedimentos analíticos, devendo ser selecionados de acordo com características físicas e químicas, composição matricial, concentração e incerteza associada dos analitos (BIEVRE, 2006). Contudo, há algumas restrições na seleção, já que não existem CRMs para atender às mais diferentes variedades de amostras e analitos, devido ao trabalho, tempo e custos envolvidos no processo de preparação e certificação dos materiais. Muitas vezes o produtor de CRMs não consegue lidar com o incremento da demanda, resultando em uma

quantidade reduzida de matrizes disponíveis para um número limitado de analitos (ARNIGO et al., 2004; ULBERTH, 2005).

Para o setor canavieiro, já foram produzidos um material de referência de bagaço de cana-de-açúcar (NIST RM 8491) para avaliação de materiais lignocelulósicos (NIST, 2016), e um material de referência para avaliar o teor de sacarose, pelo Instituto Nacional de Metrologia da Tailândia (BOONYAKONG et al., 2010). Entretanto, ainda não foi disponibilizado um material de referência de cana-de-açúcar certificado em elementos químicos. A produção de CRM a partir de folhas de cana-de-açúcar para avaliar o estado nutricional traduz-se, portanto, numa prioridade do setor canavieiro, devido à importância econômica da cultura com crescente demanda de açúcar e etanol por parte do mercado internacional.

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de material de referência de folhas de cana-de-açúcar certificado para macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S, Si), micronutrientes (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn) e elementos traços (Br, Ce, Co, Cr, Cs, Hf, La, Na, Rb, Sb, Sc, Th), com a finalidade de avaliar o estado nutricional das variedades já consolidadas para cultivo como aquelas em desenvolvimento.

Para tal, os objetivos específicos propostos foram:

- 1) Caracterização química de doze variedades de cana-de-açúcar mais plantadas no Estado de São Paulo, visando otimização das condições de produção do material candidato
- 2) Seleção da variedade mais representativa para produção do material
- 3) Produção do material de referência e avaliação das características físicas e químicas, homogeneidade dentro e entre frascos e estabilidade

Pretende-se disponibilizar este novo CRM aos laboratórios do país e do exterior, envolvidos com o setor produtivo da cana-de-açúcar, atendendo às demandas do controle da qualidade analítica em medições químicas exatas, precisas e confiáveis.

Este projeto de pesquisa foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio do projeto n° 2011/21675-0.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma cultura perene pertencente à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*, originária do sudeste da Ásia, provavelmente da Nova Guiné, cultivada em climas tropicais e subtropicais entre as latitudes 35° norte e 35° sul e altitudes desde o nível do mar até 1000 m. Esta cultura é constituída por touceira, colmo, gemas, folhas e palmito, sendo assim diferenciada das outras espécies vegetais (DINARDO-MIRANDA et al., 2010). A cana-de-açúcar é cultivada em 121 países, com área total de 20,94 milhões de hectares e 1,91 bilhões de toneladas de cana produzida, sendo os principais produtores, em ordem decrescente de produção, Brasil, Índia, China, Tailândia e Paquistão (FAOSTAT, 2014).

No Brasil, a cana-de-açúcar é uma cultura sustentável, versátil e renovável, cultivada desde 1532, que apresenta grande interesse econômico, científico, ambiental e tecnológico para a sociedade devido às diversas utilidades como matéria prima de produtos e fonte alternativa de energia limpa para combustíveis fósseis. Entre os principais produtos da cana-de-açúcar, têm-se açúcar e etanol de primeira e segunda geração, enquanto outros subprodutos, tais como bioeletricidade, cachaça, rapadura, açúcar-mascavo, diesel, solventes, detergentes, lubrificantes, papel, alimentos para animais e fertilizantes, são gerados a partir de resíduos de bagaço, torta de filtro, melaço, vinhaça e palha (EMBRAPA, 2015).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o Brasil produz mais de 650 milhões de toneladas de cana-de-açúcar por ano, em uma área aproximada de 9,0 milhões de hectares (Safra 2015/16), liderando a produção mundial de açúcar com 35 milhões de toneladas, enquanto o etanol total produzido ultrapassa 29 bilhões de litros (CONAB, 2015).

As principais regiões produtoras são Centro-Sul, Norte e Nordeste, constituídas pelos estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Pernambuco e Mato Grosso, responsáveis por 94,7% da produção nacional. As 430 usinas em operação foram modernizadas, com adoção de novas tecnologias desde o plantio até a produção de açúcar, etanol e bioeletricidade (CONAB, 2015; UNICA, 2016). A Figura 1 apresenta a localização das usinas de cana-de-açúcar e refinarias de biodiesel no Brasil (CONAB, 2012).



Figura 1. Localização das usinas de cana-de-açúcar e refinarias de etanol no Brasil
Extraído de CONAB (CONAB, 2012)

De acordo com a Organização Internacional do Açúcar (ISO) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a produção mundial de açúcar de 184 milhões de toneladas na safra 2015/16 deve continuar crescendo até 215 milhões de toneladas na safra 2023/24, enquanto a produção global de etanol deverá ser incrementada para 168 bilhões de litros na safra 2023/24 para suprir o mercado internacional em expansão (FAO, 2015).

O Brasil vive um momento de exigências de crescimento na produção tanto de cana-de-açúcar, quanto de etanol e de açúcar. Os ganhos obtidos pelo uso de novas tecnologias durante a produção e o processamento de cana-de-açúcar não são suficientes para atender as demandas de açúcar e etanol das próximas décadas (CONAB, 2015; FAO, 2015). Isso implica a ação conjunta de diferentes áreas de interesse, que têm como finalidade desenvolver novos sistemas de plantio e variedades, incluindo as transgênicas, para serem colocados à disposição do setor sucroalcooleiro (CTC, 2014).

2.1.1. Variedades

As primeiras variedades de cana-de-açúcar no Brasil foram desenvolvidas a partir de um híbrido de *Saccharum barberi* e *Saccharum officinarum*. Atualmente, mais de

200 variedades de cana-de-açúcar foram desenvolvidas a partir de cruzamentos, enquanto mais de 5000 foram obtidas de melhoramento genético pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA) e pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). O desenvolvimento de variedades é realizado em função dos interesses agrônômicos e industriais, *i.e.*, etanol (maior biomassa) e açúcar (maior teor de açúcar). Estas variedades desenvolvidas devem atender diversos requisitos da qualidade, como maior teor de açúcar, produtividade, resistência a doenças, pragas e variações climáticas, colheita mecanizada, dentre outros (CTC, 2013; CTC, 2014; EMBRAPA, 2015). As variedades recebem uma nomenclatura específica informada pela instituição responsável do cruzamento, ou seja, IAC (IAC), RB (RIDESA), SP e CTC (CTC), PO (Cosan) e PB (Syngenta).

As variedades podem ser classificadas em função do tempo de maturação, ou seja, como hiperprecoce (5-6 meses), precoce (12 meses), média (18 meses) e tardia (24 meses), obtendo-se maior desenvolvimento e produtividade quando são plantadas em ambientes de produção apropriados que forneçam condições nutricionais adequadas para cada variedade.

O ambiente de produção considera as características físicas (textura), hídricas (água), morfológicas (horizonte), químicas e mineralógicas dos solos (nutrientes), associadas com subsuperfície dos solos (profundidade) e condições climáticas. Existem cinco tipos de ambientes de produção (A, B, C, D, E e F) que visam facilitar o manejo das variedades nos diferentes tipos de solos, os quais são classificados de acordo com o potencial de produtividade como A (alto), B (médio/alto), C (médio), D (médio/baixo), E (baixo) e F (manejo diferenciado) (PRADO, 2005; CTC, 2008).

2.1.2. Nutrientes

Nutrientes em plantas são classificados como essenciais (B, Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, N, P, S, Zn), benéficos (Co, Na, Ni, Si) e tóxicos (Al, As, Cd, Cr, Pb, Hg, Rb, Se), sendo divididos em função da fração de massa como macronutrientes, micronutrientes e elementos traços. Os nutrientes essenciais e benéficos desempenham papel importante na produção e incremento da produtividade da cana-de-açúcar. A Tabela 1 apresenta a função de cada elemento na planta. A exigência por esses nutrientes varia em função do tipo de cana (planta ou soca), variedade, ciclo, estágio de crescimento, número de corte, ambiente de produção e produtividade (BAKKER, 1999; DINARDO-MIRANDA et al., 2010).

Tabela 1. Função e deficiência dos nutrientes em cana-de-açúcar (BABU, 1990; BAKKER, 1999; SINGH et al., 2002; MOORE; BOTHA, 2014)

Elemento	Função	Deficiência
Boro	Desenvolvimento de novos tecidos, enraizamento e perfilhamento	Folha frágil e estreita (necrose foliar)
Cálcio	Ativação de enzimas, parede celular, intercâmbio iônico na solução do solo e absorção de nutrientes pela raiz	Incrementa acidez da solução do solo, diminui crescimento de raízes e colmos finos
Cloro	Crescimento e metabolismo	Diminui o crescimento
Cobalto	Fixação de N do ar	Clorose foliar
Cobre	Ativação de enzimas, clorofila, lignificação da parede celular	Afeta formação da clorofila e metabolismo da cana-planta
Enxofre	Desenvolvimento da cana e alta produtividade de colmos	Afeta folhas e colmos
Ferro	Enzimas, tecidos, clorofila, fotossíntese e catalisador	Afeta crescimento de folhas e raízes
Fósforo	Fotossíntese, metabolismo de açúcar, crescimento de raízes e perfilhamento	Reduz crescimento, perfilhos, afeta colmo e raízes
Magnésio	Clorofila, enzimas e síntese de proteínas	Afeta o colmo e diminui crescimento e produtividade
Manganês	Enzimas, atividade metabólica, fotossíntese, clorofila	Reduz crescimento e desenvolvimento da cana
Molibdênio	Metabolismo de nitrogênio na planta	Raias amarelas na folha
Níquel	Ativador de urease	Clorose foliar
Nitrogênio	Constituinte de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. Maximiza a produção de massa seca e perfilhamento	Reduz crescimento, produtividade e qualidade da cana
Potássio	Ativação de enzimas, síntese de proteínas e fotossíntese	Necrose foliar e diminui o teor de açúcar no colmo
Rubídio	Incrementa a quantidade de raízes	
Silício	Não definida	Afeta a folha e produtividade
Sódio	Fotossíntese	Clorose e necrose
Zinco	Ativador de enzimas, síntese de proteínas e metabolismo de carboidratos	Clorose, necrose e reduz crescimento de raízes

Os macronutrientes mais exportados do solo para a cana-de-açúcar são $K > N > P$ e os micronutrientes, $Fe > Mn > Zn > Cu > B > Mo$. A maioria dos micronutrientes é encontrada em frações de massa próximas ao nível crítico devido a disponibilidade no solo e acumulação na planta, com exceção de Fe e Mn. O nível crítico de um elemento no tecido vegetal é definido como o valor abaixo ou acima da faixa de fração de massa adequada, quando são afetados o crescimento e a produção da cana-de-açúcar (DINARDO-MIRANDA et al., 2010).

A quantidade aplicada destes elementos usando fertilizantes deve ser apropriado para garantir o equilíbrio nutricional da planta. A deficiência pode reduzir o crescimento, afetar a produção e diminuir o teor de açúcar no colmo, enquanto o excesso produz toxidez e altera a biodisponibilidade de outros elementos como por exemplo, a deficiência de N reduz o crescimento da cana-de-açúcar e o excesso de P cria deficiência de Cu, Fe e Zn (BENTON, 1998; BAKKER, 1999).

As frações de massa de macronutrientes e micronutrientes para a alta produtividade da cana-de-açúcar são apresentadas na Tabela 2 (RAIJ et al., 1996).

Tabela 2. Faixa de frações de massa adequadas de macronutrientes e micronutrientes para folhas de cana-de-açúcar (RAIJ et al., 1996)

Macronutrientes (g/kg)					
N	P	K	Ca	Mg	S
18 - 25	1,5 – 3,0	10 - 16	2,0 – 8,0	1,0 – 3,0	1,5 – 3,0
Micronutrientes (mg/kg)					
B	Cu	Fe	Mn	Mo	Zn
10 - 30	6 - 15	40 - 250	25 - 250	0,05 - 0,20	10 – 50

Por outro lado, as plantas são receptoras passivas de elementos traços (< 1 mg/kg) e possuem a capacidade de absorver e acumular a partir de solo, água e ar (KABATA, 2011). A quantidade absorvida e a disponibilidade destes elementos dependem da variedade da cana-de-açúcar e variabilidade das características edáficas (BAKKER, 1999).

Os elementos traços determinados em cana-de-açúcar são Ag, Al, As, Au, Ba, Be, Br, Cd, Ce, Cr, Cs, Eu, Ga, Hf, La, Li, Lu, Mo, Nb, Pb, Rb, Sb, Sc, Se, Sm, Sn, Sr, Ta, Th, V e W (MOHAMED, 1986; WAHEED et al., 2009). No entanto, há necessidade de maior estudo para definir o papel desses elementos no crescimento da cana-de-açúcar.

A determinação da quantidade aplicada de adubos e fertilizantes na cana-de-açúcar vem sendo realizada pelo uso de metodologia de diagnose nutricional empregando amostras de solo e folhas, assim como a diagnose visual e o histórico da área para confirmar a deficiência e a

toxicidade de um nutriente. Os nutrientes devem ser encontrados em equilíbrio químico no solo, sendo assim fornecidos de forma balanceada e equilibrada para obtenção de alta produtividade. A adubação apropriada dos solos permite incremento de 50 a 60 % na produção e representa até 30 % dos custos de produção (DINARDO-MIRANDA et al., 2010).

2.1.3. Diagnose nutricional

A avaliação do estado nutricional da cana-de-açúcar vem sendo realizada usando dois métodos complementares, a análise química do solo que avalia a fertilidade do solo e a análise química de folhas que mostra o estado nutricional da planta em um dado momento.

O solo é um material complexo e heterogêneo. A disponibilidade dos nutrientes e o aproveitamento dos fertilizantes variam em função das reações químicas e microbiológicas. Entretanto, a planta é o extrator universal que reflete a exigência de nutrientes em relação à capacidade do solo. A diagnose foliar monitora a disponibilidade dos nutrientes durante o crescimento e produção das culturas, identificando a deficiência e a toxicidade de cada nutriente e permitindo um diagnóstico mais eficiente da necessidade de adubação, especialmente para micronutrientes. A diagnose foliar na cana-de-açúcar depende do tipo de folha amostrada, época de amostragem, idade cronológica e fisiológica que varia em função do tipo de cana (planta ou soca), variedade de cana e tipo de solo. Os valores obtidos são empregados nas recomendações de adubação do solo (DINARDO-MIRANDA et al., 2010).

A determinação dos macronutrientes e micronutrientes em folhas pode ser realizada por diferentes técnicas analíticas, a maioria delas requerendo um prévio tratamento da amostra antes da análise, enquanto outras são por análise direta de sólidos. A escolha da técnica é feita em função da matriz, elemento de interesse e a concentração na planta, sendo a análise por absorção atômica de chama (FAAS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) empregadas para a determinação de macronutrientes e micronutrientes, e o método de Kjeldhal para determinar N (KALRA, 1998). A Tabela 3 mostra alguns estudos realizados para avaliação nutricional da cana-de-açúcar.

A obtenção de medições analíticas confiáveis a partir destas técnicas em agricultura é fundamental para padronizar a eficiência dos laboratórios, cumprir os regulamentos de conformidade do governo, otimizar o manejo do solo e a eficiência da aplicação de fertilizantes.

Tabela 3. Técnicas analíticas para avaliar a composição nutricional da cana-de-açúcar

Técnicas	Amostras	Elementos	Referências
ICP OES	Folhas	Ca, K, Mg, P, S, Al, B, Cu, Fe, Mn, Zn	Miranda et al., 2014
LIBS	Folhas	P, K, Ca, Mg, B, Cu, Fe, Mn, Zn	Nunes et al., 2010
		P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, B, Si	Guerra et al., 2015
HR-CS FAAS	Folhas	Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg e K	Oliveira, 2010
EDXRF	Folhas	P, K, Ca, S, Fe, Mn, Si	Guerra et al., 2015
INAA	Caldo	Fe, Hf, Sc, Th	Fernandes et al., 2009
INAA	Açúcar	As, Br, Hg, Sb, Se	Waheed, 2009

Nota: LIBS - Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser

ICPOES - Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

HR-CS-FAAS – Espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução

EDXRF - Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva

INAA - Análise por ativação neutrônica instrumental

A falta de concordância das medições analíticas entre os laboratórios pode afetar diretamente a credibilidade dos resultados. A contribuição da incerteza de medição é estabelecida em diferentes etapas, tais como pre-amostragem, amostragem, calibração e determinação dos elementos de interesse. A competência do analista para o preparo do material é também um fator importante para a incerteza de medição. Assim, o uso de materiais de referência apropriados torna-se necessário para monitorar, otimizar e validar métodos, garantindo exatidão, precisão, qualidade e rastreabilidade das medições analíticas (KALRA, 1998; ZSCHUNKE, 2000).

2.2. Material de referência

2.2.1. Histórico de materiais de referência no mundo

O desenvolvimento das primeiras amostras de referência e materiais de referência remonta ao início da química analítica. No século XIX, os reagentes químicos empregados apresentavam baixo grau de pureza, sendo necessários materiais purificados como padrões primários. Um dos primeiros padrões recomendados foi o As_2O_3 (trióxido de arsênio), por Gay-Lussac (1824). Sorensen (1887) propôs critérios para a seleção de padrões químicos primários. Já o primeiro material de referência biológico foi utilizado para a determinação de gordura em leite e identificar leite adulterado em Londres em 1880 (STOEPPLER et al., 2001).

No entanto, a necessidade de comparar resultados analíticos entre laboratórios de diferentes países levou à criação em 1906, nos Estados Unidos, do National Bureau of Standards (NBS), hoje conhecido como *National Institute of Standards and Technology* (NIST). O

Instituto deu início ao primeiro programa de produção de materiais de referência para atender a demanda de padrões da engenharia industrial e da indústria metalúrgica (ZCHUNKE, 2000).

Atualmente, materiais de referência (RMs) têm sido produzidos para atender a necessidade de diferentes áreas de interesse como medicina, geoquímica, biologia, ambiente, metalurgia, indústria, agricultura, entre outras. De acordo com a base de dados internacional para materiais de referência (COMAR), foram produzidos 10624 materiais por 240 produtores em 27 países, incluindo o Brasil (COMAR, 2016). Os maiores produtores de CRMs são Japão (*National Metrology Institute of Japan, NMIJ*), China (*Chinese National Research Centre for Certified Reference Materials, CN CRM*), França (*Laboratoire National de Métrologie et d'essais, LNE*), Alemanha (*Bundesanstalt für Material Forschung und Prüfung, BAM*), Inglaterra (*International Life Sciences and Testing Services Company, LCG*), Bélgica (*Institute of Reference Materials and Measurements, IRMM*), Polônia (*Polish Institute of Nuclear Chemistry and Technology, INCT*), Rússia (*The Ural Scientific Research Institute for Metrology, UNIIM*), Coreia (*Korea Research Institute of Standards and Science, KRISS*), Estados Unidos (*National Institute of Standards and Technology, NIST*), Austrália (*National Measurement Institute, NMI*) e República Checa (*Czech Metrology Institute, CMI*). A Figura 2 apresenta os países produtores de materiais de referência certificados (CRMs), bem como a quantidade de produtores e de CRMs produzidos.

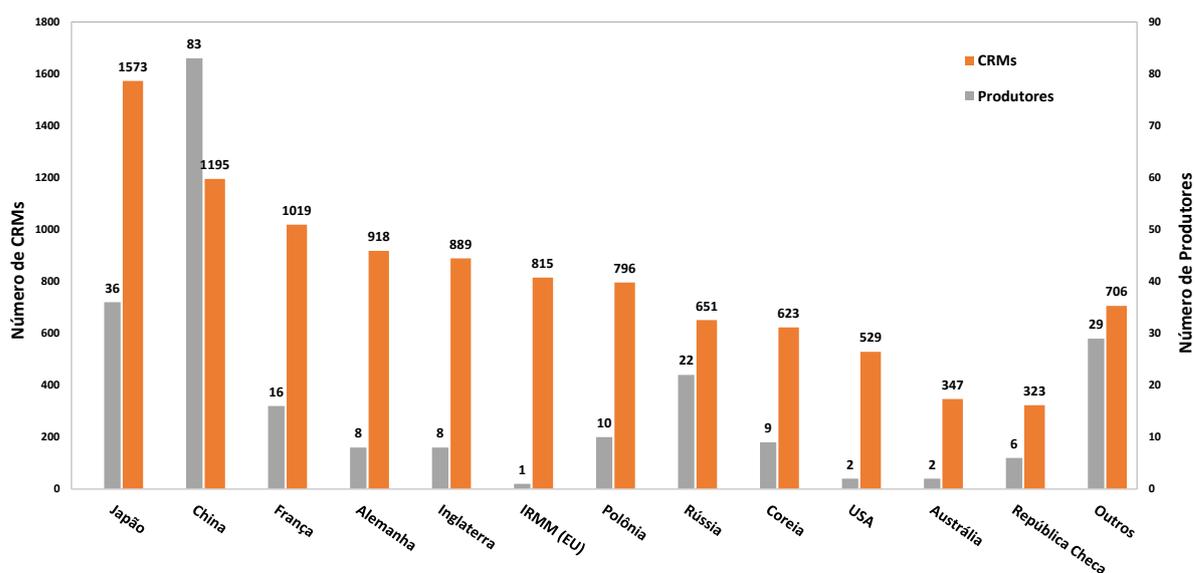


Figura 2. Países produtores e CRMs produzidos (COMAR, 2016)

Estes materiais podem ser classificados em 8 campos de aplicação: 1) metais ferrosos (12 %); 2) metais não ferrosos (15 %); 3) materiais industriais (19 %); 4) propriedades físicas (14 %); 5) orgânicos (9 %); 6) inorgânicos (14 %); 7) qualidade de vida (14 %) e 8) biológicos e clínicos (3 %) (COMAR, 2016).

2.2.2. Definição

De acordo com a ISO Guia 30 e o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM), Materiais de Referência (RMs) e Materiais de Referência Certificados (CRMs) são utilizados para a calibração de instrumentos de medição, avaliação de processos de medição e controle da qualidade interna e externa de medições em laboratórios (VIM, 2012; ISO GUIDE 30, 2015). No entanto, existem três termos que devem ser diferenciados, ou seja, RMs, CMRs e material de referência candidato.

Material de referência (RM) é definido como um material suficientemente homogêneo e estável em relação a propriedades específicas, preparado para se adequar a uma utilização pretendida numa medição ou num exame de propriedades qualitativas e quantitativas, *i.e.*, calibração de sistemas de medição, atribuição de valores a outros materiais, controle da qualidade e identificação de substâncias ou espécies (ISO GUIDE 30, 2015).

Material de referência certificado (CRM) é o material de referência que vem caracterizado por um procedimento metrológico válido para uma ou mais propriedades específicas, acompanhado por um certificado que fornece valores das propriedades específicas com incertezas associadas e rastreabilidade metrológica (ISO GUIDE 30, 2015).

Material de referência candidato é um material produzido como um material de referência (RM). Este material deve ser caracterizado e avaliado para garantir seu apropriado uso nos procedimentos de medição. Para ser reconhecido como um RM, a homogeneidade e a estabilidade de uma ou mais propriedades específicas do material candidato devem ser avaliadas (ISO GUIDE 30, 2015).

2.2.3. Seleção e uso de CRMs

RMs e CRMs cumprem papel importante na padronização mundial de sistemas de medição e acreditação de laboratórios. CRMs são empregados para calibrar os sistemas de medição, avaliar procedimentos analíticos, eficiência de equipamentos, definir escalas de medição, ensaios interlaboratoriais, demonstração de rastreabilidade e análises qualitativas.

De acordo com o VIM, a rastreabilidade é uma propriedade do resultado de medição, que pode ser relacionado a uma referência, através de uma cadeia contínua documentada de calibração, cada uma contribuindo para a incerteza de medição (VIM, 2012).

A seleção e uso de CRMs deve ser efetuada de acordo com suas características, aplicação, composição matricial, analitos de interesse, faixa de concentração, incerteza associada, massa mínima, homogeneidade e estabilidade, condições de armazenamento e potenciais interferentes. Dessa forma, são procurados CRMs com composição semelhante à da amostra de interesse (ZCHUNKE, 2000; BIEVRE, 2006).

Apesar da grande quantidade de materiais produzidos em nível mundial (cerca de 10600 CRMs), há algumas restrições na seleção e uso destes materiais, já que não existem suficientes CRMs para atender às mais diferentes variedades de amostras e analitos. A limitação da disponibilidade de CRMs está relacionada com: 1) tempo de preparação e certificação do material e gastos associados; 2) alto custo de aquisição e 3) validade do material (COMAR, 2016). Por conseguinte, muitos laboratórios em diferentes países produzem RMs de matriz semelhante às amostras (ARNIGO et al., 2004; ULBERTH, 2005).

2.2.4. Material de referência no Brasil

A produção e comercialização de CRMs no Brasil para as áreas de geoquímica, biologia, ambiente e indústria são realizadas por algumas instituições, tais como: 1) Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), que produz CRMs desde 1975 e já desenvolveu mais de 130 materiais constituídos por aço, ligas metálicas, minérios, cerâmicas, vidro, fertilizantes, viscosidade, massa, ponto de fluidez, ponto de fulgor e ponto de névoa, entre outros (IPT, 2016); 2) Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), que desenvolve materiais para a área de mineração e metalurgia como, por exemplo, bauxita e sulfato de cobre (CETEM, 2016); 3) Centro Tecnológico de Polímeros (SENAI/CETEPO), que produz materiais para medir viscosidade, resistência à abrasão em elastômero e reômetro (SENAI, 2016); 4) Instituto Nacional de Controle da Qualidade na Saúde (INCQS), que produz microorganismos de referência (INCQS, 2016) e 5) Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), que produz padrões de bioetanol, pH, condutividade, etanol em água, cachaça e ácido clorídrico (INMETRO, 2016).

A procura de CRMs para atender às necessidades do agronegócio brasileiro tem aumentado devido às exigências dos regulamentos nacionais e internacionais de segurança alimentar e nutricional. O Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) vem

incentivando universidades e institutos de pesquisa, como o Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), ambas pertencentes à Universidade de São Paulo (USP), e a Embrapa Pecuária Sudeste (EMBRAPA) a produzirem RMs para o controle da qualidade de produtos agropecuários e alimentos. Já foram produzidos 12 RMs no total, incluindo tecidos de origem animal (sangue, músculo, rim e fígado bovino), insumos pecuários (adubo fosfatado, forragem concentrada e mistura mineral) e materiais de origem vegetal (arroz, soja, polpa de tomate e folhas de tomate). Há, ainda, outras instituições de pesquisa produtoras de RMs, como o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e o Instituto de Química de São Paulo (IQ-USP).

2.2.5. Importância do material de referência de cana-de-açúcar

A demanda por RMs produzidos para avaliação nutricional, assim como a procura por programas de ensaios de proficiência, têm se expandido nos laboratórios de qualidade do setor canavieiro. No entanto, ainda não foram disponibilizados CRMs de cana-de-açúcar para avaliação de macronutrientes e micronutrientes. O NIST produziu em 2011 um material de referência de bagaço de cana-de-açúcar (NIST RM 8491) para o controle dos métodos analíticos de determinação de materiais lignocelulósicos (NIST, 2016), enquanto o Instituto Nacional de Metrologia da Tailândia preparou em 2015 um material de referência para avaliar o teor de sacarose (BOONYAKONG et al., 2010).

Estudos encontrados na literatura apresentam a determinação de macronutrientes e micronutrientes em cana-de-açúcar, por diferentes técnicas analíticas, utilizando CRMs diversos para o controle da qualidade dos procedimentos realizados, incluindo NIST SRM 1515 (*folhas de maçã*), NIST SRM 1570 (*folhas de espinafre*), NIST SRM 1572 (*folhas de laranja*), NIST SRM 1573a (*folhas de tomate*), GWB 07603 (*folhas e galhos de árvores*), IAEA Soil 7 (*solo*), IAEA V-10 (*feno*), CRM 7001 (*solo arenoso*) e CRM 7004 (*argila*) (COLLIN; DOELSCH, 2010; NUNES et al., 2010). A Tabela 4 apresenta valores de fração de massa de macronutrientes e micronutrientes adequados para alta produtividade da cana-de-açúcar, juntamente com alguns CRMs vegetais. Verifica-se que são necessários vários CRMs para atingir faixas de concentração semelhantes às da cana-de-açúcar para todos os elementos de interesse na análise de cana-de-açúcar. Além disso, existem alguns elementos de interesse que não são certificados nesses materiais.

Por outro lado, têm-se outros estudos de avaliação do estado nutricional da cana-de-açúcar, nos quais o uso de CRMs foi substituído por duas ou três técnicas independentes, para

otimizar a sensibilidade e a exatidão das medições e, assim, obter resultados de análise mais confiáveis (AWADALLAH et al., 1995).

Contudo, o uso de outros materiais de referência vegetais não é uma alternativa muito recomendada devido à alta capacidade de extração de nutrientes da cana-de-açúcar, principalmente K, N, P, Si, Ca e S, e o alto teor de fibra e lignina, sendo assim uma matriz diferenciada das outras culturas (PROCHNOW et al., 2010). Porém, problemas de comutabilidade podem ser gerados diretamente pela composição matricial diferenciada ao serem comparados com os CRMs. Pequenas diferenças na composição podem resultar na ocorrência de interferências distintas, ou seja, que ocorrem na amostra e não no CRM, ou vice-versa. Majoritariamente em métodos que requerem a solubilização da amostra, há necessidade de cuidado especial com a possível perda de elementos de interesse devido à incompleta dissolução da matriz (WALKER; LUMLEY, 1999; VESPER et al., 2007). Ademais, nem sempre se dispõem de dois ou mais métodos independentes para validação dos procedimentos analíticos.

Assim, é importante sempre utilizar CRMs de composição química mais próxima possível da amostra, já que CRMs com matrizes diferentes podem aumentar a incerteza, afetando a exatidão e a precisão das medições (VESPER et al., 2007; KUSELMAN, 2010).

Nesse sentido, o material de referência de folhas de cana-de-açúcar é de grande relevância para o controle da qualidade nutricional, desenvolvimento de novos métodos, rastreabilidade, otimização do uso de fertilizantes e desenvolvimento de novas variedades.

Tabela 4. Frações de massa de macro e micronutrientes (mg/kg) em folhas associados à alta produtividade de cana-de-açúcar comparados com a composição de materiais de referência certificados disponíveis (RAIJ et al., 1996; MALAVOLTA, 2006; COMAR, 2016)

Elemento	Cana-de-açúcar		LGC 7162	NIES CRM N°23	GBW 7602	GBW 7603	GBW 07604	GBW 08513	GBW 08501	CTA VTL-2	INCT TL-1	NIST SRM 1515	NIST SRM 1570a	NIST SRM 1573a	NIST SRM 1572
	Mínimo	Máximo	Strawberry leaves	Tea leaves II	Bush branches and leaves	Bush branches and leaves	Poplar leaves	Tea leaves	Peach leaves	Virginia Tobacco Leaves	Tea Leaves	Apple Leaves	Spinach Leaves	Tomato Leaves	Citrus Leaves
N	18000	25000	20100		12000	15000	25600	28900				22500		30300	
P	1500	3000	2600	4720	830	1000	1680	1480		2204		1590	5180	2160	1300
K	10000	16000	19600	20300	8500	9200	13800	8630	21700	10300	17000	16100	29030	27000	18200
Ca	2000	8000	15300	2490	22200	16800	18100	8000		36000	5820	15260	15270	50500	31500
Mg	1000	3000	3770	1690	2870	4800	6500	2760	4700		2240	2710			5800
S	1500	3000	1740		3200	7300	3500	2220			2470				4070
Si	10300	19000			5800	6000	7100								
B	10	30			34	38	53					27	37,6	33,3	
Cu	6	15		9,48	5,2	6,6	9,3	8,96	10,4	18,2	20,4	5,64	12,2	4,7	16,5
Fe	40	250	818		1020	1020	274	347	431	1083		83		368	90
Mn	25	250	171	704	58	61	45	2170	75,4	79,7	1570	54	75,9	246	23
Mo	0,05	0,2	0,32		0,26	0,28	0,18			2,01		0,094			0,17
Zn	10	50	24	31,9	20,6	55	37	22,6	22,8	43,3	34,7	12,5	82	30,9	29

Nota. Os valores em vermelho encontram-se dentro da faixa das concentrações de macro e micronutrientes na folha de cana-de-açúcar

2.3. Produção de material de referência

A produção de CRMs para diferentes áreas de interesse é baseada nas ISO Guia 30 a 35. Estes documentos apresentam conceitos básicos, preparo e uso de RMs, sistemas da qualidade e princípios estatísticos para avaliar o material produzido. Os produtores de RMs devem ter laboratórios com sistemas da qualidade e metodologias desenvolvidas que permitam determinar a rastreabilidade dos elementos de interesse, assim como pessoas treinadas e qualificadas.

A produção de RMs envolve diferentes etapas e requer planejamento prévio antes do preparo do material. O planejamento avalia os tipos de materiais (matriz, elementos de interesse e concentração), procedimentos de amostragem, quantidade de material coletado, condições de transporte e armazenamento, procedimentos de preparo do material (secagem e moagem), seleção de métodos de medição, número de amostras para os testes de homogeneidade, estabilidade e caracterização química, e os cálculos das incertezas associadas. O número de CRMs produzidos e a validade do material são importantes parâmetros que devem ser considerados para disponibilidade do material em laboratórios de interesse (STOEPLER et al., 2001). A Figura 3 apresenta as etapas gerais necessárias para coleta e preparo de RMs.

Os tipos de materiais comumente utilizados para a produção de RMs são: a) geológicos (minérios, rocha, solo, sedimento, cerâmica, vidro, fósseis); b) ambientais (cinzas, pó, resíduos, lodos e água); c) biológicos (tecidos animais e plantas, alimentos e produtos agrícolas).

Para materiais biológicos, a preparação do RM é uma etapa crucial, devido à representatividade do material (forma química, variação dos elementos e interferentes) e procedimentos de limpeza, secagem e moagem, os quais podem afetar diretamente a homogeneidade e estabilidade do material. Deste modo, nesta etapa é fundamental evitar a degradação do material, perda de componentes voláteis e potenciais problemas de contaminação. A secagem de RMs é comumente realizada em estufa, por liofilização, vácuo ou ar (QUEVAUVILLER; MAIER, 1999).

A umidade residual apresentada em materiais biológicos após a etapa de secagem é um importante parâmetro de estudo para obter a estabilidade desejada, resistência no transporte e armazenamento, evitando-se mudanças biológicas, físicas e químicas (STOEPLER et al., 2001). Em materiais biofarmacêuticos, a umidade residual é um fator crítico e o nível de umidade estabelecido para materiais liofilizados varia de 1% a 5% (KRASUCKA et al., 2012). Já os materiais de referência biológicos, para obtenção da estabilidade desejada devem conter teores de umidade residual de 2 % a 5 % e menor atividade microbiológica. Assim, para a

maioria dos materiais de referência sólidos, é indispensável remover a umidade objetivando boa conservação e durabilidade (STOEPPLE et al., 2001).

Além disso, ter conhecimento do valor da umidade residual de um material é importante para corrigir os dados analíticos, expressando-se os resultados em massa seca. Existem vários procedimentos utilizados para a determinação da umidade residual, ou seja, secagem em estufa, Karl Fisher, espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), dessecador e liofilização (ZHENG et al., 2008, AUSTIN et al., 2013). Procedimentos de esterilização e irradiação podem ser também considerados para evitar a degradação e a instabilidade do material (QUEVAUVILLER; MAIER, 1999; STOEPPLE et al., 2001).

O procedimento de moagem é uma etapa importante no preparo do material de referência. A escolha de um moinho adequado é relevante para a obtenção do tamanho de partícula desejado. Contudo, deve-se evitar o emprego de moinhos que contaminem o material e afetem a composição química em termos de homogeneidade e representatividade do material candidato (FAJGELJ; ZEISLER, 1998). A moagem do material pode ser realizada em moinho criogênico, moinho planetário, moinho de bolas, moinho de rotor, moinho de vento, entre outros.

A distribuição do tamanho de partícula afeta diretamente a composição química, homogeneidade e representatividade de um RM. Ela deve ser apropriada para amostrar uma massa mínima aceitável para que a heterogeneidade do material não comprometa o método de medição. A determinação do tamanho de partícula é realizada por meio de instrumentos de difração laser por dispersão úmida ou seca. Apesar dos cuidados e do esforço colocado na preparação e conservação do material, pode existir um grau de heterogeneidade remanescente no material de referência (FAJGELJ; ZEISLER, 1998; STOEPPLE et al., 2001).

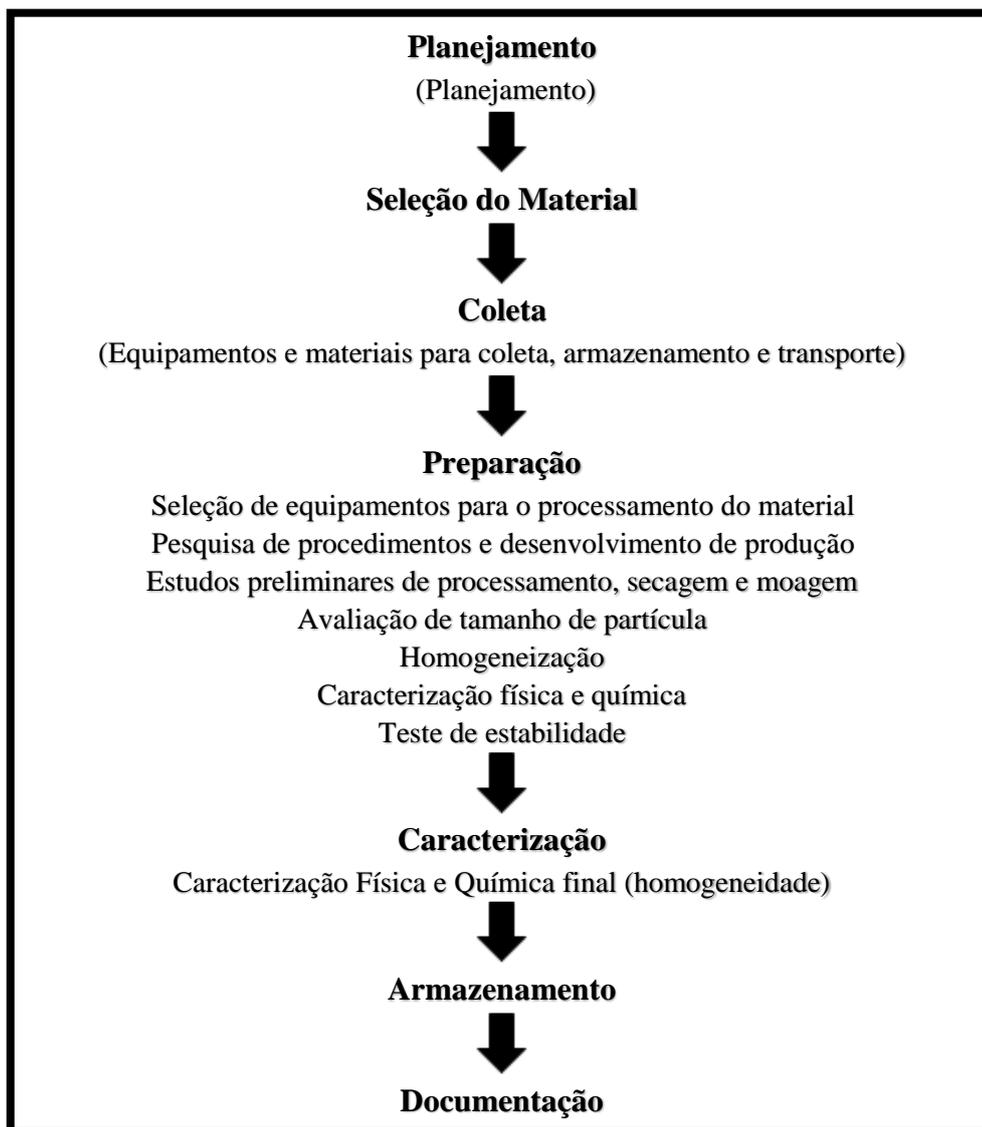


Figura 3. Fluxograma das etapas gerais de coleta e preparação de RMs (STOEPLER et al., 2001)

2.3.1. Homogeneidade

A homogeneidade é uma das mais importantes propriedades junto à composição química para a certificação, na qual o material deve apresentar características aceitáveis. Materiais de referência de matriz natural não são totalmente homogêneos, ainda mais considerando as grandes quantidades de material tomadas para a produção. Assim, estudos envolvendo procedimentos de caracterização física e química devem ser realizados.

A caracterização do material garante as propriedades físico-químicas e a validade dos valores certificados e suas incertezas em análises de amostras ou subamostras. O número de

frascos retirados do lote preparado, selecionados aleatoriamente para essa avaliação, deve ser representativo do número total de frascos (PAUWELS et al., 1998; ISO GUIDE 31, 2000a; STOEPLER et al., 2001).

O teste de homogeneidade é composto pela homogeneidade entre frascos e homogeneidade dentro do frasco, tendo como principal objetivo verificar se há diferença significativa na fração de massa dos elementos de interesse no material em si e entre as unidades do material produzido. De acordo com ISO Guia 35 (2006), normalmente são selecionadas de 10 a 30 unidades para avaliação da homogeneidade entre frascos, e 1 unidade para a homogeneidade dentro do frasco (ISO GUIDE 35, 2006). É recomendável utilizar uma massa mínima durante a análise, com distribuição homogênea das características do material, não afetando a precisão e a exatidão do método (ZEISLER, 1998). Assim, deve ser determinada a massa mínima a ser analisada, em que a homogeneidade é garantida.

Os testes de homogeneidade, em geral, empregam massas maiores que 100 mg, e, para a maioria de casos, não há diferença significativa entre as amostras. Pequenas massas de amostra, entre 1 mg e 10 mg, mostram a variação da composição química devido à distribuição do tamanho de partícula, forma da amostra e geometria (FAJGELJ; ZEISLER, 1998; ZEISLER, 1998). Neste contexto, estudos de micro-heterogeneidade do material utilizando massas menores de 10 mg são realizados, a fim de se avaliar problemas pontuais de contaminação no material de referência candidato (KURFÜRST et al., 1993; QUEVAUVILLER; MAIER, 1999).

A determinação da micro-heterogeneidade de um elemento pode ser efetuada usando as constantes de Ingamells e Kurfürst (STOEPLER et al., 2001).

A constante de amostragem de Ingamells (K_s) é definida pela Equação 1:

$$K_s = R_s^2 \times m \quad (1)$$

- Constante de amostragem (K_s)
- Coeficiente de variação de amostragem (R_s)
- Massa (mg)

A constante de Ingamells (K_s) é expressa em unidade de massa (mg). A incerteza devido à não homogeneidade do material para um intervalo de confiança de 1 % a 8 % é inversamente proporcional à massa de amostra tomada, em que o desvio padrão da amostra diminui com o incremento da massa, observando-se a quantidade ótima a ser amostrada.

O fator de homogeneidade relativa (H_E) introduzido por Kurfürst, baseado na modificação de Ingamells, é definido na Equação 2:

$$H_E = R_S \times \sqrt{m} \quad (2)$$

- Fator de homogeneidade relativa (H_E)
- Desvio padrão relativo (R_S)
- Massa (mg)

2.3.2. Estabilidade

A avaliação de estabilidade dos CRMs é etapa essencial para a certificação do material e requisito exigido da ISO Guia 34 e 35, já que os valores das propriedades devem permanecer constantes durante o tempo de validade do CRM (ISO GUIDE 34, 2000b; ISO GUIDE 35, 2006). Essa avaliação tem como objetivo monitorar a estabilidade do material após a preparação durante períodos específicos de tempo, pois o material preparado pode ser suscetível à degradação por fenômenos como temperatura, luz, oxigênio, umidade e atividade microbológica (LAMBERTY et al., 1998). Condições adequadas de armazenamento do material e o tipo de frasco podem ajudar a diminuir os efeitos de degradação produzidos pela luz e umidade, e o incremento de temperatura que favorece as reações químicas e o crescimento bacteriano.

O teste de estabilidade depende do tipo de material e pode ser realizado a curto e a longo prazo. O teste de estabilidade a curto prazo avalia a degradação esperada do material durante o transporte e recomenda as condições de envio do material após a certificação. O material de referência candidato é submetido a condições extremas de temperatura (+ 40°C) e umidade (100%) por um período de 1 a 2 meses para simular as condições de transporte. A temperatura de + 40°C é escolhida porque estabelece condições ótimas para o crescimento bacteriano. Este teste permite determinar se o material é suficientemente estável, característica exigida para um CRM. O teste de estabilidade a longo prazo avalia o comportamento do material em condições de armazenamento controladas, por períodos de 6 a 12 meses. Este teste permite determinar a validade do material, sendo recomendado pela ISO Guia 35 e organismos produtores de CRMs (NIST e IRMM) a realização de um contínuo monitoramento a fim de verificar as possíveis mudanças das propriedades de interesse do material. O armazenamento do material candidato

é realizado, então, nas temperaturas de - 20 °C e + 20 °C (QUEVAUVILLER; MAIER, 1999; LISINGER et al., 2001; STOEPLER et al., 2001; ISO GUIDE 35, 2006).

2.3.3. Incerteza

De acordo com o VIM (2012), a incerteza é um parâmetro associado ao resultado de medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos aos mensurandos, na qual o mensurando é uma grandeza de medida *i.e.*, concentração, pH, cor, entre outros. A incerteza incrementa a confiabilidade dos resultados de uma medição. As possíveis fontes de incerteza incluem procedimentos de amostragem, condições de armazenamento, efeitos instrumentais (calibração, balança analítica, temperatura), pureza de reagentes, reações químicas incompletas, condições de medição (temperatura de soluções e vidraria volumétrica), efeitos da matriz (recuperação e estabilidade do analito no RM e na amostra), procedimentos e métodos de medição, entre outros. Cada componente contribui de forma separada à incerteza. Quando a incerteza de um componente é expressa em função do desvio padrão, é chamada incerteza padrão. Já em resultados de medição, a incerteza total é conhecida como incerteza combinada (u_c), a qual é definida pela Equação 3:

$$u_c(y(x_1, x_2, x_3 \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1}^n u(y, x_i)^2} \quad (3)$$

onde:

u é a incerteza padrão de cada componente.

A incerteza expandida (U) é utilizada em inúmeras análises químicas, fornecendo valores de mensurandos com um alto intervalo de confiança. A U é expressa de acordo com a Equação 4:

$$U = k \times u_c \quad (4)$$

A constante k é baseada no intervalo de confiança desejado; para intervalos de confiança de 95 %, $k=2$ (EUROCHEM, 2012). Os cálculos de incerteza variam, principalmente, em função da amostra, procedimentos de preparo e análise e, por fim, das técnicas selecionadas para a determinação dos elementos químicos de interesse.

2.4. Técnicas analíticas

A seleção de técnicas analíticas para avaliar homogeneidade e estabilidade de RMs depende da matriz, analitos de interesse, faixa de concentração, preparação da amostra, massa da amostra, precisão das medições e rastreabilidade (IAEA, 2003).

As técnicas analíticas escolhidas devem ser independentes, multielementares, de elevada qualidade metrológica, alta reprodutividade, alta repetitividade e sensibilidade, em que as fontes de incertezas sejam bem definidas e avaliadas experimentalmente. As técnicas utilizadas para a determinação elementar são espectrometria de emissão (AES) e absorção atômica (AAS), espectrometria de massas (MS), análise por ativação neutrônica (NAA) e fluorescência de raios X (XRF). No entanto, os métodos escolhidos e mais utilizados são titulometria, gravimetria e fluorimetria. A maioria das técnicas requer uma etapa prévia de preparação da amostra, que envolve diferentes procedimentos de decomposição do material candidato, à exceção de NAA e XRF. Técnicas nucleares como análise por ativação com raios gama pronto (PGAA) e análise por ativação neutrônica com separação radioquímica (RNAA) são também utilizadas para a determinação de elementos de interesse (STOEPLER et al., 2001; IAEA, 2003).

Para o National Institute of Standards and Technology (NIST), a análise por ativação neutrônica instrumental (INAA) é rotineiramente empregada para determinar mais de 40 elementos em diferentes tipos de RMs como geológicos, botânicos e biológicos. A determinação elementar por INAA independe da forma química e da matriz da amostra, utiliza pequenas quantidades de massa e para a maioria dos elementos determinados é isenta dos efeitos do branco.

Os elementos comumente determinados são Al, Ca, Cl, K, Mg, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, Au, As, Cr, Cd, Br, Ce, Cs, Co, Sc, Gd, La, Rb, Sm, V e W. Entretanto, muitos elementos com baixo número atômico (Z) não podem ser determinados por INAA requerendo outras técnicas nucleares, como PGAA, para complementar as medições químicas (ZEISLER et al., 2003; NIST, 2014). Os elementos mais estudados por PGAA são H, B, C, N, Na, P, Si, S, Cl, K, Ca, Cd, Sm and Gd (ZEISLER et al., 2003; MACKEY et al., 2005).

2.4.1. Análise por ativação neutrônica instrumental

A análise por ativação neutrônica instrumental (INAA) é bastante utilizada para avaliar homogeneidade, estabilidade e certificação de RMs. Trata-se de um método primário de medição (GREENBERG et al., 2011), não destrutivo, de alta qualidade metrológica e elevado

controle sob condições de repetitividade (precisão) e reprodutividade (veracidade), que independe de dissolução de amostra e apresenta incertezas bem definidas.

A INAA baseia-se nas interações de nêutrons com o núcleo de um elemento químico de interesse. O objetivo principal é converter um núcleo estável em um núcleo radioativo, emitindo radiações que podem ser usadas para propósitos analíticos. Os núcleos radioativos, chamados também radionuclídeos, são caracterizados pela constante de decaimento e energia da radiação gama emitida. A avaliação dos radionuclídeos é realizada usando espectrometria de raios gama, a qual permite a identificação qualitativa e quantitativa dos produtos ativados.

Os procedimentos de INAA utilizam uma variedade de sistemas de espectrometria de radiação gama, sendo os principais componentes: 1) sistema de detecção com apropriada eficiência e resolução para discriminar energias próximas; 2) sistemas de analisadores para classificar e contar sinais de pulsos do detector; 3) software para controlar e armazenar dados. A quantificação dos elementos de interesse pode ser realizada por método comparativo de amostras irradiadas com padrões de concentração conhecida ou por calibração. A determinação elementar é realizada por espectrometria de raios gama com detectores de germânio hiperpuro de alta resolução (ZEISLER et al., 2003; GREENBERG et al., 2011). A Equação 5 apresenta os parâmetros experimentais para o cálculo de fração de massa por INAA usando o método comparativo

$$m_{X_{unk}} = m_{X_{std}} \frac{A_{0_{unk}}}{A_{0_{std}}} * R_{\theta} R_{\phi} R_{\sigma} R_{\varepsilon} - \text{branco} \quad (5)$$

$m_{X_{unk}}$: massa do elemento X na amostra

$m_{X_{std}}$: massa do elemento X no padrão

$A_{0_{unk}}$: taxa de contagem corrigida para decaimento na amostra

$A_{0_{std}}$: taxa de contagem corrigida para decaimento no padrão

R_{θ} : razão de abundância isotópica para amostra e padrão

R_{ϕ} : razão de fluxo de nêutrons

R_{σ} : razão de seção de choque efetiva

R_{ε} : razão de eficiência de contagem

Branco

Os componentes individuais das incertezas em INAA advêm das etapas de pre-irradiação, irradiação e espectrometria gama (ZEISLER, 2002). A Equação 6 apresenta as incertezas relacionadas com os procedimentos experimentais em INAA.

$$u_{exp}^2 = u_{hom}^2 + u_c^2 + u_{irr}^2 + u_m^2 \quad (6)$$

- Incerteza devido à homogeneidade (u_{hom})
- Incerteza devido às contagens estatísticas (u_c)
- Incerteza devido à ativação (u_{irr})
- Incerteza devido às medições de espectrometria gama (u_m)
- Incerteza experimental (u_{exp})

A u_c depende da composição da amostra, características de decaimento dos radionuclídeos e parâmetros experimentais. A u_{irr} é dada em função do tempo e modo de irradiação. A u_m é a combinação de incertezas de medição de geometria, aquisição de dados e avaliação de espectros gama.

Para avaliação da homogeneidade, a u_{hom} é mais importante do que a incerteza total experimental. Esta pode ser calculada a partir da combinação da variância total experimental (u_0) e variância analítica (u_a), de acordo com Equação 7:

$$u_{hom} = \sqrt{u_0^2 - u_a^2} \quad (7)$$

A incerteza analítica (u_a) é constituída por incertezas de contagem estatística (u_c), fluxo de nêutrons (u_{fi}), geometria (u_g) e massa (u_w). A u_a é determinada pela variância analítica de cada componente, e dada pela Equação 8:

$$u_a^2 = u_c^2 + u_{fi}^2 + u_g^2 + u_w^2 \quad (8)$$

A contribuição das incertezas de massa e geometria são pequenas se comparadas às outras incertezas associadas.

2.4.2. Análise por ativação com raios gama pronto

A análise por ativação com raios gama pronto (PGAA) é uma técnica nuclear não destrutiva e multielementar, que determina elementos químicos utilizando massas da ordem de μg até grandes quantidades de amostra. Da mesma forma, o tempo de medição por amostra pode variar

de poucos minutos a horas. A presente técnica tem sido utilizada para diferentes tipos de materiais, incluindo plantas, tecido animal, carvão, rochas (LINDSTROM, 1993), minérios, cimento, óleos, petróleo, ouro e água (YANG et al., 2013).

O procedimento é baseado na irradiação contínua das amostras com um feixe de nêutrons. Estes são absorvidos pelos elementos químicos constituintes da amostra e, em seguida, raios gama pronto são emitidos e medidos em um espectrômetro de raios gama de alta resolução. As energias dos raios gama são específicas e identificam cada elemento, enquanto as intensidades dos picos mostram as concentrações (ZEISLER et al., 2003; NIST, 2014). A quantificação dos elementos é feita em função de padrões que são irradiados nas mesmas condições das amostras. O sistema de PGAA é constituído por uma fonte de nêutrons, tubo de feixe colimador, filtro de nêutrons, lentes para focalizar, materiais de blindagem, câmara de amostra e detector de germânio hiperpuro (MOLNÁR, 2004; NIST, 2014). A PGAA é uma técnica complementar à INAA, e ambas são comumente utilizadas para o processo de certificação de materiais de referência, devido à alta sensibilidade e baixas incertezas (LINDSTROM, 1998; BODE et al., 2000).

As fontes de incerteza em PGAA são associadas a absorção e dispersão de nêutrons, variação do fluxo na amostra e padrão, massa de amostra, espectrometria gama, processamento de dados, preparo das amostras e padrões. Para minimizar as incertezas, amostras e padrões devem ser preparados de forma similar em relação a massa, forma e geometria, assim como a composição da matriz deve ser semelhante.

2.4.3. Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) é uma técnica multielementar e sensível, que pode ser utilizada para análise de diversos tipos de amostras. Diferentemente de INAA e PGAA, é necessário realizar uma etapa de decomposição para transformar a amostra sólida em solução e introduzi-la no equipamento. O procedimento mais recomendado para o preparo de amostras é o uso de forno micro-ondas fechado, pois reduz o tempo de digestão da amostra, minimiza os riscos de contaminação e perda de elementos voláteis (MITRA, 2003).

O espectrômetro é composto por um sistema de introdução de amostra, bobina de radiofrequência e tocha, sistema óptico do tipo Echelle e detectores. O princípio da técnica é baseado na emissão de radiação eletromagnética dos átomos quando são submetidos a elevadas temperaturas (10000 K) em um plasma de argônio. O plasma de argônio possui a energia suficiente para atomizar a maioria dos elementos, minimizando os potenciais interferentes

químicos da amostra. A quantificação dos elementos de interesse é feita comparando-se padrões de concentração conhecida com as amostras de interesse. Os comprimentos de onda são específicos para cada elemento e selecionados em função da razão sinal/ruído (BOSS; FREDEEN, 1997). As fontes de incerteza em ICP OES estão relacionadas com pureza de reagentes, incerteza da massa molecular, incerteza dos padrões analíticos, curva de calibração, balança, pipetas volumétricas e equipamento de medição (EUROCHEM, 2012).

2.4.4. Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva

A espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (ED-XRF) é uma técnica instrumental multielementar, rápida, precisa e não destrutiva. Permite a determinação simultânea de vários elementos, desde sódio até urânio, requerendo mínimo preparo de amostra. A ED-XRF tem aplicação em muitas áreas de pesquisa, como desenvolvimento de materiais eletrônicos e veiculares, indústria química, petroquímica, cerâmica, medicina, agricultura e alimentos, estudos ambientais e ligas metálicas (BROUWER, 2010). O princípio da técnica é a irradiação da amostra com raios X emitidos por um tubo de ródio (Rh), resultando raios X característicos emitidos por cada elemento químico componente da amostra, quando devidamente excitada. Esses raios X gerados são detectados por um espectrômetro semicondutor de Si (Li) que tem a capacidade de discriminar raios X de energias próximas (SHIMADZU, 2013).

2.4.5. Método de Kjeldahl

Nitrogênio é um macronutriente para vegetais, presente principalmente no solo e em fertilizantes, e importante para o crescimento da cana-de-açúcar e aumento da produtividade. O método Kjeldahl é um método oficial da Associação Americana de Química de Cereais (AACC), comumente utilizado na determinação indireta de proteínas em diversas amostras biológicas, assim como N em plantas. O tamanho de amostra utilizado depende diretamente da quantidade de N no material. O princípio desse método baseia-se em três etapas fundamentais, ou seja, decomposição ácida, destilação e titulação. A decomposição de amostras é realizada em um bloco digestor utilizando uma solução ácida digestora, catalizadores (Cu_2SO_4 e Na_2SeO_3) e reagentes que incrementam a temperatura de ebulição do ácido (Na_2SO_4) (KALRA, 1998; EMBRAPA, 2006; LABCONCO, 2014). A fração de massa de nitrogênio na amostra é calculada pela Equação 9

$$\% N = \frac{(V_c - V_b) * [\text{ácido}] * (\text{PM}(\text{N})) * 100}{(W * F)} \quad (9)$$

V_c = volume de ácido

V_b = volume de branco

[Ácido] = concentração do ácido

PM (N) = massa molecular do N

W = massa da amostra

F= umidade residual da amostra

A incerteza combinada é calculada em função da pureza dos reagentes, massa molecular, temperatura da solução, bureta volumétrica e incerteza do ácido. A Equação 10 apresenta a incerteza combinada para o N total (ANGLOV, 1999; EUROCHEM, 2012).

$$\left(\frac{u(N_{total})}{N_{total}}\right)^2 = \frac{\left(\frac{u(c)}{\sqrt{n}}\right)^2 + \left(\frac{u(b)}{\sqrt{n}}\right)^2}{(c - b)^2} + \left(\frac{u(N_{ácido})}{N_{ácido}}\right)^2 + \left(\frac{u(a)}{\sqrt{n} \cdot a}\right)^2 \quad (10)$$

a = massa

b = volume do branco

c= volume do ácido

$N_{ácido}$ = concentração do ácido

u (c) = incerteza do volume de ácido

u (b) = incerteza do volume do branco

u (a) = incerteza da massa

u ($N_{ácido}$) = incerteza do ácido

n = repetições

3. MATERIAL E MÉTODOS

A preparação do material de referência de folhas de cana-de-açúcar é constituída de duas etapas fundamentais. A primeira etapa refere-se ao estudo da composição nutricional de folhas de diferentes variedades de cana-de-açúcar, enquanto a segunda etapa envolve a preparação do material de referência usando a variedade mais apropriada, selecionada na primeira etapa.

3.1. Estudo de variedades de cana-de-açúcar

As variedades de cana-de-açúcar foram escolhidas de acordo com uma série de critérios, englobando os dados apresentados no II Encontro de Usuários de Variedades de Cana-de-Açúcar (STAB, 2012), as informações retiradas do documento censo varietal e produtividade (CTC, 2011) e as intenções de plantio da Usina Iracema para o período 2012/13. A Figura 4 mostra os grupos de variedades cultivadas no Estado de São Paulo, observando que as variedades do tipo RB apresentam maior porcentagem em comparação com as variedades SP, CTC e IAC (RIDESA, 2013).

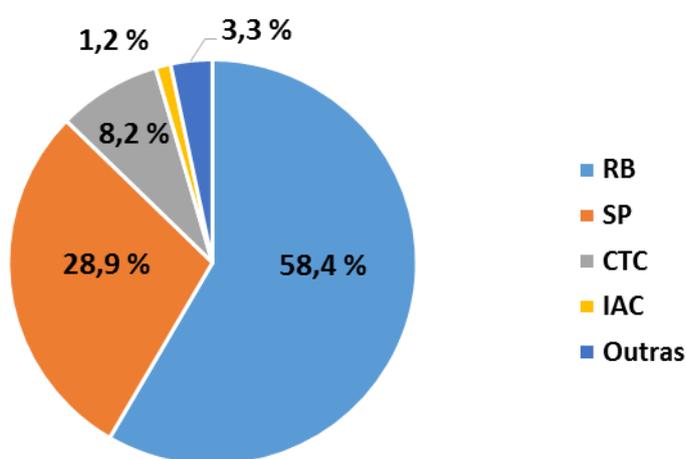


Figura 4. Grupos de variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Estado de São Paulo, safra 2012/13 (RIDESA, 2013)

Apesar do predomínio das variedades RB, o plantio das variedades CTC tem aumentado nos últimos anos devido às características próprias de cada uma delas e adaptação em diferentes ambientes de produção. Assim, foram escolhidas doze variedades de cana-de-açúcar em função de forma de plantio, colheita, perfilhamento, produtividade, período de utilização industrial (P.U.I), sacarose, longevidade, tolerância a seca, brotação de soqueira e sanidade. As variedades de cana-de-açúcar escolhidas foram CTC2, CTC4, CTC11, CTC14, CTC15, CTC17, CTC20,

IACSP955000, RB855156, RB966928, RB965902 e SP832847, que estão apresentadas na Figura 5.



IACSP955000



CTC2



RB966928



CTC20



CTC11



CTC15



SP832847



CTC17



CTC14



RB855156



CTC4



RB965902

Figura 5. Variedades de cana-de-açúcar coletadas na Usina Iracema no período 2012/13

As doze variedades de cana-de-açúcar foram coletadas de canaviais da Usina Iracema, envolvendo áreas nos municípios de Iracemápolis, Limeira, Rio Claro, Cordeirópolis e Santa Gertrudes. Perante a disponibilidade existente, procurou-se manter uniformidade quanto ao tipo de solo. Assim, dez variedades foram coletadas em Latossolo Vermelho, uma variedade em Neossolo Quartzarênico e uma variedade em Podzólico Vermelho. As variedades SP832847 e RB965902 foram coletadas em solos diferentes das demais variedades, já que ambas são melhor adaptadas a ambientes de produção mais restritos (com baixa fertilidade de solo).

Para avaliar a variabilidade da composição nutricional em diferentes condições de solo, fertilização, tratos culturais e idade dos canaviais, foram escolhidas, dentre as doze variedades de cana-de-açúcar, a CTC11 e CTC15, coletadas em três condições de cultivo diferentes. Dessa maneira, procurou-se abranger as variedades mais cultivadas no Estado de São Paulo e ter maior representatividade de amostras para a análise estatística. A Tabela 5 apresenta as principais características das doze variedades de cana-de-açúcar coletadas assim como as três condições de cultivo para as variedades CTC11 e CTC15.

3.1.1. Amostragem de folhas e solos

A amostragem das folhas foi realizada seguindo os métodos recomendados por Vitti e Mazza (2002) e Malavolta (2006), ou seja, tomando-se cana-planta com seis meses depois da germinação e a folha +1 com colarinho visível (TVD). A folha +1 é considerada padrão, já que reflete melhor o estado nutricional da cana-de-açúcar (VITTI; MAZZA, 2002; MALAVOLTA, 2006). Não obstante, existiram algumas dificuldades durante o processo de amostragem, relativas à disponibilidade de todas as variedades de cana-de-açúcar nesse período vegetativo. Por exemplo, a variedade RB855156 foi coletada com 8 meses de idade e a variedade CTC14 foi cana-soca.

O procedimento seguido no campo foi primeiramente delimitar a zona de amostragem fazendo uso de um mapa de variedades fornecido pela Usina. A área plantada de cada variedade amostrada foi constituída, aproximadamente, de 3 a 5 ha. As amostras de folha e solo foram coletadas em zigue-zague, sendo considerado o primeiro ponto amostral a 100 m, desprezando as plantas próximas a estradas e carregadores. Assim, foram coletadas dez amostras de cada variedade, compostas de cem folhas cada uma, sempre tomando a folha +1 de acordo com a numeração do sistema Kuijper (MALAVOLTA, 2006; DINARDO-MIRANDA et al., 2010).

Tabela 5. Principais características das variedades de cana-de-açúcar (RIDESA, 2008; CTC, 2013)

Variedade	Maturação	Tipo de solo	Destaques
CTC2	Média	Latossolo Vermelho	Rusticidade e alta produtividade em solos fracos, longevidade das soqueiras, excelente brotação de soqueiras. Desenvolvimento inicial rápido, colheita mecanizada.
CTC4	Média	Latossolo Vermelho	Produtividade, rusticidade, bom perfilhamento, não isoporiza, colheita mecanizada e boa brotação de socas.
CTC11	Média	Latossolo Vermelho Podzólico Vermelho Cambissolo Háptico	Produtividade e PUI (período útil de industrialização) longo com excelente perfilhamento e fechamento. Alta resposta a maturadores.
CTC14	Tardia	Latossolo Vermelho	Alta produtividade, não floresce, responsiva, tolerância à seca e porte ereto.
CTC15	Média	Latossolo Vermelho Podzólico Vermelho Cambissolo Háptico	Resistente ao estresse hídrico, alta produtividade, desenvolvimento rápido, ampla adaptabilidade.
CTC17	Precoce	Latossolo Vermelho	Alto teor de sacarose, rusticidade, boa resposta a maturadores e desempenho em ambientes de baixo potencial produtivo.
CTC20	Média	Latossolo Vermelho	Produtividade, brotação de soqueiras e PUI longo.
IACSP955000	Tardia	Latossolo Vermelho	Rica, porte ereto, responsiva, plantio e colheita mecanizada e bom perfilhamento.
RB855156	Hiperprecoce	Latossolo Vermelho	Produtividade média, ótima brotação de soqueiras, alto teor de sacarose. Resistente a doenças, florescimento e brotação no plantio.
RB966928	Precoce	Latossolo Vermelho	Alta produtividade, alto teor de sacarose, tolerante às principais doenças e raramente floresce e boa quantidade de toneladas de cana por hectare (TCH).
RB965902	Média	Podzólico Vermelho	Alta produtividade e não floresce.
SP832847	Média	Neossolo Quartzarênico	Longevidade em ambiente restritivo e boa quantidade de toneladas de cana por hectare (TCH)

Com a finalidade de avaliar a fertilidade do solo, foram coletadas dez amostras de solo dentro da zona de amostragem delimitada para cada variedade de cana-de-açúcar, compostas de três subamostras da profundidade de 0 a 40 cm. No total, foram coletadas 160 amostras de folhas de cana-de-açúcar e 160 amostras de solo.

Outro fator importante considerado para o início das coletas de folhas de cana-de-açúcar refere-se às condições climáticas. A cultura de cana-de-açúcar sofre influência do clima ao longo de todo o ciclo vegetativo, a temperaturas abaixo de 25 °C, o crescimento da cana é lento, entre 30-34 °C é ideal e acima de 35 °C torna-se também lento. Por outro lado, a disponibilidade de uma quantidade apropriada de água é importante para o crescimento da cana-de-açúcar, já que uma redução pode ocasionar estresse hídrico e alterar diretamente o metabolismo e composição nutricional da planta (WIEDENFELD, 2000; DINARDO-MIRANDA et al., 2010).

A Figura 6 apresenta as temperaturas mínima e máxima e a precipitação durante 2012 e início de 2013, observando-se que em julho e agosto houve um período praticamente sem chuvas. Para coletar amostras das plantas em pleno estágio de vegetação, esperou-se um mês após o início das chuvas para começar as coletas. Assim, as coletas se iniciaram em outubro de 2012 estendendo-se até fevereiro de 2013.

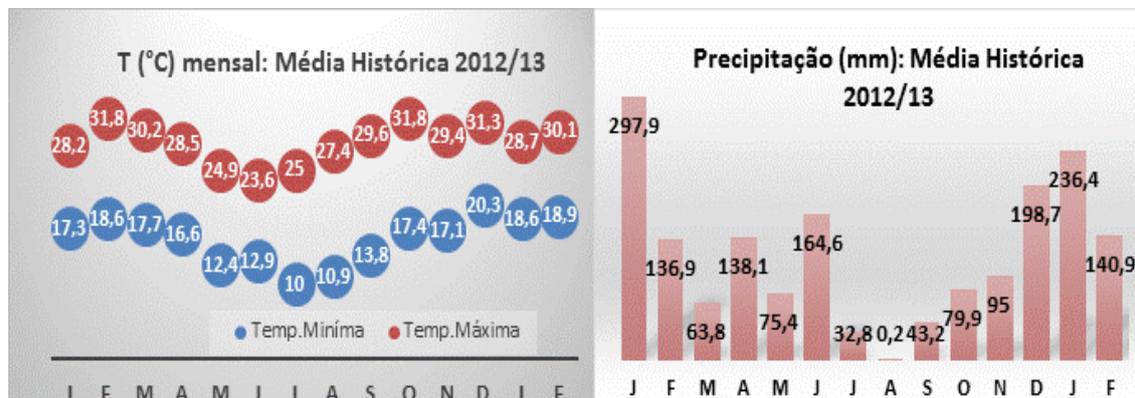


Figura 6. Condições climáticas durante 2012 e início de 2013 na Usina Iracema

3.1.2. Preparação das amostras de cana

A preparação das amostras foi realizada de acordo com as recomendações para avaliação nutricional das folhas de cana-de-açúcar. As folhas (+1) coletadas foram divididas em três partes, utilizando apenas 30 cm do terço médio, desprezando-se a nervura central (VITTI; MAZZA, 2002; MALAVOLTA, 2006). A amostra laboratorial obtida foi lavada com água deionizada e seca em estufa com circulação mecânica de ar, modelo 320E (Fanem, Brasil)

a 50 °C durante 72 h. O teor de umidade obtido nas folhas de cana-de-açúcar variou entre 60 % e 70 %.

Cada amostra seca, com cerca de 40 g, foi moída em dois tipos de moinho, pois dada a natureza fibrosa das folhas não foi possível obter material com granulometria apropriada utilizando apenas um equipamento. Um moinho de facas modelo Grindomix GM 200 (Retsch, Alemanha) foi utilizado em uma pré-moagem para reduzir a amostra de folha para partículas com tamanho aproximado menor que 1 mm. Em seguida, um moinho de rotor modelo Pulverisette 14 (Fritsch, Alemanha), com peneira de 80 µm, foi utilizado para cominuição das amostras, tendo em vista que o tamanho reduzido das partículas é um fator importante para a homogeneidade na análise de amostras sólidas (ZEISLER, 1998). A Figura 7 ilustra o procedimento seguido para a coleta e o preparo das amostras de folhas de cana-de-açúcar.



Figura 7. Etapas de coleta e preparo de amostra de folhas de cana-de-açúcar

Para adequada preservação, as amostras moídas foram acondicionadas em frascos de polietileno organizados em caixas plásticas contendo sílica, sendo armazenadas em temperatura aproximada de 20 °C. Nesse ponto, as amostras estavam prontas para dar continuidade às análises, visando à determinação de elementos químicos de interesse.

3.1.3. Determinação da umidade residual

Porções de 1 g de amostra das 12 variedades de folhas de cana-de-açúcar, previamente secas e moídas, foram pesadas em triplicata, colocadas em cadinhos de porcelana e mantidas em estufa a 105 °C, até peso constante. Os valores da umidade residual foram obtidos pela diferença de massas da amostra, antes e depois da secagem em estufa. A umidade residual dos materiais de referência certificados utilizados foi determinada de acordo com os procedimentos estabelecidos nos respectivos certificados:

- SRM 1515: secagem em liofilizador por 24 h
- SRM 1573a: secagem em liofilizador por 24 h
- SRM 1570a: secagem em liofilizador por 24 h
- INCT-OBTL-5: secagem em estufa a 75°C por 30 h

3.1.4. Determinação de macronutrientes e micronutrientes

Os macronutrientes e micronutrientes foram determinados empregando-se análise por ativação neutrônica instrumental (INAA) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). A determinação de nitrogênio foi feita pelo método de Kjeldahl, enquanto enxofre e silício foram determinados por espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (ED-XRF).

3.1.4.1. Análise por ativação neutrônica instrumental

A análise de ativação neutrônica instrumental (INAA) foi escolhida para avaliação do estado nutricional das plantas de cana-de-açúcar, considerando sua característica metrológica de método primário de medição (BODE et al., 2000; BODE et al., 2009; GREENBERG et al., 2011).

Seis variedades foram analisadas, ou seja, CTC4, CTC15, CTC17, CTC20, IACSP955000 e RB966928. Porções analíticas de 200 mg das amostras previamente moídas foram pesadas em duplicata e colocadas diretamente em cápsulas de polietileno de alta densidade e de elevada pureza, fabricadas pela Posthumus Products, Beverwijk, Holanda, especialmente para irradiação com nêutrons. As amostras foram distribuídas em seis séries (SE, SF, SG, SH, SS, ST) para irradiação. Para o controle da qualidade do procedimento analítico, foram incluídos três materiais de referência certificados (CRMs) em cada série de amostras:

SRM 1515 (*folhas de maçã*) e SRM 1570a (*folhas de espinafre*), produzidos pelo National Institute of Standards and Technology (NIST), Estados Unidos, e INCT-OBTL-5 (*folhas de tabaco*), produzido pelo Institute of Nuclear Chemistry and Technology (INCT), Polônia.

Cápsulas vazias (branco analítico) também foram irradiadas junto com as amostras, de modo a detectar elementos químicos interferentes. Elementos como Br, Cr, Na e Zn são encontrados nas cápsulas em concentrações variáveis de 0,2 a 2,5 mg/kg, sendo necessária a correção das concentrações desses elementos nas amostras. Durante o encapsulamento, porções de 500 mg das amostras e dos materiais de referência certificados foram retiradas para a determinação da umidade, permitindo expressar os resultados em massa seca.

As amostras e CRMs foram irradiados com fluxo de nêutrons térmicos da ordem de $9 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a $11 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por período de 4 h no reator nuclear de pesquisa IEA-R1 do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Comissão Nacional de Energia Nuclear (IPEN/CNEN), São Paulo. Como monitores de fluxo de nêutrons térmicos, foram empregados fragmentos de uma liga de Ni-Cr com frações de massa estabelecidas desses elementos (FRANÇA et al., 2003), com massa aproximada de 10 mg, intercalados entre as cápsulas de polietileno.

A medição da atividade induzida foi realizada no Laboratório de Radioisótopos (LRi/CENA/USP) por meio de dois detectores de germânio hiperpuro do tipo coaxial com 50% e 55% de eficiência relativa (1332 keV, ^{60}Co). As medições da atividade das amostras e CRMs ocorreram aos 4, 7, 15 e 30 dias de decaimento, com respectivos tempos de contagem de 15 min, 30 min, 1 h e 2 h.

Após a deconvolução dos espectros de radiação gama, foram calculadas as frações de massa dos elementos químicos nas amostras e nos materiais de referência certificados por método de padronização k_0 a partir do pacote computacional Quantu (BACCHI et al., 2003). Os valores de fração de massa foram corrigidos para emissão de resultados em massa seca.

3.1.4.2. Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

ICP OES foi utilizada como técnica complementar da INAA para avaliação nutricional de folhas de cana-de-açúcar. Esta técnica requer uma etapa prévia de decomposição para transformar a amostra sólida em solução para ser introduzida no equipamento.

O processo de digestão de amostra de folhas de cana-de-açúcar foi realizado em um forno micro-ondas fechado com cavidade Ethos 1600 (Milestone, Itália). Esse forno micro-ondas possui um rotor de 10 posições (PTFE), equipado com sensor de temperatura no vaso de

referência para o controle durante o programa de aquecimento. A potência máxima foi de 1200 W e temperatura (IR) de 260 °C.

As amostras digeridas correspondem a doze variedades, ou seja, CTC2, CTC4, CTC11, CTC14, CTC15, CTC17, CTC20, IACSP955000, RB855156, RB966928, RB965902 e SP832847. Além disso, as variedades CTC11 e CTC15, coletadas em três condições de cultivo diferentes, *i.e.*, Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV), foram também digeridas. Massas de 250 mg de amostra e três materiais de referência certificados, *i.e.*, SRM 1515 (*folhas de maçã*), INCT-OBTL-5 (*folhas de tabaco*) e SRM 1573a (*folhas de tomate*), foram pesadas em balança analítica modelo AE 200 (Mettler Toledo).

A digestão das amostras foi realizada em triplicata, utilizando mistura oxidante diluída de 6 mL de HNO₃ 20% v/v e 2 mL de H₂O₂, sendo o volume final da solução completado até 15 mL. O branco analítico consistiu da mistura oxidante sem a presença da amostra. Na Tabela 6, observa-se o programa de aquecimento utilizado para a digestão das amostras em forno micro-ondas, sistema fechado.

Tabela 6. Programa de aquecimento utilizado para digestão de folhas de cana-de-açúcar

Etapa	Tempo (min)	Potência (w)	t1 (°C)	t2 (°C)
1	15	1000	160	106
2	5	1000	220	140
3	15	1000	220	140
4	10	0	0	0

Foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (Perkin Elmer, Optima 8300) com configuração axial e radial, equipado com um sistema óptico do tipo Echelle e dois detectores de estado sólido (SCD). Conseguiu-se otimizar as condições do equipamento para dez elementos essenciais (B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P e Zn) presentes nas amostras de folhas de cana-de-açúcar. O gás de formação de plasma utilizado foi argônio 99,998 % v/v, responsável por gerar um plasma estável e quimicamente inerte.

A escolha do melhor comprimento de onda a ser empregado nas determinações foi realizada por meio de uma varredura da amostra, material de referência certificado e branco analítico previamente digeridos. Compararam-se os comportamentos dos sinais de emissão com aqueles obtidos com soluções analíticas de referência de B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P e Zn (5 mg L⁻¹) preparadas em 8 % v/v de HNO₃. Os melhores comprimentos de onda foram

escolhidos considerando-se a maior razão sinal/ruído. Os parâmetros instrumentais aplicados estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros instrumentais para determinação de macronutrientes e micronutrientes em folhas de cana-de-açúcar por ICP OES

Potência de radiofrequência (W)	1300		
Nebulizador	Fluxo cruzado		
Câmara de nebulização	Scott		
Fluxo de gás externo	8 l min ⁻¹		
Fluxo de gás intermediário	0,2 l min ⁻¹		
Fluxo de gás de nebulização	0,6 l min ⁻¹		
Tempo de integração:	5 s		
Comprimentos de onda (nm): Ca (II) = 422,673	K (I) = 766,490	Mg (I) = 285,213	
(I) linha atômica	Cu (I) = 324,752	Fe (II) = 259,939	B (I) = 249,678
(II) linha iônica	Mn (II) = 257,610	Mo (II) = 284,823	Zn (I) = 206,200
	P (I) = 213,617		

3.1.4.3. Método de Kjeldahl

As amostras digeridas correspondem a doze variedades, ou seja, CTC2, CTC4, CTC11, CTC14, CTC15, CTC17, CTC20, IACSP955000, RB855156, RB966928, RB965902 e SP832847. Também foram digeridas as variedades CTC11 e CTC15, cultivadas em três diferentes tipos de solo, *i.e.*, Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV).

Porções analíticas de 100 mg de amostras e CRMs (SRM 1515, SRM 1570a e SRM 1573a) foram pesadas em triplicata em balança analítica modelo AE 200 (Mettler Toledo) e colocadas em tubos de vidro. A decomposição de amostras e CRMs foi realizada em bloco digestor (Solab Científica), utilizando 5 mL de solução ácida digestora composta de H₂SO_{4(c)}, Cu₂SO₄ e Na₂SeO₃ e Na₂SO₄. O branco analítico consistiu na solução ácida digestora sem a presença da amostra. Na Tabela 8, observa-se o programa de aquecimento utilizado para a decomposição das amostras em bloco digestor.

Após a decomposição da amostra a 350°C (2 h), é necessária uma etapa de limpeza dos tubos devido às porções de amostra que ficam retidas na parede do tubo sem reagir com a solução digestora. A solução final obtida foi sulfato de amônio.

Tabela 8. Programa de aquecimento utilizado para digestão de folhas de cana-de-açúcar em bloco digestor

Etapa	Tempo (min)	T (°C)
1	30	100
2	30	200
3	120	350
4	20	350

Para a destilação, as amostras e CRMs obtidos foram diluídos de 1:2 usando 10 mL de água deionizada e colocados no destilador de nitrogênio (Solab Científica). Uma alíquota de 20 mL de uma solução de NaOH (11N) foi adicionada à solução digerida para converter NH_4^+ a NH_3 , seguido por aquecimento até ebulição e condensação do gás NH_3 . Em seguida, adicionaram-se 5 mL de solução de ácido bórico (H_3BO_3) com uma mistura de indicadores vermelho de metila e verde de bromocresol em frasco Erlenmeyer, que foi utilizado para receber o gás condensado de NH_3 e formar um complexo. Na titulação, uma solução de H_2SO_4 0,02M foi utilizada para quantificar o NH_3 recebido no frasco Erlenmeyer. A solução de H_2SO_4 0,02M foi padronizada usando uma solução de hidroximetil aminometano (THAM) 0,03 M.

3.1.4.4. Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva

As amostras de folhas correspondem a doze variedades de cana-de-açúcar, ou seja, CTC2, CTC4, CTC11, CTC14, CTC15, CTC17, CTC20, IACSP955000, RB855156, RB966928, RB965902 e SP832847, assim como duas variedades, CTC11 e CTC15, cultivadas em três diferentes tipos de solo, Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV).

Porções analíticas de aproximadamente 500 mg das amostras foram pesadas em triplicata e prensadas utilizando 15 toneladas de pressão durante 5 min. Passaram pelo mesmo procedimento seis materiais de referência certificados, *i.e.*, ERM CD281 (*centeio*), INCT-OBTL-5 (*folhas de tabaco*), GB W07603 (*folhas de árvore*), SRM 1515 (*folhas de maçã*), SRM 1570a (*folhas de espinafre*) e SRM 1573a (*folhas de tomate*).

A curva de calibração foi realizada utilizando pastilhas de aproximadamente 500 mg de 23 variedades de folha de cana-de-açúcar (CTC1 a CTC18, IAC873396, IAC936006,

RB855453, RB867515 e SP813250) com concentrações conhecidas, determinadas por ICP OES em um estudo anterior realizado por Souza (SOUZA, 2012).

Para a determinação de enxofre e silício, foi utilizado um espectrômetro de fluorescência de raios X por energia dispersiva, EDX 720 (Shimadzu, Japão). A Tabela 9 mostra as condições de trabalho otimizadas para a determinação dos dois elementos.

Tabela 9. Parâmetros instrumentais otimizados para determinação de enxofre e silício de folhas de cana-de-açúcar por ED-XRF

Faixa elementar	Na11 – U92
	Alvo Rh
	Tensão do tubo: 50 kV
Gerador de raios X	Corrente do tubo: 56 μ A
	Resfriamento: Ar
	Colimador: 5 mm
Câmara de análise	Vácuo (30 Pa)
	Trocador automático: turret de 16 amostras
Tempo de medição	300 s
Tempo morto	< 30%

3.1.5. Determinação de cinzas

A determinação de cinzas é aplicada em diferentes produtos de origem animal, vegetal, mineral, rações e concentrados. O princípio do método é a calcinação da amostra em forno tipo mufla, para eliminar a matéria orgânica. Por diferença de pesagem entre a massa da amostra e a massa do resíduo após queima, encontra-se o teor das cinzas (EMBRAPA, 2005).

A determinação de cinzas foi realizada nas doze variedades de folhas de cana-de-açúcar, ou seja, CTC2, CTC4, CTC11, CTC14, CTC15, CTC17, CTC20, IACSP955000, RB855156, RB966928, RB965902 e SP832847. Duas variedades, CTC11 e CTC15, em três diferentes tipos de solo foram também analisadas.

Massas de 1 g de amostra foram pesadas em triplicata em cadinhos de porcelana, sendo levadas a um forno tipo mufla a 105°C por 30 min e a 300°C por 30 min (pré-queima), aumentando lentamente a temperatura até 550 °C e deixando nesta temperatura por 4 h. Após o procedimento de queima e resfriamento da mufla até aproximadamente 100°C, as amostras foram transferidas para dessecador, onde permaneceram por 1 h, sendo então pesadas. Por

diferença entre a massa inicial da amostra e a massa final do resíduo, foi calculada a porcentagem de cinzas.

3.2. Produção do material de referência de folhas de cana-de-açúcar

A variedade selecionada para a preparação do material candidato foi RB966928. A escolha baseou-se nos resultados obtidos da primeira etapa do projeto, principalmente os baixos coeficientes de variação de amostragem em campo (< 30%), níveis de nutrientes e Si adequados para a produção de cana-de-açúcar e as características agrônômicas da variedade. Ressalta-se que a variedade RB966928 é a segunda mais plantada no estado de São Paulo e a quarta mais plantada no Brasil (GIACOMINI et al., 2013).

A produtividade da variedade de cana-de-açúcar escolhida depende principalmente do ambiente de produção, o qual é definido em função de água disponível, textura, fertilidade e profundidade do solo. Nesse sentido, o ambiente de produção da variedade RB966928 é do tipo A, considerado de alta produtividade.

3.2.1 Coleta do material

A amostragem das folhas foi realizada seguindo os métodos recomendados por Vitti e Mazza (2002) e Malavolta (2006). A cana da variedade RB966928 amostrada foi plantada em Latossolo Vermelho, em novembro de 2013, ocupando uma área total de 81 ha, na Fazenda Paraíso, Iracemápolis, da Usina Iracema. As coletas de folhas de cana-planta com cinco meses de idade foram realizadas em três dias no mês de abril de 2014.

O primeiro procedimento seguido no campo foi delimitar a zona de amostragem fazendo uso de um mapa de variedades fornecido pela Usina. A área selecionada para amostragem de folhas foi uma gleba de 11,86 ha (Figura 8).

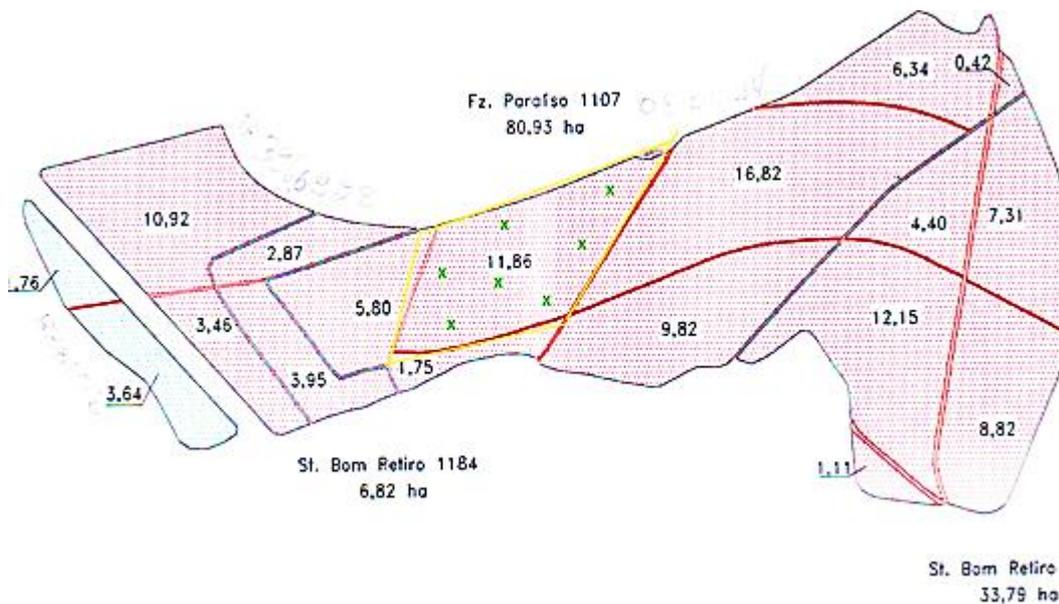


Figura 8. Mapa da variedade RB966928 cultivada em Latossolo Vermelho, com destaque para a gleba de 11,86 ha, onde foi realizada a amostragem em sete pontos, identificados com “x”

Para otimizar as condições de amostragem e representatividade da amostra, foram considerados sete pontos amostrais dentro da gleba. As amostras de folhas foram coletadas em zigue-zague, deixando uma bordadura de 100 m, desprezando-se as plantas próximas a estradas e carreadores. Seguindo esse procedimento, foram coletadas 48 sacolas, compostas de aproximadamente 400 folhas cada uma, sempre tomando apenas a terceira folha a partir do cartucho (Folha +1). No total, foram coletadas aproximadamente 20 mil folhas de cana-de-açúcar para a preparação do material, equivalente a cerca de 90 kg (Figura 9). Com a finalidade de avaliar a fertilidade do solo do talhão, foram coletadas três amostras de solo, compostas de três subamostras da profundidade de 0 a 40 cm.

3.2.2 Preparação do material

As folhas (+1) coletadas foram dobradas na metade e cortadas aproximadamente de 10 a 15 cm de comprimento da dobra das folhas. Dessa forma, a secção total do terço médio utilizada foi de 20 - 30 cm. Foram retiradas manualmente as nervuras das folhas, obtendo-se uma quantidade total de 35 kg de folhas sem nervura, as quais foram armazenadas e congeladas a uma temperatura de -20°C para preservação. A Figura 10 ilustra o processo de obtenção do material.



Figura 9. Fotografias da gleba plantada com a variedade RB966928 que foi amostrada para produção do candidato a material de referência



Figura 10. Sequência de procedimentos para obtenção de folhas de cana-de-açúcar sem nervuras

3.2.3. Secagem

Foram avaliados procedimentos de secagem por estufa e liofilização. Amostras de sacrifício de folhas de cana-de-açúcar foram secas em estufa a 50 °C e também liofilizadas, sendo observadas melhores características físicas no material liofilizado. Dada a volumosa quantidade de material, a secagem foi realizada em empresa liofilizadora de alimentos cuja qualidade dos serviços já havia sido comprovada anteriormente. O procedimento de secagem envolveu pré-congelamento de amostras e liofilização durante 72 h. O teor de umidade do material candidato foi de 70 %. Nesse sentido, a quantidade de material liofilizado obtido para a produção do material candidato foi de aproximadamente 10 kg de matéria seca.

3.2.4. Moagem

As folhas de cana-de-açúcar constituem-se de material difícil de moer devido ao alto teor de sílica e fibras, principalmente lignina, presentes em sua composição. Assim, foram realizados vários testes de moagem do material obtido, procurando-se otimizar as condições para obter tamanhos de partículas menores, assim como um material final mais homogêneo.

Foram utilizados três tipos de equipamento para moagem. Um moinho de facas modelo Grindomix GM 200 (Retsch, Alemanha) foi utilizado em uma pré-moagem para reduzir a amostra de folha a partículas com tamanho menor que 1 mm. Em seguida, foram avaliados dois tipos de moinho para a cominuição do material obtido, ou seja, um moinho de rotor modelo Pulverisette 14 (Fritsch, Alemanha), com peneira de 80 µm, e um moinho de bolas modelo PM 400 (Retsch, Alemanha). A Tabela 10 apresenta as características dos moinhos utilizados (FRITSCH, 2014; RETSCH, 2014).

Tabela 10. Características dos moinhos utilizados na produção do material candidato

Moinho	Capacidade	Características	Considerações
Facas	500 mL	Faca de titânio e copo de polietileno	Aceita alimentação em grandes pedaços (> 1cm), gera material com partículas grandes e heterogêneas no tamanho
Rotor	Alimentação contínua	Rotor e peneira de titânio	Exige alimentação com pedaços menores que 1 cm, gera material fino, dependendo da peneira utilizada
Bolas	250 mL	Câmara e bolas de alumina	Exige alimentação com pedaços menores que 1 cm, gera material fino, dependendo do tempo de processamento

A escolha do moinho para a cominuição foi baseada na distribuição do tamanho de partículas do material obtido. Foram realizados testes com folhas secas em estufa e liofilizadas. Além disso, foi avaliado o uso de peneiras de nylon com aberturas de 250 μm e 100 μm com a finalidade de obter um material mais homogêneo e de distribuição uniforme. A Tabela 11 apresenta o programa de moagem utilizado para folhas de cana-de-açúcar. As amostras A, B, C e D correspondem a folhas secas em estufa e as amostras E, F e G correspondem a folhas liofilizadas. Os procedimentos avaliados foram:

- a) Amostra seca em estufa e processada em moinho de facas
- b) Amostra seca em estufa, processada em moinho de facas e peneirada em nylon de 250 μm
- c) Amostra seca em estufa, processada em moinho de facas e moinho de rotor, peneirada em nylon de 250 μm
- d) Amostra seca em estufa, processada em moinho de facas e moinho de rotor, peneirada em nylon de 100 μm
- e) Amostra liofilizada, processada em moinho de facas e moinho de rotor, peneirada em nylon de 100 μm
- f) Amostra liofilizada, processada em moinho de facas e moinho de bolas
- g) Amostra liofilizada, processada em moinho de facas e moinho de bolas, peneirada em nylon de 100 μm

Tabela 11. Programa de moagem de folhas de cana-de-açúcar

Amostra	Moinho		Ciclos	Tempo	Velocidade	Peneira		
					(rpm)	(μm)		
A	Facas		6	20 s	10 000	--	--	--
B	Facas		6	20 s	10 000	--	--	250
C	Facas	Rotor	3 (F)	20 s	10 000	--	--	250
	(F)	(R)	1 (R)	3 min	12 000			
D	Facas	Rotor	3 (F)	20 s	10 000	80	100	--
	(F)	(R)	1 (R)	3 min	12 000	(R)		
E	Facas	Rotor	2 (F)	20 s	10 000	80	100	--
	(F)	(R)	1 (R)	3 min	12 000	(R)		
F	Facas	Bolas	2 (F)	20 s	10 000			
	(F)	(B)	1 (B)	5 mim	400			
			2 (B)	20 mim	300			
G	Facas	Bolas	2 (F)	20 s	10 000		100	
	(F)	(B)	1 (B)	5 mim	400			
			2 (B)	20 mim	300			

Após a moagem das amostras, foi realizada a análise do tamanho de partículas por difração laser, em equipamento Analysette 22 (Fritsch, Alemanha), com dispersão úmida. Foi utilizada água como meio dispersante, havendo auxílio de ultrassom para desfazer os aglomerados das amostras. A partir dos tamanhos de partículas encontrados para os diferentes programas de moagem do material, foram estabelecidas as seguintes condições para a moagem do material de referência candidato:

- pré-moagem em moinho de facas, dois ciclos de 20 s a 10,000 rpm
- cominuição em moinho de bolas, um ciclo de 5 min a 400 rpm, seguido de dois ciclos de 20 min a 300 rpm, com rotação inversa a cada 5 min
- passagem em peneira de nylon com abertura de 100 μm

A quantidade total de material moído de 8,27 kg, foi misturada e homogeneizada em uma bombona plástica de 50 L. Após a homogeneização do material, foram colhidas três porções para determinar a distribuição do tamanho de partícula do material candidato produzido.

3.2.5. Armazenamento

O armazenamento é outra etapa importante no preparo do material candidato. Os frascos utilizados devem ser inertes à matriz e aos elementos de interesse, evitando a interação entre o material e o frasco e a possibilidade de contaminação do material candidato (QUEVAUVILLER; MAIER, 1999). Sendo assim, foram avaliados frascos de vidro e de plástico. Frascos de vidro são amplamente usados em diferentes áreas, comumente na indústria farmacêutica, por serem materiais neutros de alta resistência e pouco porosos. Não obstante, esse tipo de frasco é composto, principalmente, de óxidos de silício e boro e existe a possibilidade de contaminação do material com esses dois elementos de interesse. Nesse sentido, foram escolhidos frascos de plástico PET âmbar de 50 mL, material composto de uma resina termoplástica de teraftalato de polietileno, leve e de alta resistência mecânica e química.

No total, foram obtidos 410 frascos de material de referência candidato, contendo aproximadamente 20 g cada. Para adequada preservação, os frascos foram organizados em caixas plásticas contendo sílica, sendo acondicionadas em temperatura aproximada de 20 °C. A Figura 11 apresenta o material de referência candidato já nos frascos.



Figura 11. Material de referência de folhas de cana-de-açúcar produzido, pronto para caracterização química

Para controlar a degradação microbiológica e conservar o material de referência candidato em melhores condições, foram selecionados 4 frascos (207, 208, 209 e 210) para testes de esterilização usando diferentes doses de radiação gama (10 kGy, 15 kGy, 20 kGy e 25 kGy) de uma fonte de ^{60}Co na CBE - Companhia Brasileira de Esterilização, Cotia, SP. A seleção da dose adequada foi dada em função das mudanças das características físicas e químicas do material. Assim, o material foi irradiado com uma dose mínima de 15 kGy e máxima de 25 kGy.

Em seguida, foram selecionados frascos para realizar caracterização física (distribuição do tamanho de partícula, teor de umidade residual e cinzas) e química inicial (homogeneidade, micro-heterogeneidade e massa mínima), testes de estabilidade do material a curto e longo prazo e caracterização química final.

Foram selecionados 4 frascos para o teste das doses de radiação, 11 frascos para o teste de homogeneidade, 18 frascos para os testes de estabilidade a curto e longo prazo, 6 frascos para estudos de intercomparação e 12 frascos para a caracterização química final do material (Figura 12).

Amostras

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
401	402	403	404	405	406	407	408	409	410										

Homogeneidade entre frascos
 Homogeneidade dentro do frasco
 Estabilidade
 Teste de irradiação gama
 Caracterização final

Figura 12. Frascos selecionados para testes de irradiação gama, homogeneidade, estabilidade e caracterização final do material candidato

3.2.6. Estudo de homogeneidade

Este estudo foi dividido em avaliação de massa mínima e homogeneidade dentro do frasco e entre frascos, empregando-se INAA e método de Kjeldahl. A avaliação da micro-heterogeneidade do material foi realizada por INAA.

3.2.6.1. Estudo da massa mínima

Para este estudo, realizado de acordo com a ISO Guia 35, foram tomadas dez porções analíticas de um mesmo frasco n° 211 para quatro massas distintas (10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg). Assim, foi possível determinar a massa mínima de amostra a ser utilizada, verificar a repetitividade e a variação da fração de massa dos elementos de interesse dentro do frasco.

a. Análise por ativação neutrônica instrumental

As 40 porções analíticas foram pesadas diretamente em cápsulas de polietileno de alta densidade e de elevada pureza, fabricadas pela Posthumus Products, Beverwijk, Holanda, especialmente para irradiação com nêutrons. Em seguida foram distribuídas em duas séries analíticas (TJ e TK). Para o controle da qualidade do procedimento de medição, foram incluídos três materiais de referência certificados em cada série: SRM 1515 (*folhas de maçã*), SRM 1570a (*folhas de espinafre*) e INCT-OBTL-5 (*folhas de tabaco*). Cápsulas vazias (branco analítico) também foram irradiadas junto com as amostras, de modo a detectar elementos químicos interferentes constituintes do polietileno (FRANÇA et al., 2003). A Figura 13 mostra o preparo do material de referência candidato e dos CRMs utilizados para a análise por INAA.

Amostras e CRMs foram irradiados com fluxo de nêutrons térmicos da ordem de $10 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a $13 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por período de 4 a 8 h no reator nuclear de pesquisa IEA-R1 do IPEN/CNEN, São Paulo. Como monitores de fluxo de nêutrons térmicos, foram empregados fragmentos de aproximadamente 10 mg de liga de Ni-Cr com frações de massa conhecidas desses elementos (FRANÇA et al., 2003), intercalados entre as cápsulas de polietileno. A medição de cada elemento de interesse foi realizada usando o mesmo procedimento da Seção 3.1.4.1.

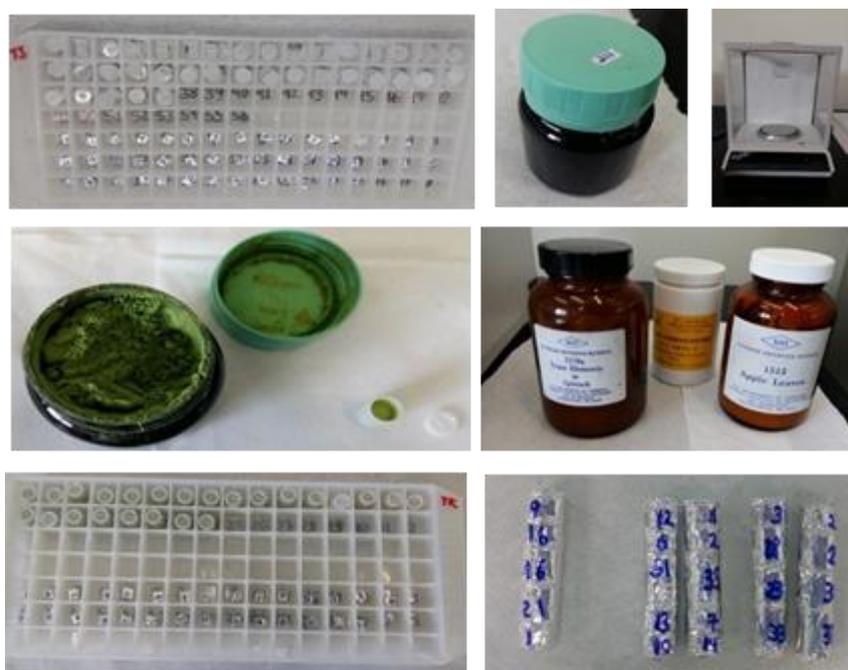


Figura 13. Preparação do material de referência candidato de folhas de cana-de-açúcar para irradiação com nêutrons

b. Método de Kjeldahl

Dez porções analíticas de 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg do frasco n° 211 foram pesadas em uma balança analítica modelo AE 200 (Mettler Toledo) e colocadas em tubos de vidro. Essas quatro massas diferentes permitiram avaliar a massa mínima a ser utilizada. Para o controle da qualidade analítica, foram utilizados três materiais de referência certificados do NIST, ou seja, SRM 1515 (*folhas de maçã*), SRM 1570a (*folhas de espinafre*) e SRM 1573a (*folhas de tomate*), pesados em triplicata. Estes CRMs foram escolhidos porque apresentam valores de referência de N usando o método de Kjeldahl. O procedimento de determinação de N total foi o mesmo utilizado no estudo de variedades da Seção 3.1.4.3.

3.2.6.2. Homogeneidade dentro do frasco

Neste estudo, realizado de acordo com a ISO Guia 35, foram tomadas dez porções analíticas do frasco n° 211. A avaliação de macronutrientes e micronutrientes foi realizada no Laboratório de Radioisótopos, CENA, da Universidade de São Paulo. Os métodos utilizados são descritos nas Seções 3.1.4.1 e 3.1.4.3.

3.2.6.3. Homogeneidade entre frascos

Foram selecionados aleatoriamente os frascos n° 10, 74, 111, 159, 164, 202, 259, 298, 327 e 398. A avaliação da homogeneidade do material para macronutrientes, micronutrientes e elementos traços foi realizada no National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA, durante o doutorado-sanduíche de 6 meses com bolsa BEPE/FAPESP, empregando INAA, PGAA e Kjeldahl.

a. Análise por ativação neutrônica instrumental

Porções analíticas de 180 mg de cada frasco foram pesadas em duplicata e colocadas dentro de prensa hidráulica aplicando pressão de 10 ton. As pastilhas obtidas foram de 13 mm de diâmetro e 1,5 de espessura. Para o controle da qualidade analítica, foram usados quatro materiais de referência certificados do NIST, ou seja, SRM 1570 (*folhas de espinafre*), SRM 1571 (*folhas de pomar*), SRM 1572 (*folhas de laranjeira*) e SRM 1573 (*folhas de tomate*). Pastilhas de CRMs foram preparadas seguindo o mesmo procedimento das amostras. A Figura 14 mostra o procedimento realizado para amostras e CRMs.

Para calibração e determinação elementar, soluções padrões foram preparadas a partir de lâminas e sais de alta pureza (99,99%), dissolvidos com ácidos destilados, HNO₃ 65% (Merck, Alemanha) e HCl 37% (Merck, Alemanha) e água ultrapura com ligeiro aquecimento. Frascos de teflon (Nalgene, Estados Unidos) de 125 mL com excelente resistência a temperatura, reagentes químicos e corrosão foram usados para armazenar a solução padrão.



Figura 14. Preparação de folhas de cana-de-açúcar e materiais de referência certificados

Foram preparadas as seguintes soluções padrões: Ca3109A (Ca), Mg3131a (Mg), S403 (Al, Cu, Mn, V), S1410 (Al, Cu, Mn, V), S0201 (Al, Cu, Mn), NaClO₆ (Na, Cl), KCL09 (K), I0612A (As, Au, Cd, La, Mo, Sm, W, Zn), L0305 (Ag, Co, Hg, Sc, Th), L0504 (Ce, Cr, Cs, Fe, Rb, Sb, Se, Sn, Zn) e L0509 (Cr, Cs, Fe, Rb, Sb, Se, Zn). Alíquotas de 50 µL a 400 µL de soluções padrões foram pipetadas e colocadas sobre papel filtro Whatman 42 (diâmetro de 55 mm) e secas em capela de fluxo laminar.

Após a secagem do material, o papel filtro foi prensado em uma prensa hidráulica (Carver, USA) aplicando 10 ton de pressão. As pastilhas obtidas foram de 13 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura. A Figura 15 apresenta a preparação dos padrões e branco analítico. Brancos analíticos foram também preparados de papel filtro Whatman 42 sem adição do analito.

A irradiação do material foi realizada no reator nuclear de pesquisa NCNR de 20 MW do NIST com fluxo de nêutrons de $3,4 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e posição de irradiação RT-2.

Para os radionuclídeos de meias-vidas curtas (< 12 h), amostra, padrão, CRMs e branco foram colocados dentro de plásticos de polietileno e selados. Cada amostra foi irradiada por 2 min junto com padrão e monitor de fluxo de Ti (8 mg).



Figura 15. Preparação de soluções padrões e brancos analíticos para determinação elementar por INAA

As amostras foram colocadas na posição inferior com a pastilha orientada axialmente ao frasco de irradiação (coelho) e fluxo de nêutrons. A medida da atividade induzida nas amostras e CRMs, monitor de fluxo e padrões foi realizada por 10 min, 2 min e 5 min, respectivamente.

Para os radionuclídeos de meias-vidas longas (> 12 h), amostras, padrões e CRMs foram juntamente colocados dentro do plástico de poliestireno de alta densidade, livre de antimônio, e selados. Estes materiais foram colocados na posição média do frasco (coelho) para irradiação simultânea durante 12 h, com rotação a cada 6 h. As medições da atividade induzida das amostras, CRMs e padrões ocorreram aos 3 e 15 dias de decaimento, com respectivos tempos de contagem de 2 h e 8 h.

Os detectores de alta resolução de germânio hiperpuro Carolin e Marlene foram utilizados para radionuclídeos de meias-vidas curtas e Axel para radionuclídeos de meias-vidas longas. Estes detectores apresentam as seguintes características:

- Carolin GEM-30P4-Plus-S, TRP, 38,1%
1,76 keV/1,85 keV
- Marlene GEM-30P4-Plus-S, TRP, 33,6%
1,75 keV/1,90 keV
- Axel GEM-30175-P-Plus-S, TRP, 31,9 %
1,72 keV/1,80 keV

Após a deconvolução dos espectros de radiação gama, foram calculadas as frações de massa dos elementos químicos nas amostras e nos materiais de referência certificados por método comparativo de padrão e amostra a partir do software Genie (ZEISLER et al., 2003). Os valores de fração de massa foram corrigidos para emissão de resultados em massa seca.

b. Análise por ativação com raios gama pronto

Para a determinação de Si, N e B foram selecionados os frascos 10, 111, 159, 202 e 398. Porções analíticas de 250 mg de cada frasco foram pesadas em balança XP205 DR (Mettler Toledo), colocadas em suporte e prensadas aplicando 10 ton de pressão. As dimensões da pastilha foram 13 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Estas pastilhas foram colocadas dentro de plástico de teflon, seladas e suspensas em fina corda de PFA em suporte de alumínio. A Figura 16 mostra a posição da pastilha no suporte de alumínio colocado dentro da caixa de amostra para irradiação.

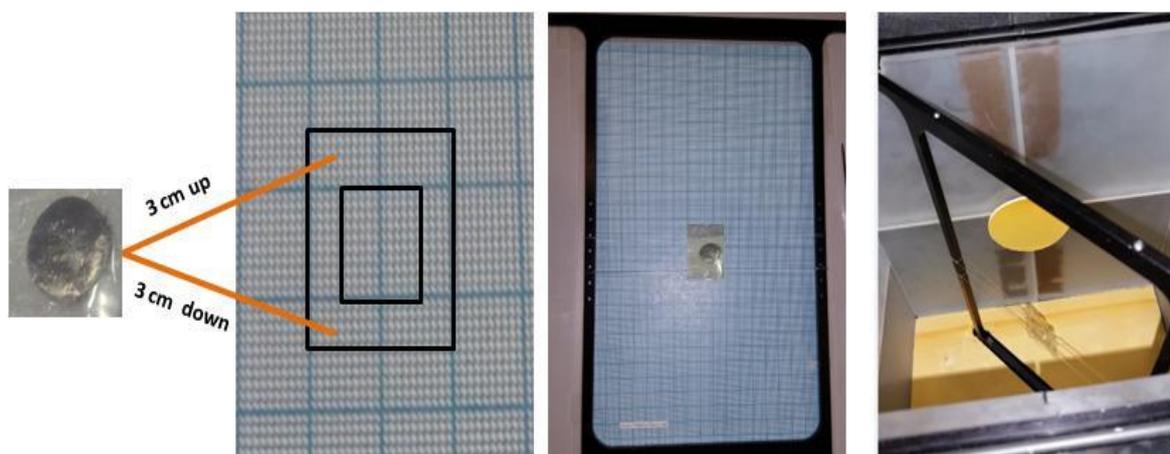


Figura 16. Posição da amostra no suporte de alumínio e dentro da caixa para irradiação gama

As amostras foram colocadas na posição média da caixa de amostra para serem irradiadas com feixe de nêutrons em vácuo. Para o controle da qualidade analítica, foram empregados três materiais de referência SRM 1570 (*folhas de espinafre*), SRM 1571 (*folhas de*

pomar) e SRM 1573 (*folhas de tomate*). Pastilhas de CRMs foram preparadas e analisadas seguindo o mesmo procedimento das amostras.

Para a calibração, foram utilizadas soluções padrões preparadas a partir da dissolução de sais e metais de alta pureza (Si, Fe e Mn) com ácidos destilados HNO₃ 65% (Merck, Alemanha), HF 40% (Merck, Alemanha) e água ultrapura. Também foi utilizada uma solução padrão SRM 3150 de 1% de Si. Alíquotas das soluções padrões foram impregnadas em papel filtro Whatman 42 (55 mm e 70 mm), em diferentes níveis de concentrações e secas em capela de fluxo laminar. As pastilhas foram preparadas da mesma forma que as amostras.

O padrão de N foi preparado a partir de pó de ureia, enquanto os brancos analíticos de papel filtro Whatman 42 de diâmetros de 55 mm e 70 mm. Os brancos analíticos permitem avaliar a contribuição do background em Si, N e B. Monitores de fluxo de ligas de titânio foram preparados para monitorar o fluxo de nêutrons. A Figura 17 apresenta as amostras, CRMs e padrões preparados, assim como a posição do suporte da amostra dentro da caixa.

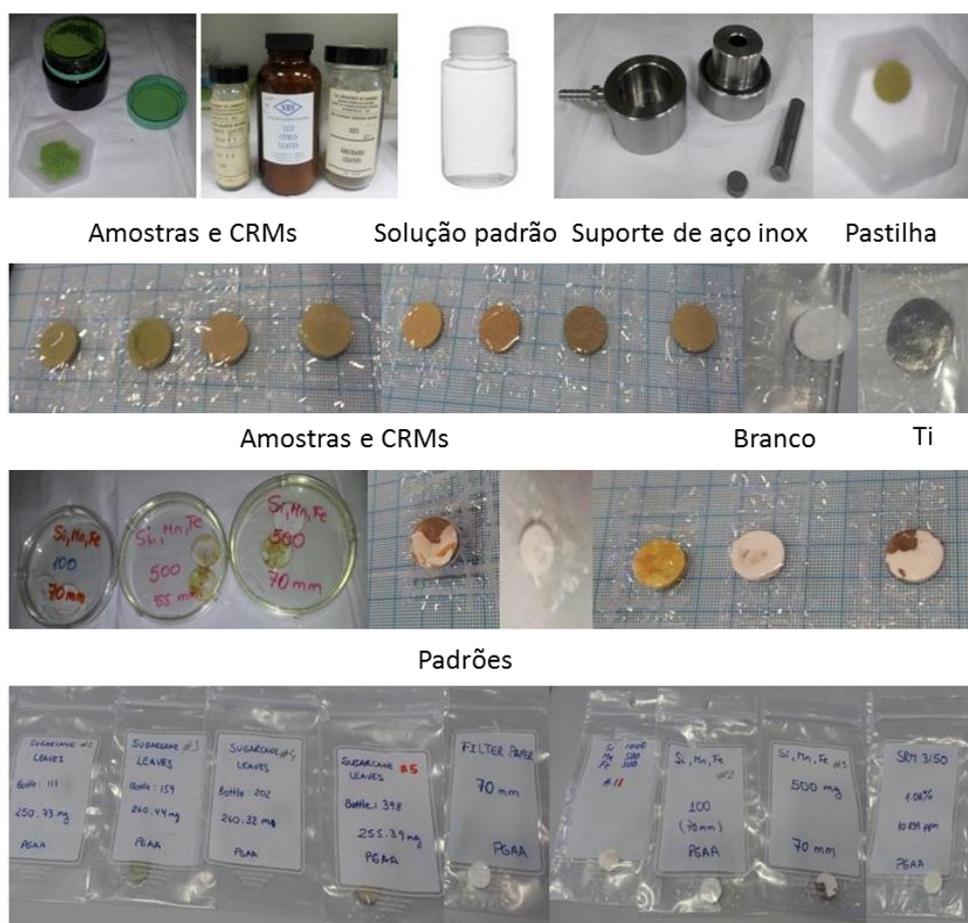


Figura 17. Preparação de amostras, padrões e CRMs para a determinação de Si, N e B

Por outro lado, a Tabela 12 apresenta as condições experimentais da irradiação de amostras, CRMs e padrões por PGAA.

Tabela 12. Condições experimentais para determinação de Si, N e B usando PGAA

ID	Massa (μg)	Si (keV)		N (keV)		B (keV)	Tempo de irradiação (s)	Tempo morto (%)
SRM3150_1	1087	3539	4934				24899	6,9
SRM3150_2	5460	3539	4934				12184	12,9
SRM3150_11	10941	3539	4934				12184	12,5
SRM3150_12	10941	3539	4934				12184	12,6
SRM3150_Si	10941	3539	4934				8760	6,1
Ureia	359330			5532	10829		7341	6,7
10_SC01	250000	3539	4934	5532	10829	478	17012	6,4
111_SC02	250000	3539	4934	5532	10829	478	66374	5,7
159_SC03	250000	3539	4934	5532	10829	478	59917	6,6
202_SC04	250000	3539	4934	5532	10829	478	58771	6,3
398_SC05	250000	3539	4934	5532	10829	478	78903	5,9
SRM1570	250000	3539	4934	5532	10829	478	85005	8,7
SRM1571	250000	3539	4934	5532	10829	478	96886	5,6
SRM1573	250000	3539	4934	5532	10829	478	67451	10,2

Foi empregado sistema de espectrometria gama de germânio hiperpuro, com eficiência relativa de 35 %, em atmosfera de vácuo e supressor Compton para reduzir o background e melhorar a razão do sinal. O programa de MCA Lynx Canberra foi empregado para aquisição dos dados, enquanto o software Genie 2000 para avaliação do espectro. Os valores de fração de massa foram corrigidos para emissão de resultados em massa seca.

c. Método de Kjeldahl

Porções analíticas de 100 mg amostradas dos dez frascos escolhidos foram pesadas em triplicata em balança analítica modelo AE 200 (Mettler Toledo) e colocadas em tubos de digestão da proteína. Para o controle da qualidade analítica, foram utilizados os mesmos materiais de referência certificados do estudo de homogeneidade dentro frasco, também pesados em triplicata. A determinação de N total foi a mesma utilizada no estudo de variedades seção 3.1.4.3.

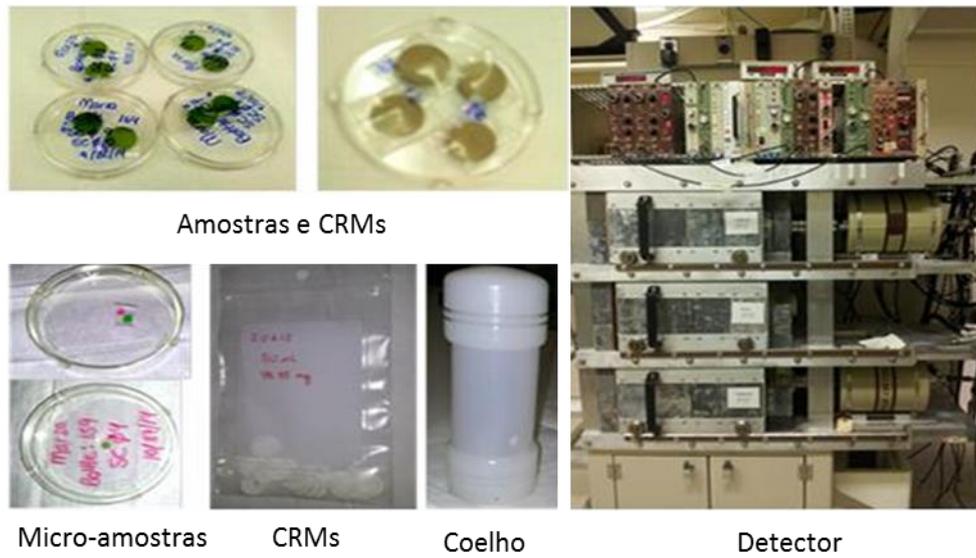
3.2.6.4. Estudo de micro-heterogeneidade

Porções analíticas de 3 mg de cada frasco foram pesadas usando balança analítica ultra-micro UMT 2 (Mettler Toledo). Pastilhas de 3 mm de diâmetro e 0,1 mm de espessura foram feitas em prensa hidráulica (Carver, USA) aplicando 0,5 ton de pressão. Os padrões foram preparados usando o mesmo procedimento que o estudo de homogeneidade.

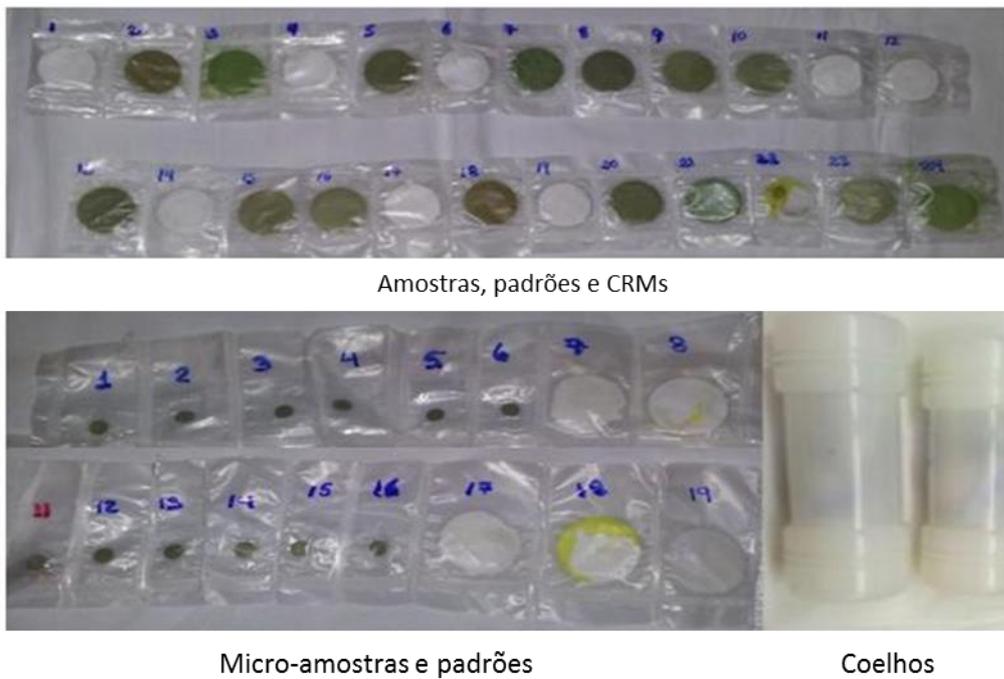
Para elementos de meias-vidas curtas, amostras, materiais de referência certificados e padrões foram embalados individualmente em plástico de polipropileno (Spectro Film™ Polypro-Econo 6.3, Somar International, Inc., Tuckahoe, NY) e selados. Para irradiação cada amostra ou CRM foi colocado juntamente com padrão e monitor de fluxo dentro de um coelho e irradiados por 2 min. A detecção da atividade induzida das amostras foi realizada imediatamente após a irradiação durante 10 min.

Para elementos de meias-vidas longas, conjuntos de 10 a 12 pastilhas de amostras, padrões e CRMs foram embaladas em plásticos de poliestireno de alta densidade e seladas. Estes materiais foram colocados dentro de um coelho para irradiação simultânea por 12 h, com rotação cada 6 h. A medição da atividade induzida das amostras ocorreu em 3 dias e 14 dias após a irradiação durante 2 h e 10 h, respectivamente.

O número total de irradiações do estudo de homogeneidade e micro-heterogeneidade, foram 77, sendo 68 para elementos de meias-vidas curtas e 9 para elementos de meias-vidas longas. A Figura 18 apresenta as amostras, micro-amostras, padrões e CRMs irradiados.



a) Elementos de meia-vida curta



b) Elementos de meia-vida longa

Figura 18. Amostras, micro-amostras, padrões e CRMs analisados por INAA

3.2.7. Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade foi dividido em curto prazo e longo prazo utilizando INAA e método de Kjeldahl.

3.2.7.1. Estabilidade a curto prazo

Este estudo avalia o comportamento do material durante o transporte. Assim, foram selecionados aleatoriamente os frascos 57, 83, 149, 255, 321 e 359, colocados em condições de armazenamento extremas ($T= 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 100 % de umidade). A Figura 19 apresenta os frascos e o sistema utilizado para a simulação das condições extremas.



Figura 19. Estabilidade a curto prazo do material de referência de folhas de cana-de-açúcar

Os períodos de amostragem dos seis frascos avaliados foram realizados em 7, 30 e 60 dias.

3.2.7.2. Estabilidade a longo prazo

Neste estudo, foram consideradas duas condições de armazenamento ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$) e selecionados aleatoriamente 6 frascos para cada temperatura. Os frascos colocados em dessecador com temperatura de $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram 29, 101, 200, 246, 311 e 394, enquanto os frascos 1, 95, 188, 280, 343 e 410 foram armazenados em freezer com temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os períodos de amostragem foram realizados em 0, 1, 3, 6 e 9 meses.

Por INAA, as amostras de estabilidade a curto e longo prazo foram distribuídas em onze séries analíticas (TK, TL, TM, TS, TT, TX, TY, UC, UD, UG e UH) para irradiação no reator nuclear de pesquisa IEA-R1 do IPEN/CNEN, São Paulo. Os procedimentos para a determinação dos elementos químicos por INAA e N (total) foram os mesmos utilizados nas seções 3.1.4.1 e 3.1.4.3. Os materiais de referência certificados utilizados para o controle da qualidade analítica foram SRM 1515, SRM 1570a, SRM1573a e INCT-OBTL-5.

3.2.8. Umidade residual

Dentre os vários procedimentos para a determinação da umidade residual, a secagem em estufa e dessecador são os mais utilizados no NIST.

a. Dessecador

O agente dessecante empregado foi perclorato de magnésio ($Mg(ClO_4)_2$), reagente anidro recomendado para determinar o teor de umidade em material de referência. Porções analíticas de aproximadamente 1,0 g foram pesadas e colocadas em frascos de vidro com tampas, previamente identificados e pesados, usando balança semi-microanalítica XP205 (Mettler Toledo). As amostras foram colocadas dentro de dessecador removendo a tampa e cada amostra foi pesada periodicamente até massa constante.

b. Estufa

Amostras de 1,0 g foram pesadas e colocadas em frascos com tampa. Foi utilizada uma estufa, modelo 630 G (Fischer Scientific, USA) a 80 ± 2 °C, evitando perda e degradação de material. As amostras foram colocadas em dessecador por 1 h e pesadas. Foram avaliadas secagens por 2 h, 5 h, 20 h, 26 h, 42 h e 67 h. Para o controle da qualidade analítica, foram utilizados SRM 1570 (*folhas de espinafre*), SRM 1571 (*folhas de pomar*), SRM 1572 (*folhas de laranjeira*) e SRM 1573 (*folhas de tomate*). A determinação da umidade residual foi realizada de acordo com a Equação 11

$$\text{Umidade residual} = \left(\frac{\text{massa inicial} - \text{massa seca}}{\text{massa inicial}} \right) \quad (11)$$

e a incerteza combinada (u_c) foi calculada usando a Equação 12

$$u_c = \bar{X} \sqrt{\left(\frac{u_b}{\bar{X}}\right)^2 + \left(\frac{SD}{\bar{X}}\right)^2} \quad (12)$$

u_c = Incerteza combinada

u_b = Incerteza padrão da balança

X = Média

SD = Desvio padrão

3.2.9. Determinação de cinzas

A avaliação do teor de cinzas no material de referência candidato foi realizada empregando os frascos 74, 111, 159, 164, 202, 210, 259, 298, 327 e 398. Porções analíticas de 500 mg foram pesadas em triplicata e colocadas em cadinhos de porcelana previamente tarados. O material foi colocado em mufla e queimado previamente a 105 °C durante 30 min para evitar perda e contaminação do material, e calcinado a 550 °C por 4 h para obtenção de cinzas. O teor de cinzas foi calculado usando a Equação 13

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = \left(\frac{\text{massa seca}}{\text{massa amostra}} \right) * 100 \quad (13)$$

e a incerteza combinada (u_c) associada calculada em função da incerteza da balança usando a Equação 14

$$u_c = \bar{X} \sqrt{\left(\frac{u_b}{\bar{X}}\right)^2 + \left(\frac{SD}{\bar{X}}\right)^2} \quad (14)$$

u_c = Incerteza combinada

u_b = Incerteza padrão da balança

\bar{X} = Média

SD = Desvio padrão

3.2.10. Caracterização química final do material

A caracterização química final do material de referência candidato foi realizada no NIST, Gaithersburg, USA, usando INAA para avaliar a homogeneidade, sendo uma etapa relevante para o processo de certificação e uso do material.

Porções analíticas de 180 a 200 mg foram pesadas em duplicata a partir de 12 frascos (14, 45, 89, 120, 161, 212, 217, 264, 316, 346, 373 e 402). As amostras foram prensadas dentro de suporte de aço inox obtendo-se pastilhas de 13 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura. As pastilhas foram pesadas em balança analítica (Mettler Toledo AE163, SN E55351, com calibração verificada usando massas de 200 mg, Troemner SN 4000014082). Para o controle da qualidade analítica, foram utilizados SRM 1515 (*folhas de maçã*), SRM 1570 (*folhas de espinafre*) e SRM 1572 (*folhas de laranja*), preparados nas mesmas condições que as amostras. As massas foram corrigidas pelo teor de umidade residual, ou seja, 2,6 %, 3,9 %, 4,8 % e 3,8 % para SRM 1515, SRM 1570, SRM 1572 e material de referência candidato.

As soluções padrões multielementares foram preparadas a partir de metais e sais de alta pureza com dissolução em reagentes ultrapuros (Tabela 13). Porções analíticas de 25 mg e 100 mg de soluções padrões foram transferidas com uma pipeta calibrada (Eppendorf multipipettor) para papel filtro Whatman 542 com 55 mm de diâmetro. Os papéis filtro foram secos em capela de fluxo laminar por 24 h e prensados para a obtenção das pastilhas.

As pastilhas de amostras e padrões foram individualmente seladas para irradiação em plásticos de polietileno de alta densidade de 0,12 mm de espessura. As irradiações foram realizadas na posição RT-2 do reator de pesquisa do NIST (20 MW) com fluxo de nêutrons de $3,4 \times 10^{13} \text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Para nuclídeos de meias-vidas curtas, um arranjo composto de uma amostra ou material de referência certificado, padrão e monitor de titânio (0,8 mg) foi colocado na posição central da cápsula de irradiação (coelho) em forma perpendicular ao eixo. Cada coelho foi irradiado por 2 min e, após irradiação, amostra, padrão e monitor foram transferidos para outro plástico de polietileno para detecção da atividade induzida. Todas as amostras, padrões, CRMs e monitores de fluxo foram distribuídos em 30 irradiações.

Para nuclídeos de meias-vidas longas, amostras e CRMs foram selados em pacotes individuais de polietileno de alta densidade (material livre de Sb, mas contém traços de Cr e V). Cada conjunto para irradiação de amostra foi composto de 10 a 12 pastilhas de amostras e CRMs. O tempo de irradiação foi de 12 h com rotação de 180° a cada 6 h. Os detectores utilizados para nuclídeos de meia-vida curta foram Carolin, modelo Ortec GEM30P4-PLUS-S, S/N 47-TP12366A, e Isabel modelo Ortec GEM-20180-P, S/N 37-TP11323A. Para nuclídeos de meias-vidas longas foi utilizado um detector convencional Kelly, modelo Ortec GEM-25185-PLUS, S/N 34-P30938A.

Elementos, energias gama e interferências espectrais são apresentados na Tabela 14.

Tabela 13. Padrões preparados a partir de sais, lâminas e soluções-padrão empregados em INAA

Padrão, elemento	Preparado por*	Fonte do elemento	Fração de massa (mg/kg)
S1410	MM/RZ		
Al		Al foil 0,1mm, Alfa Aesar	333,7
Cu		Cu foil 0,038 mm, Alfa Aesar	671,4
Mn		Mn powder, Alfa Aesar	81,66
V		V foil, Alfa Aesar	15,18
I0698	RZ		
As		As ₂ O ₃ , SRM 83d	105,1
Au		Au foil, 6N, Johnson Matthey	2,048
Cd		Cd shot, 6N Alfa Products	88,84
La		La foil, 99,9% Alfa Aesar	3,632
Mo		Mo foil, Alfa Aesar	133,9
Sm		Sm foil, 99,9% Alfa Aesar	0,5206
W		W foil, Alfa Aesar	77,16
Zn		Zn shot, Puratronic 99,99% Alfa Aesar	1083
I0612	VC/RZ		
As		As ₂ O ₃ , SRM 83d	108,7
Au		Au foil, 6N Johnson Matthey	1,019
Cd		Cd shot, 6N Alfa Products	96,42
Mo		Mo powder, Puratronic 99,999%, Alfa Aesar	97,29
W		W foil, Alfa Aesar	75,15
Zn		Zn shot, Puratronic 99,99% Alfa Aesar	1868
L0305	ROS/RZ		
Ag		Ag wire, Alfa Aesar	29,43
Co		Co foil, Alfa Aesar,	18,48
Hg		Triple distilled, Eastern Smelting & Refining Corp,	19,24
Sc		Sc ₂ O ₃ , Ventron	0,4496
Th		Th(NO ₃) ₄ (H ₂ O) _x , converted to ThO ₂ , Johnson Matthey	18,77
L0504	RZ		
Ce		CeO ₂ , JM Specpure	87,69
Cr		Cr flakes, Alfa Aesar	101,8
Cs		CsCl, Alfa Aesar	37,97
Fe		Fe foil, Alfa Aesar	11050
Rb		RbCl, Spex Industries	624,1
Sb		Sb shot, Cominco	35,17
Se		Se shot, Alfa Aesar	102,8
Sn		Sn shot, Spex Industries	4233
Zn		Zn shot, Alfa Aesar	1801
L0509	BET/ROS		
Cr		Zn shot, Alfa Aesar	134,0
Cs		CsCl, Alfa Aesar	44,10
Fe		Fe foil, Puratronic, Alfa Aesar	11490
Rb		RbCl, Spex Industries	633,3
Sb		Sb shot, Comicon	64,82
Se		Se piece, Alfa Aesar	102,4
Zn		Zn shot, Alfa Aesar	2021
NaCl106	VC		
Na		SRM 919b	5024
CaCO₃			
Ca	MM	SRM915a	40,01 %
Mg	MM	SRM3131a	9998
	MM	Mg foil 0,1 mm, Alfa Aesar, ~10 mg	99,98 %

Tabela 14. Nuclídeos medidos, energia dos raios gama e modo de ensaio. Energias marcadas em negrito foram usadas para a determinação dos elementos químicos

Nuclídeos	Vida media	Energia Gama (keV)	Modo ensaio, tempo, decaimento
²⁸ Al	2,2406 min	1778,99	Contagem curta 1, 600 s, 200 s
⁷⁶ As	26,32 h	559,10	Contagem intermediária
⁸² Br	35,30 h	554,35 , 619,11, 776,52	Contagem intermediária, 2 h, 2 d
⁴⁹ Ca	8,27 min	3084,40	Contagem curta 1, 600 s, 200 s
¹⁴¹ Ce	32,50 d	145,44	Contagem longa, 8 h, >10 d
³⁸ Cl	37,24 min	1642,59 , 2168,40	Contagem curta 1, 600 s, 200 s
⁶⁰ Co	1925,20 d	1173,23, 1332,50	Contagem longa, 8 h, >10 d
⁵¹ Cr	27,69 d	320,10	Contagem longa, 8 h, >10 d
¹³⁴ Cs	754,50 d	604,71, 795,87	Contagem longa, 8 h, >10 d
⁶⁶ Cu	5,120 min	1039,35	Contagem curta 1, 600 s, 200 s
⁵⁹ Fe	44,50 d	1099,30, 1291,60	Contagem longa, 8 h, >10 d
⁴² K	12,36 h	1524,58	Contagem curta 2, 30 min, >2 h Contagem intermediária, 2 h, 2 d
¹⁴⁰ La	40,27 h	1596,17	Contagem intermediária, 2 h, 2 d
²⁷ Mg	9,46 min	843,76, 1014,42	Contagem curta 1, 600 s, 200 s
⁵⁶ Mn	2,5785 h	846,81, 1810,77	Contagem curta 1, 600 s, 200 s Contagem curta 2, 30 min, >2 h
Mo- ^{99m} Tc	65,94 h	140,51	Contagem intermediária, 2h, 2d
²⁴ Na	14,96 h	1368,55 , 2754,10	Contagem curta 2, 30 min, >2 h Contagem intermediária, 2 h, 2 d
⁸⁶ Rb	18,66 d	1076,63	Contagem longa, 8 h, >10 d
¹²⁴ Sb	60,20 d	602,73, 1690,9	Contagem longa, 8 h, >10 d
⁴⁶ Sc	83,82 d	889,3 , 1120,3	Contagem longa, 8 h, >10 d
¹⁵³ Sm	46,80 h	103,18	Contagem intermediária, 2 h, 2 d
Th- ²³³ Pa	26,97 d	312,17	Contagem longa, 8 h, >10 d
⁵² V	3,743 min	1434,07	Contagem curta 1, 600 s, 200 s
⁶⁵ Zn	244,10 d	1115,52	Contagem longa, 8 h, >10 d

4. RESULTADOS

4.1. Estudo de variedades de cana-de-açúcar

Foram selecionadas doze variedades de cana-de-açúcar, ou seja, CTC2, CTC4, CTC11, CTC14, CTC15, CTC17, CTC20, IACSP955000, RB855156, RB966928, RB965902 e SP832847, em função dos destaques agrônômicos, resistência, área plantada e produtividade. As variedades CTC11 e CTC15 foram também coletadas para avaliar a disponibilidade dos nutrientes em três diferentes condições de cultivo.

A umidade de folhas de cana-de-açúcar sem nervura foi estabelecida entre 60 % - 70 %. Após a secagem, foram selecionados 2 moinhos (facas e rotor) e peneira de 80 μm para obter maior uniformidade do tamanho de partícula das amostras. Este material apresentou resistência de moagem devido aos altos teores de lignina e Si na estrutura da folha, sendo observadas propriedades eletrostáticas no material final obtido. Foram realizados testes para a determinação do tamanho de partículas por difração laser para uma amostra da variedade SP 832847. A Figura 20 mostra a distribuição de tamanho de partícula para cinco medições por dispersão úmida (água).

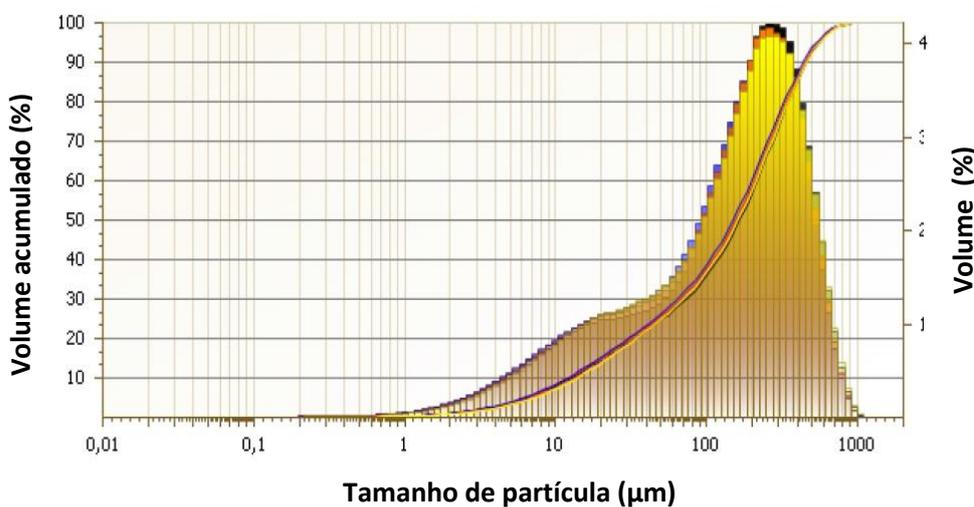


Figura 20. Distribuição do tamanho de partícula no material de folha de cana-de-açúcar, determinada por difração laser, dispersão úmida, no equipamento Analysette 22 MicroTec plus, da Fritsch, Alemanha

O tamanho de partícula para esta amostra apresentou 80 % do volume distribuído entre 4 µm e 450 µm e o coeficiente de variação foi 2,5 %. Esta determinação também foi realizada para as outras amostras de folhas de cana-de-açúcar coletadas, obtendo comportamentos similares. A dispersão das partículas obtida não é adequada para a preparação de material de referência candidato. Porém, foram estudados outros procedimentos de moagem para reduzir mais ainda o tamanho de partícula das folhas de cana-de-açúcar.

A umidade residual foi um dos parâmetros avaliados para expressar os resultados em massa seca. Para determinação da umidade residual, foram analisadas 120 amostras em triplicata. A Figura 21 apresenta os resultados de umidade residual obtidos para as doze variedades de cana-de-açúcar selecionadas (CTC2, CTC4, CTC11, CTC14, CTC15, CTC17, CTC20, IACSP955000, RB855156, RB966928, RB965902 e SP832847). Cabe ressaltar que dez destas variedades foram cultivadas em Latossolo Vermelho, enquanto as variedades RB965902 e SP832847 foram cultivadas em solo Podzólico Vermelho e Neossolo Quartzarênico, respectivamente. Por outro lado, a Figura 22 mostra os resultados para duas variedades, CTC11 e CTC15, cultivadas em diferentes tipos de solos, ou seja, Latossolo Vermelho, Cambissolo Háptico e Podzólico Vermelho. Na Figura 21, observa-se que todas as variedades apresentaram umidade residual entre 4,5% e 7,0%, sendo os maiores valores encontrados para CTC2 e CTC11, e os menores para RB966928 e CTC17.

A umidade residual das amostras é fortemente influenciada pelo procedimento de secagem e pelas condições de armazenamento, sendo esperada pouca influência da variedade ou do solo onde foi cultivada a cana-de-açúcar. Entretanto, na Figura 21 são observadas nítidas diferenças entre os valores de umidade residual das variedades. Além disso, os resultados exibidos na Figura 22 mostram que as variedades CTC11 e CTC15 cultivadas em Latossolo Vermelho apresentaram maior umidade residual ao serem comparadas com as mesmas variedades cultivadas em Cambissolo Háptico e Podzólico Vermelho. Assim, pequenas diferenças na umidade residual talvez sejam causadas pela diferença na composição das folhas das diversas variedades e procedências.

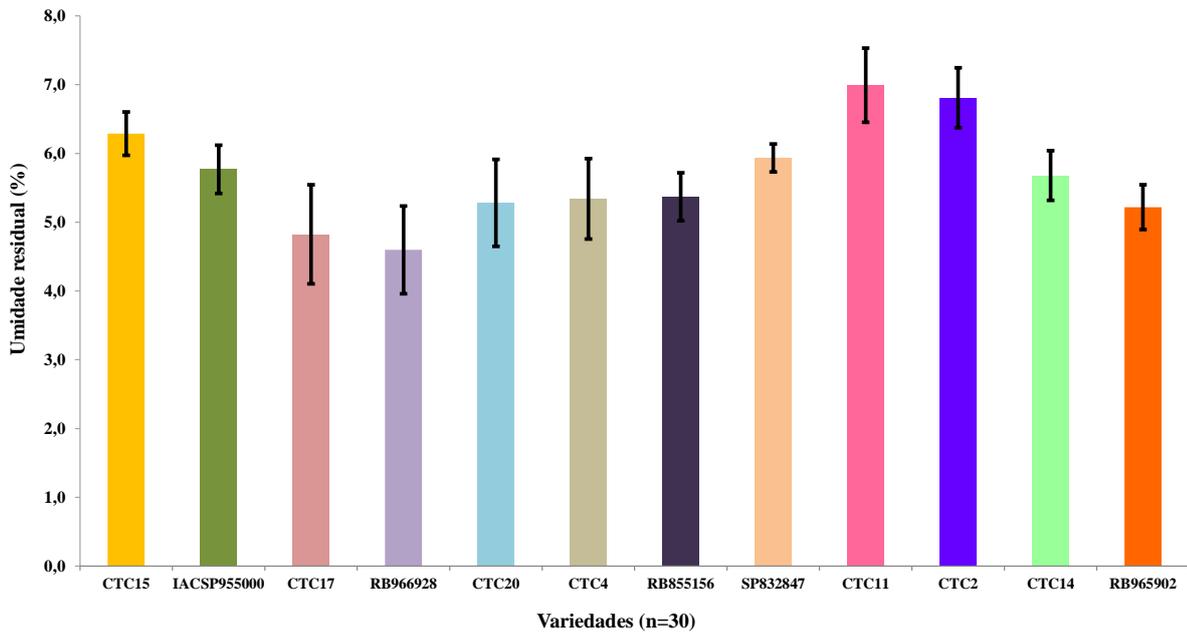


Figura 21. Umidade residual obtida para dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade RB965902 em Podzólico e SP832847 em Quartzarênico

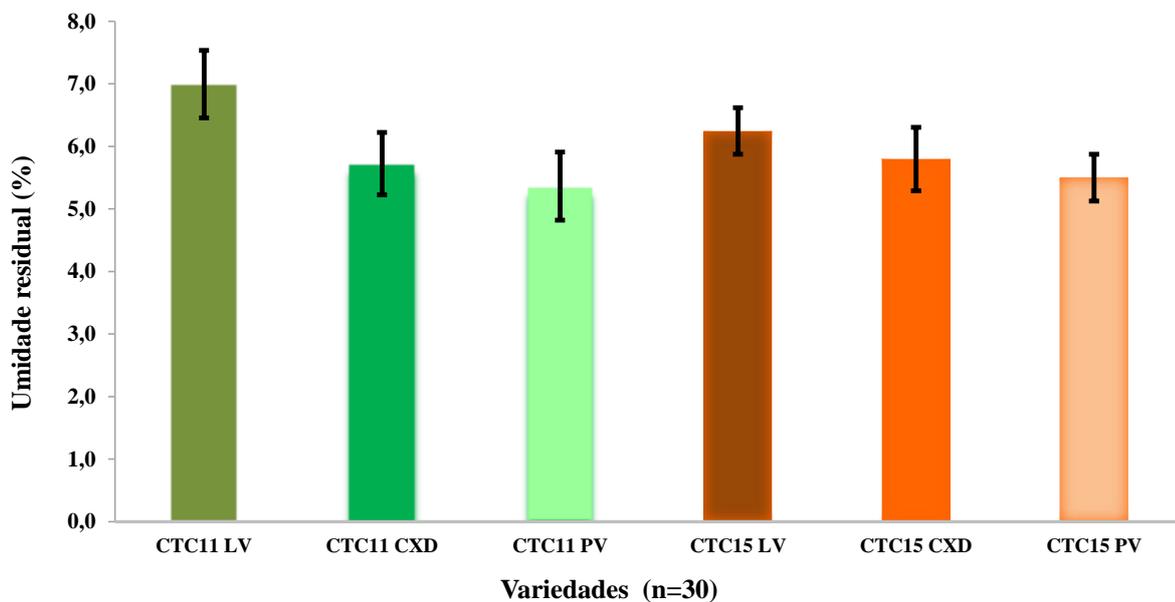


Figura 22. Umidade residual obtida para variedades de cana-de-açúcar CTC11 e CTC15 cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)

4.1.1. Determinação de macronutrientes e micronutrientes

Os macronutrientes e micronutrientes foram determinados utilizando duas técnicas analíticas, INAA e ICP OES. Os resultados apresentados são para seis variedades por INAA e doze variedades por ICP OES, como também aqueles obtidos por ICP OES para duas variedades (CTC11 e CTC15) coletadas em diferentes tipos de solo (Cambissolo e Podzólico). As análises por INAA para as outras 6 variedades e estudo de solo não foram realizadas devido aos problemas de paralisação do reator nuclear de pesquisa do IPEN.

Por INAA, foram analisados os 10 pontos amostrais das variedades CTC4, CTC15, CTC17, CTC20, IACSP955000 e RB966928, juntamente com três CRMs utilizados para o controle da qualidade do procedimento realizado. Procurou-se utilizar estes CRMs devido às faixas de fração de massa dos elementos certificados e composição matricial de folhas. Os elementos determinados por INAA foram Br, Ca, Co, Cr, Cs, Fe, K, La, Na, P, Rb, Sc e Zn.

Por ICP OES, foram analisadas as 10 amostras digeridas, em triplicata, das variedades CTC2, CTC4, CTC11, CTC14, CTC15, CTC17, CTC20, IACSP955000, RB855156, RB966928, SP832847 e RB965902, assim como as 10 amostras das variedades CTC11 e CTC15 em mais dois tipos de solo diferentes. Os reagentes utilizados foram uma mistura oxidante de HNO_3 e H_2O_2 , uma vez que normalmente permite a dissolução total de materiais vegetais disponibilizando os elementos em solução e apresentando menor interferência na determinação dos elementos de interesse (KRUG et al., 2010). No entanto, a digestão de folhas de cana-de-açúcar com essa mistura oxidante foi parcial, devido à elevada concentração de silício presente na amostra. Diferentemente das folhas de cana-de-açúcar, a digestão dos três materiais de referência foi total.

As Figuras 23 a 30 mostram os resultados obtidos por INAA e ICP OES para macronutrientes (P, Ca, K e Mg) e micronutrientes (Fe, Mn, Zn e Cu) encontrados nas variedades de cana-de-açúcar, incluindo a faixa de fração de massa para cada nutriente considerada adequada para a alta produtividade de cana-de-açúcar (RAIJ et al., 1996).

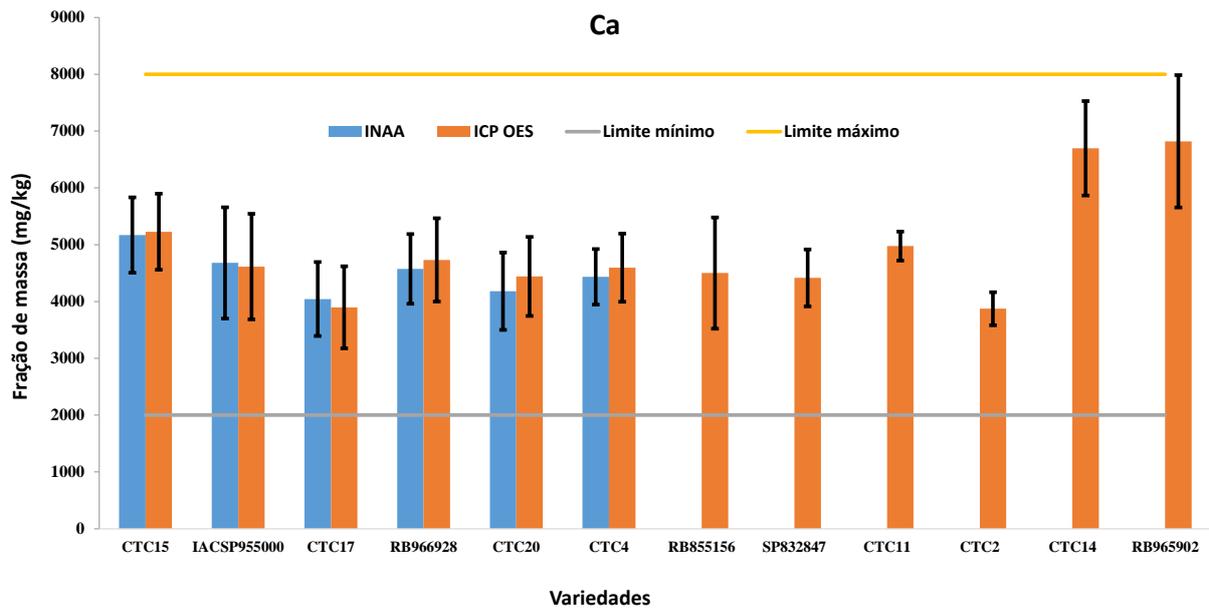


Figura 23. Fração de massa de Ca em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho

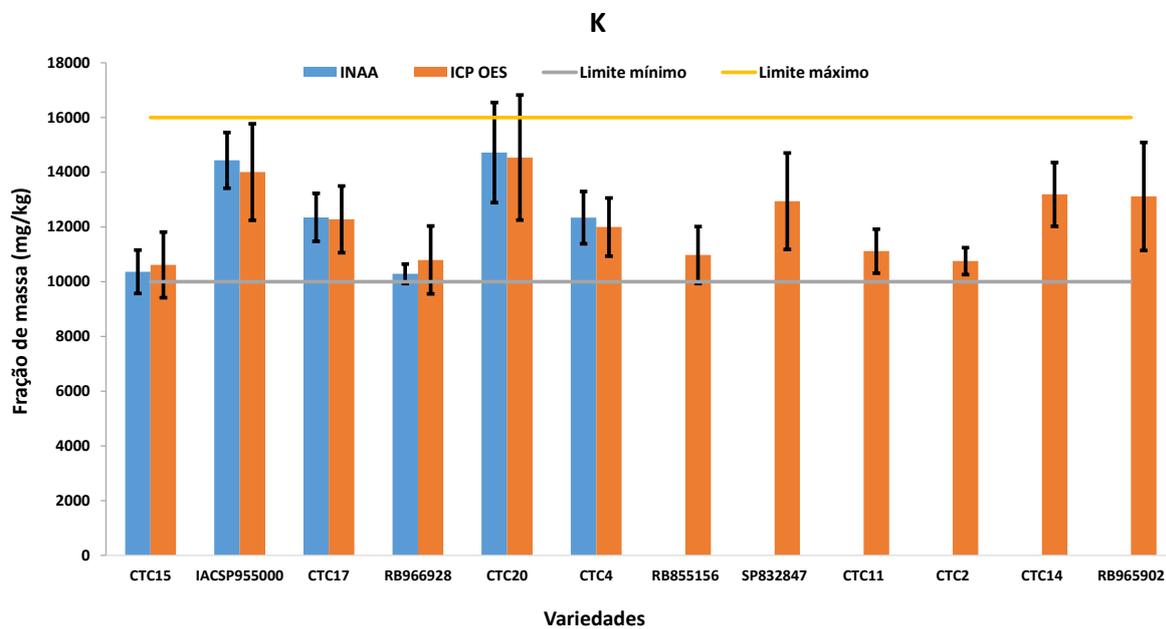


Figura 24. Fração de massa de K em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho

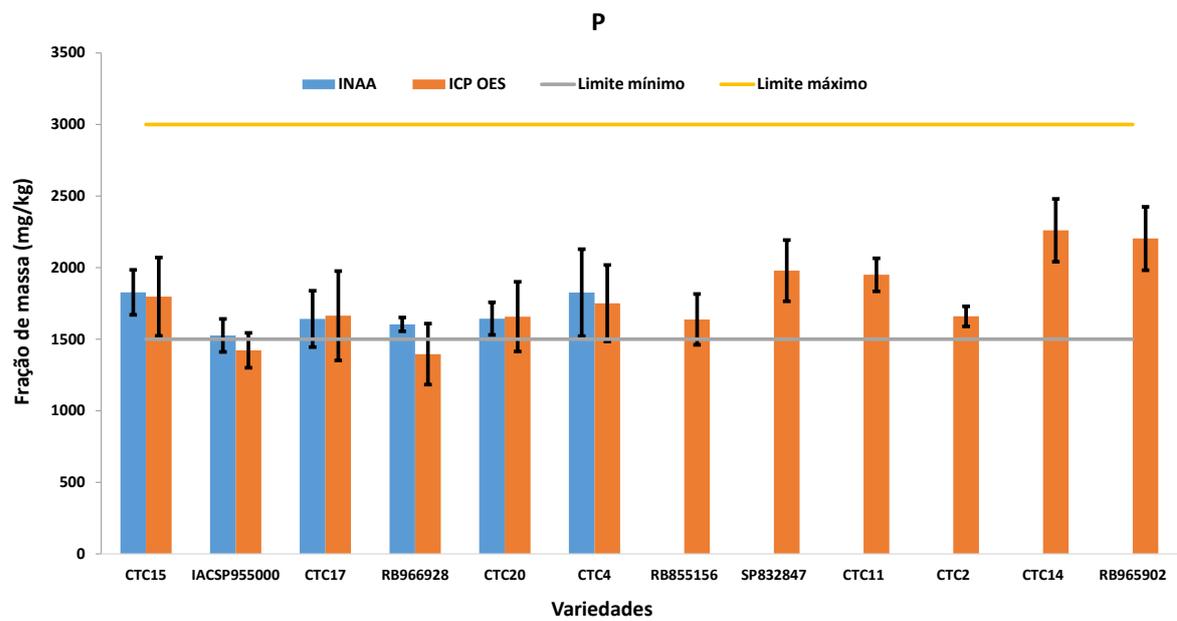


Figura 25. Fração de massa de P em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho

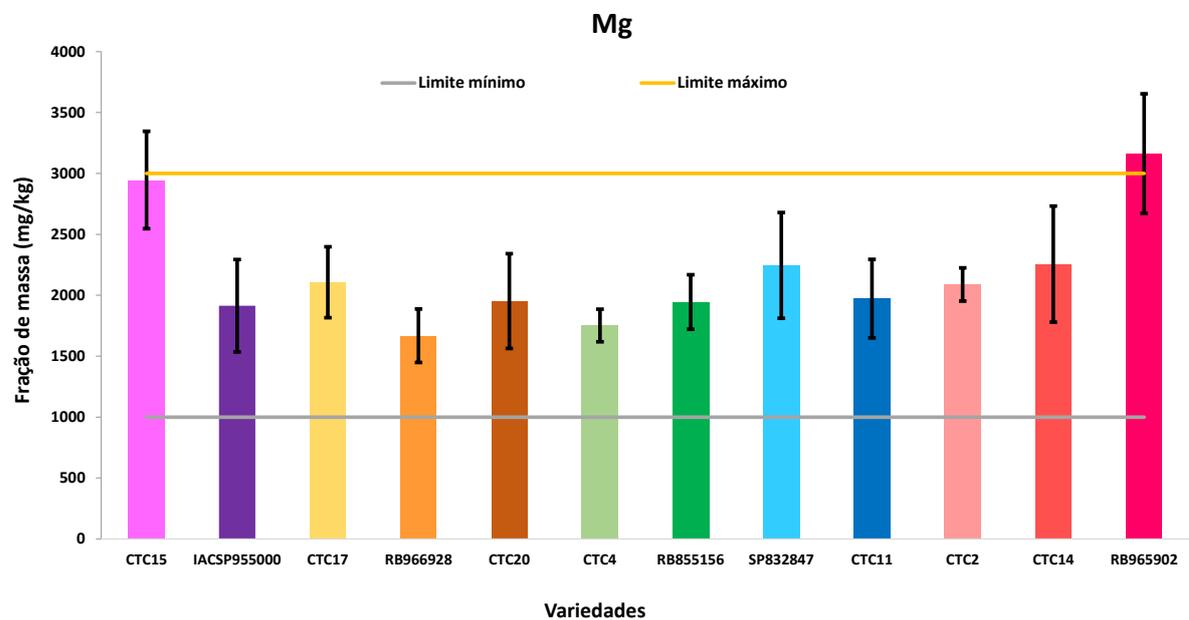


Figura 26. Fração de massa de Mg em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho

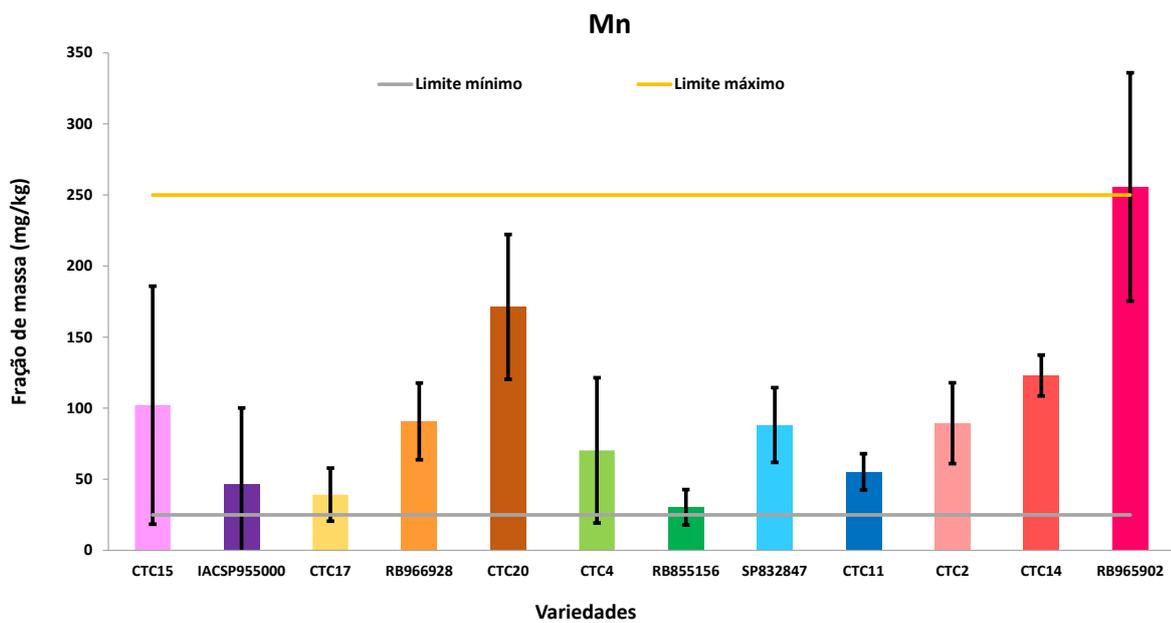


Figura 27. Fração de massa de Mn em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho

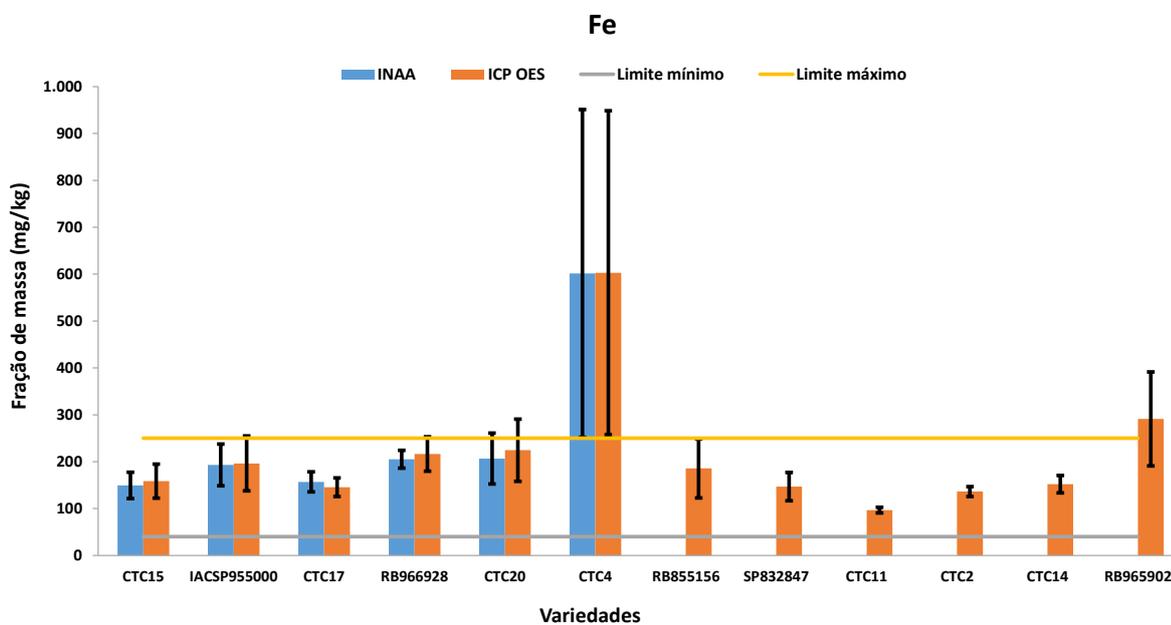


Figura 28. Fração de massa de Fe em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho

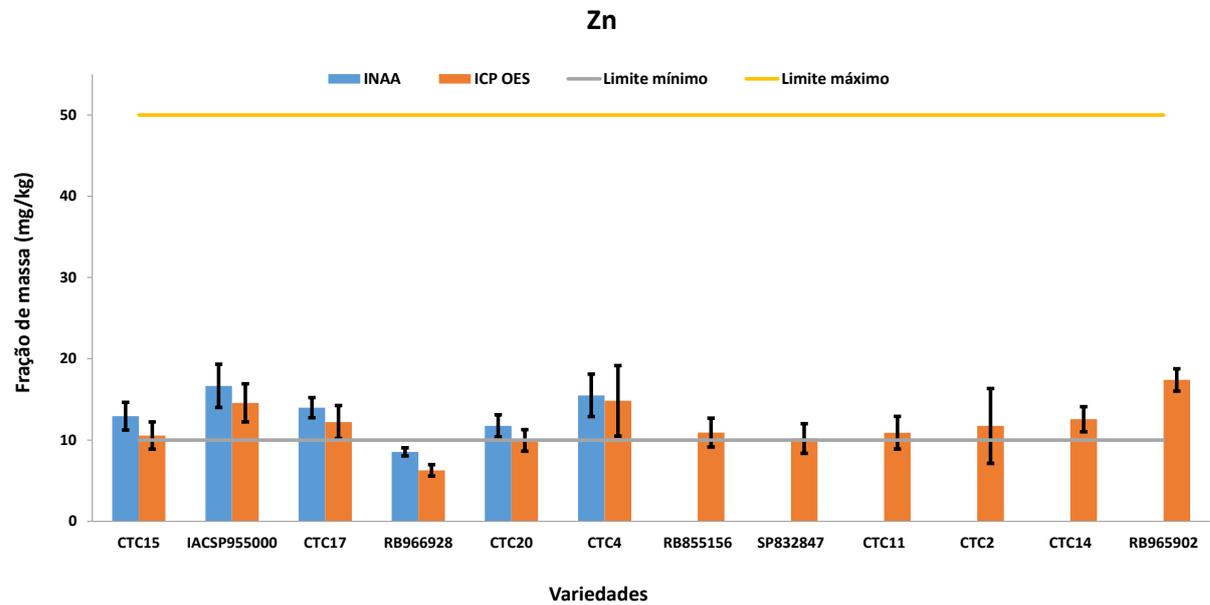


Figura 29. Fração de massa de Zn em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho

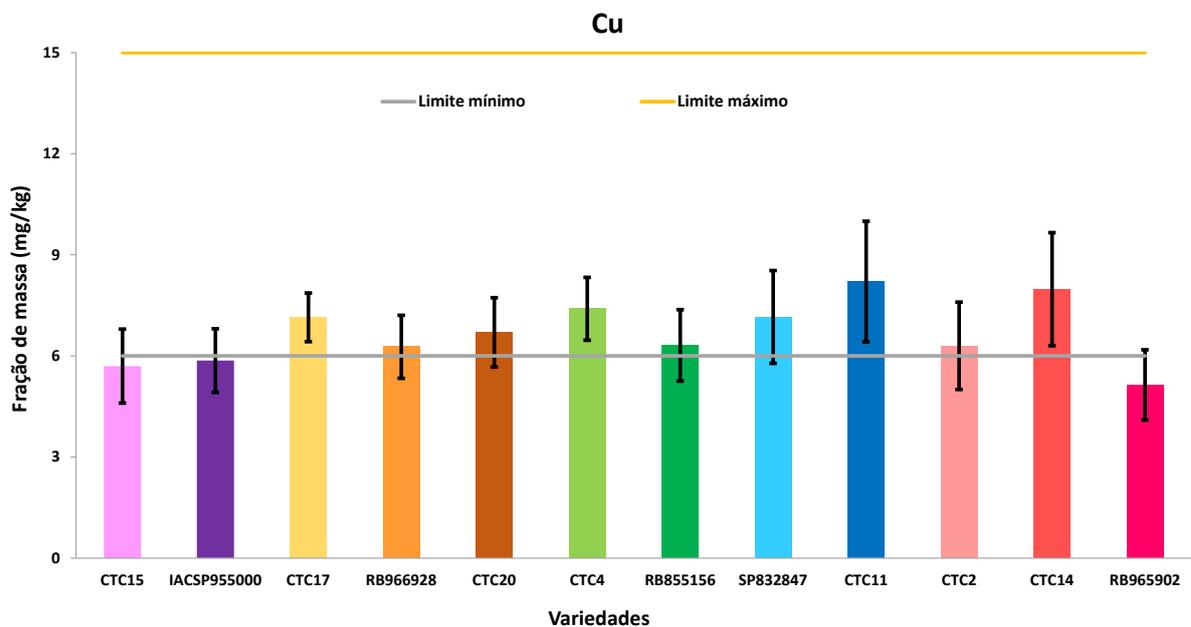


Figura 30. Fração de massa de Cu em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade SP832847 em Quartzarênico e RB965902 em Podzólico Vermelho

Os resultados de frações de massas obtidos por INAA e ICP OES foram comparados àqueles estabelecidos por Raij et al (1996) na Tabela 2. Observou-se que as 12 variedades estudadas têm frações de massa adequadas de macronutrientes (P, Ca, Mg, K), não obstante as frações de massa encontradas de P para variedades IACSP955000 e RB966928 foram ligeiramente baixas ao serem comparadas àquelas obtidas para as outras dez variedades.

No caso de micronutrientes, observaram-se frações de massa de Cu no limite mínimo da faixa de suficiência em todas as variedades estudadas, aproximadamente 6 mg/kg. Os resultados de Zn encontrados foram adequados para onze variedades, a variedade RB966928 que apresentou valores no nível crítico estabelecido por Raij (10 mg/kg). Em geral, os valores de Cu e Zn encontram-se no limite mínimo devido à baixa disponibilidade dos solos para a planta (RAIJ et al., 1996). A variedade RB 965902 apresentou frações de massa de Mg, Mn e Fe no limite máximo de suficiência, sendo que elevados teores de Mg afetam a disponibilidade de K (MOORE; BOTHA, 2014). Já elevados teores de Mn aumentam a acidez do solo, que interfere na disponibilidade de Cu, Fe e Zn, e afeta o desenvolvimento da cana (LEITE et al., 2003; MOORE; BOTHA, 2014).

Por outro lado, os valores médios de fração de massa encontrados para Mn e Fe em doze variedades de cana-de-açúcar foram adequados ao serem comparados com aqueles estabelecidos por Raij et al (1996). No entanto, houve alta variação nos valores encontrados para Mn em cada ponto amostrado, observando-se coeficientes de variação de 30% até 115%, sendo considerados estatisticamente aceitáveis valores menores de 30% para amostragem de campo. No caso do Fe, observou-se coeficiente de variação de 58% para a variedade CTC4.

Micronutrientes como Mo e B em folhas de cana-de-açúcar também foram determinados, encontrando-se que as doze variedades estudadas apresentaram valores menores que os limites de detecção da técnica de ICP OES, respectivamente, 4,3 mg/kg e 2,0 mg/kg. Dada a importância destes micronutrientes para o desenvolvimento da planta de cana-de-açúcar, torna-se necessário procurar técnicas analíticas mais sensíveis para sua determinação no material de referência candidato.

Outro estudo realizado foi a avaliação de fração em massa dos macronutrientes e micronutrientes em plantas cultivadas em diferentes tipos de solo. Foram escolhidas as variedades CTC11 e CTC15 e os solos Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háptico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV). Os resultados de fração de massa obtidos são apresentados nas Figuras 31 a 38.

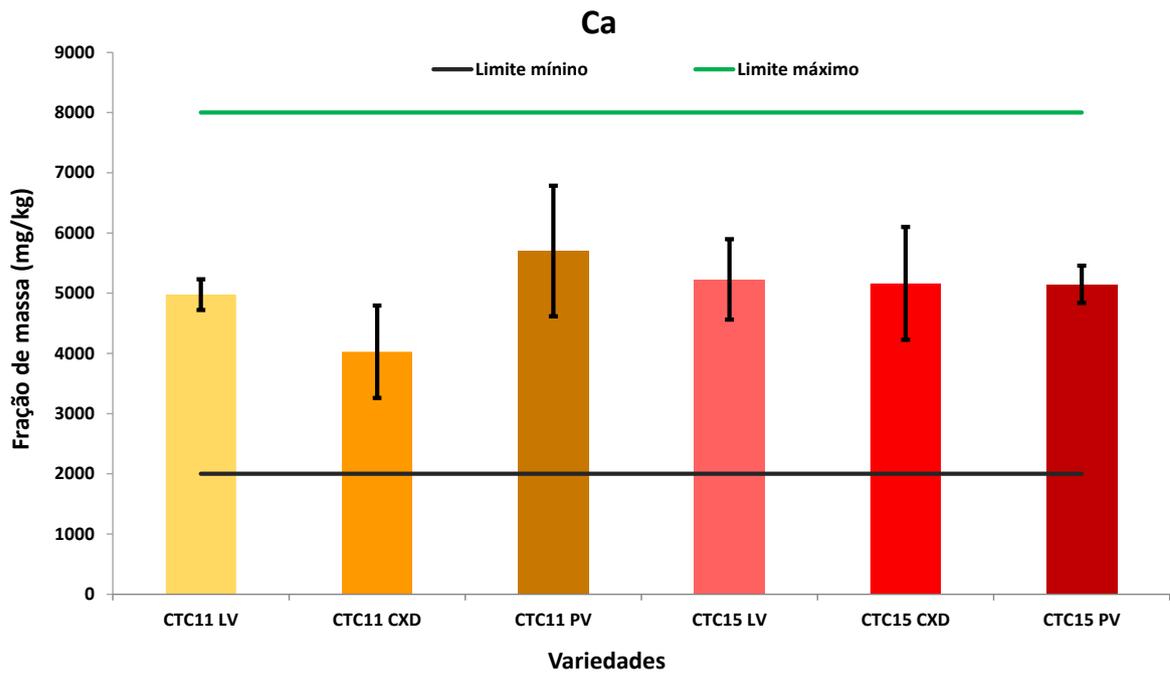


Figura 31. Fração de massa de Ca em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)

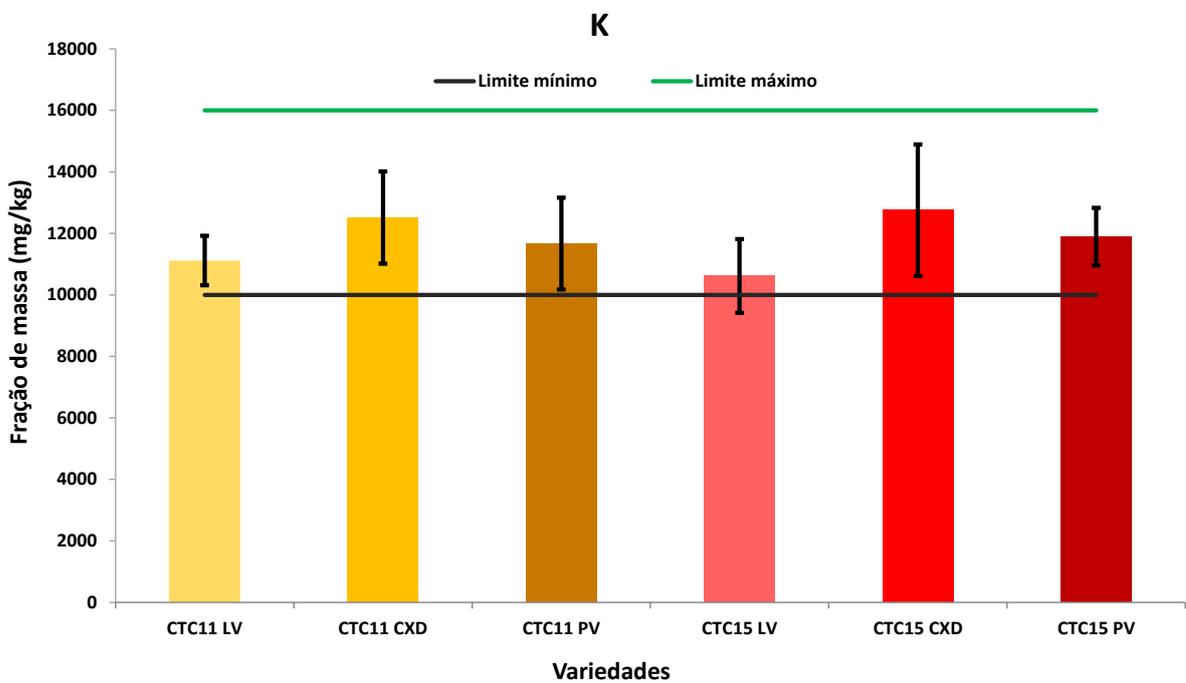


Figura 32. Fração de massa de K em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)

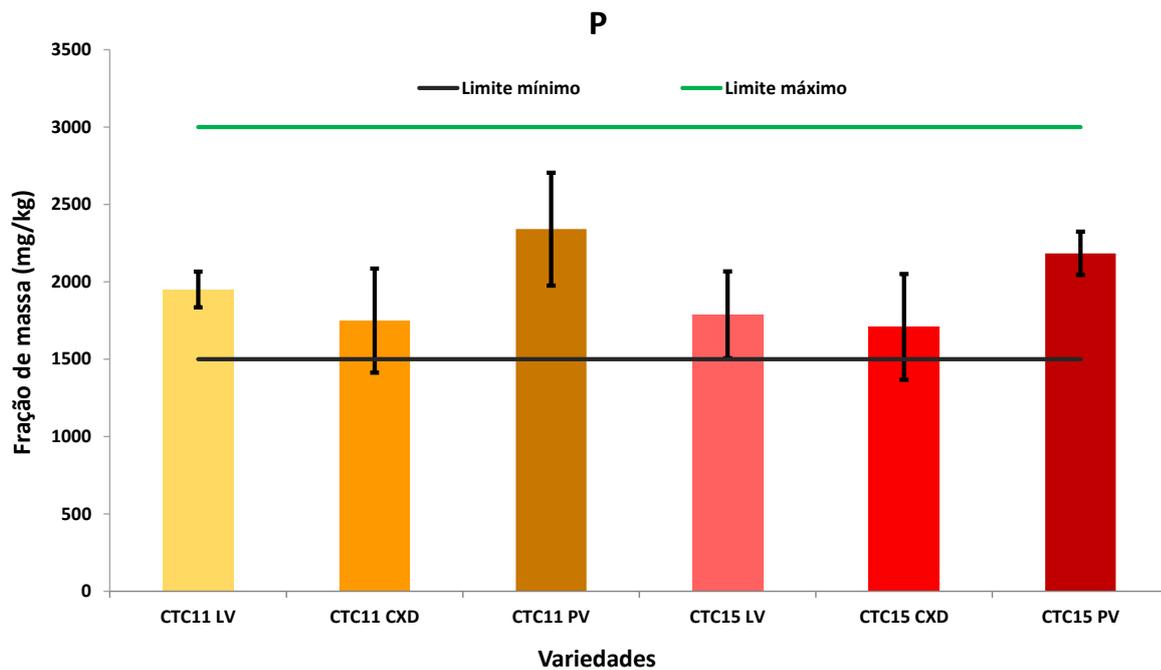


Figura 33. Fração de massa de P em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)

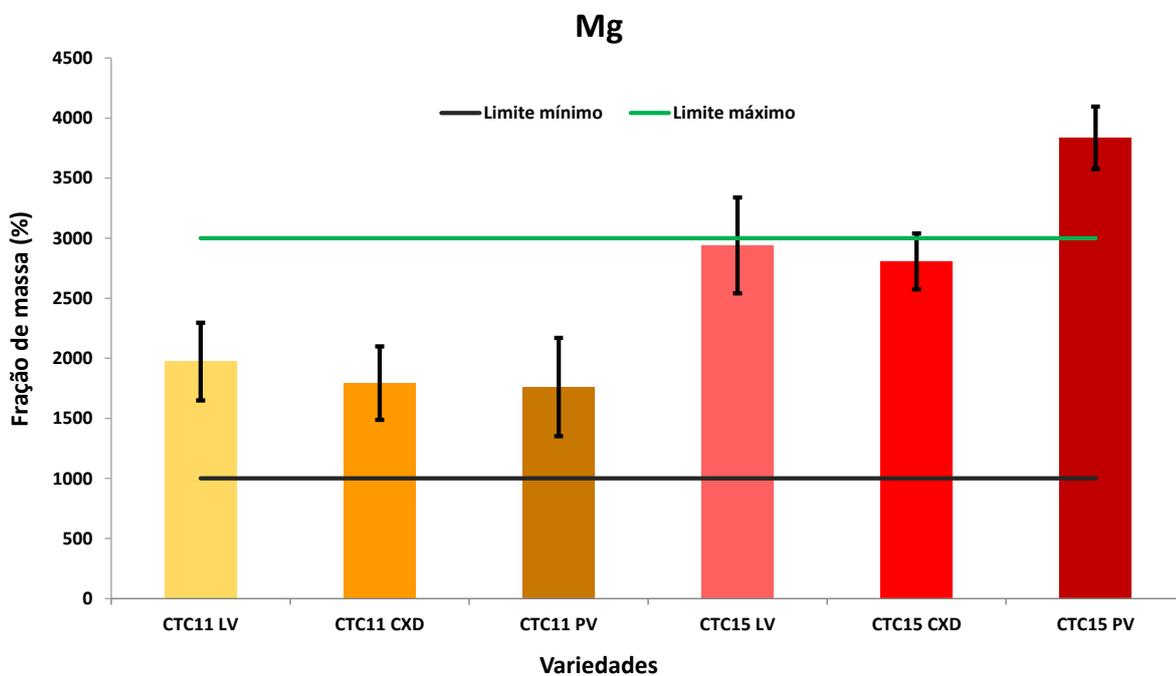


Figura 34. Fração de massa de Mg em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)

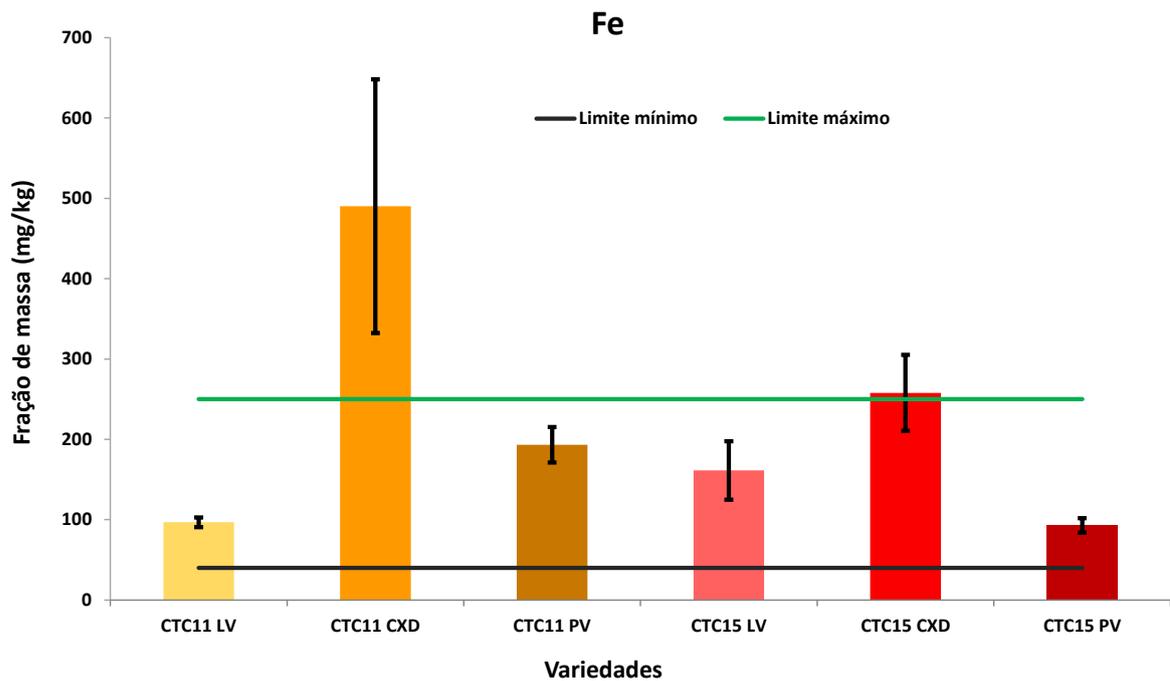


Figura 35. Fração de massa de Fe em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)

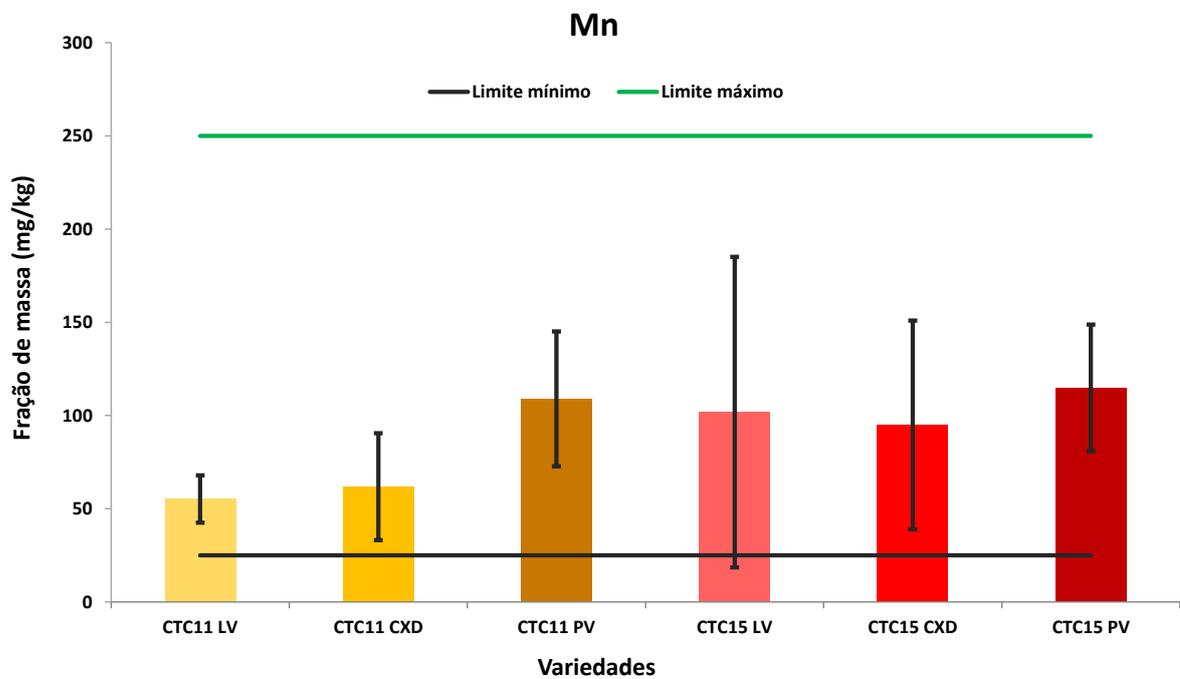


Figura 36. Fração de massa de Mn em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)

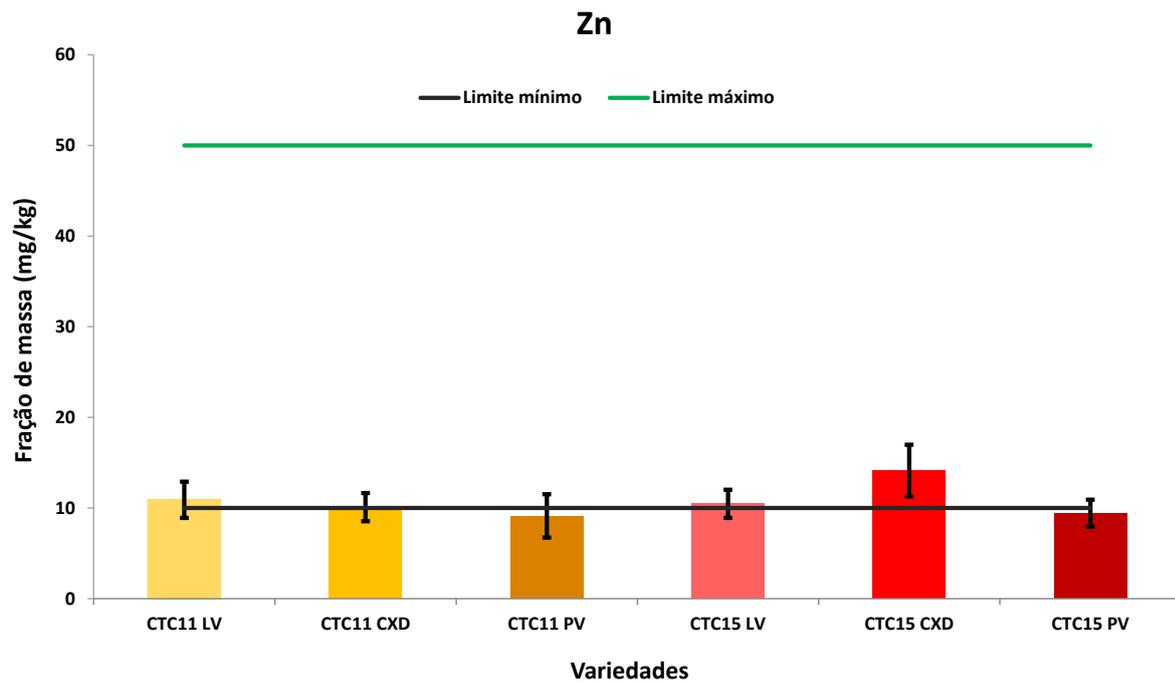


Figura 37. Fração de massa de Zn em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háptico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)

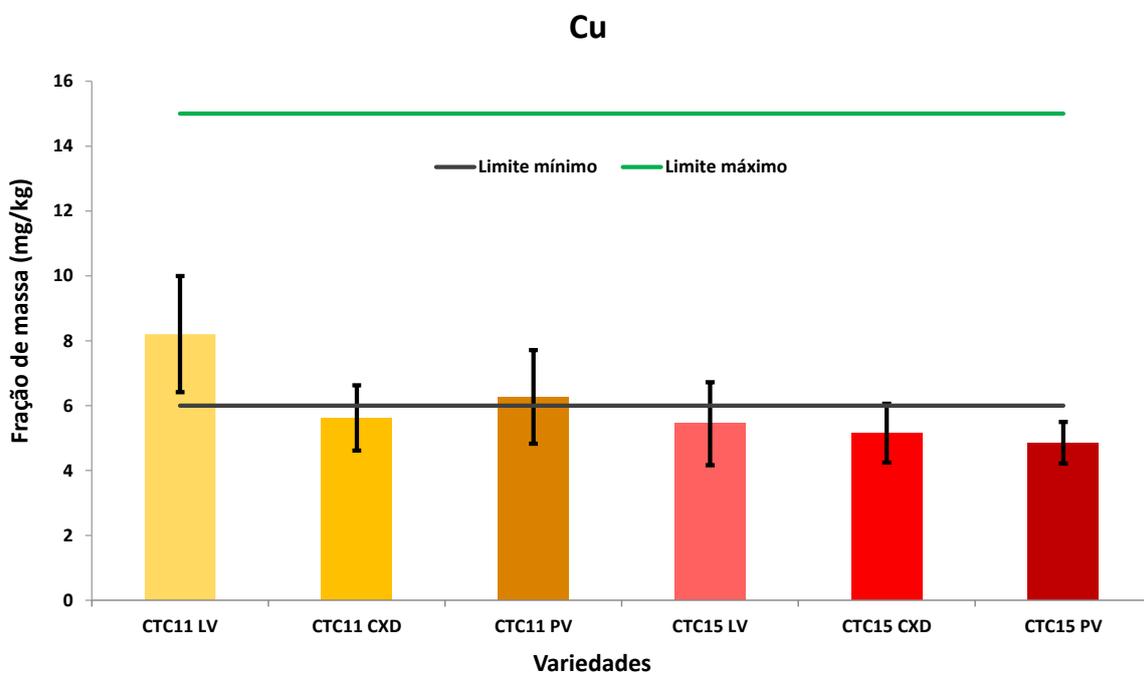


Figura 38. Fração de massa de Cu em variedades de cana-de-açúcar (CTC11, CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háptico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)

Comparando os resultados obtidos dos macronutrientes e micronutrientes nas variedades CTC11 e CTC15 com os valores recomendados na Tabela 2, foram observados níveis de fração de massa adequados para Ca, P, Mg, K, Fe e Mn. Já, frações de massa de Zn e Cu foram encontradas no limite inferior dos valores recomendados na literatura para quase todos os tipos de solo.

As frações de massa de K obtidas, considerando o desvio padrão das medições para as variedades CTC11 e CTC15, nos três tipos de solo, foram próximas. Já para o Ca, a variedade CTC11 cultivada em solo Cambissolo apresentou valores de fração de massa menores. As frações de massa de P para as variedades CTC11 e CTC15 foram próximas em solos Latossolo Vermelho e Cambissolo Háptico, maiores em solo Podzólico. Para Mg, foram encontradas frações de massa próximas para a variedade CTC11, entretanto a variedade CTC15 apresentou maiores valores de Mg em solo Podzólico.

As frações de massa de Fe obtidas foram variáveis em função do tipo de solo, observando valor maior na variedade CTC11 cultivada em solo Cambissolo. Para Mn, a variedade CTC15 apresentou frações de massas próximas nos três tipos de solos avaliados, enquanto a variedade CTC11 mostrou valor maior em solo Podzólico.

As frações de massa de Zn foram muito próximas nas variedades CTC11 e CTC15, encontrando-se no limite mínimo necessário para a produção de cana-de-açúcar. As frações de massa de Cu foram muito baixas na variedade CTC15, sendo um elemento difícil de determinar usando a técnica de ICP OES devido à diluição da amostra. Coeficientes de variação de amostragem em campo maiores que 20% foram observados para Fe na variedade CTC11 cultivada em solo Cambissolo e para Mn nas variedades CTC11 e CTC15 nos três tipos de solos estudados.

Outros elementos traços encontrados em seis variedades de cana-de-açúcar foram Br, Co, Cr, Cs, La, Na, Rb e Sc. Apesar de não haver estudos relacionados com a função destes elementos no crescimento e incremento da produtividade da cana-de-açúcar, estes elementos permitem caracterizar e diferenciar uma variedade de cana-de-açúcar de outra. A maioria das variedades de cana-de-açúcar apresenta frações de massa de macronutrientes e micronutrientes muito próximas, o que não acontece com estes elementos traços. A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos destes elementos em folhas de cana-de-açúcar.

Tabela 15. Frações de massa de elementos traços determinados em seis variedades de cana-de-açúcar por INAA. Resultados médios e desvios padrões (n=10) expressos em mg/kg de massa seca

	CTC4	CTC15	CTC17	CTC20	IACSP955000	RB966928
Br	16 ± 19	20 ± 4	15 ± 5	4,9 ± 1,5	24 ± 8	20 ± 5
Cr	11 ± 5	7,1 ± 2,7	3,6 ± 1,9	5,7 ± 2,4	6,2 ± 2,4	13,0 ± 3,7
Co	0,20 ± 0,10	0,14 ± 0,06	0,07 ± 0,03	0,16±0,04	0,13 ± 0,04	0,21 ± 0,06
Cs	0,12 ± 0,04	0,25 ± 0,10	0,32 ± 0,09	0,08 ± 0,04	0,27 ± 0,14	0,71 ± 0,26
La	1,00 ± 0,32	1,70 ± 0,70	1,40 ± 1,00	1,60 ± 0,63	0,61 ± 0,48	6,4 ± 1,9
Na	19 ± 10	12 ± 2	6,3 ± 0,8	8,2 ± 0,7	7,6 ± 2,2	5,8 ± 1,1
Rb	13 ± 3	9,3 ± 1,4	9,6 ± 1,3	24 ± 5	28 ± 15	27 ± 3
Sc	0,15 ± 0,09	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04±0,01	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01

4.1.2. Determinação de nitrogênio por método de Kjeldahl

Foram digeridas, em triplicata, as 10 amostras das variedades CTC2, CTC4, CTC11, CTC14, CTC15, CTC17, CTC20, IACSP955000, RB855156, RB966928, RB965902 e SP832847, assim como as 10 amostras das variedades CTC11 e CTC15 em duas condições de cultivo diferentes (Cambissolo e Podzólico). A Figura 39 mostra as frações de massa de N encontradas em 12 variedades de cana-de-açúcar.

Observa-se que variedades CTC2, CTC4, CTC11, IACSP955000 e RB855156 apresentaram valores ligeiramente menores daqueles estabelecidos segundo Raij et al. (1996), mostrados na Tabela 2. As frações de massa baixas podem ser devidas à perda de nitrogênio por lixiviação, desnitrificação e volatilização ocasionadas pelas chuvas e altas temperaturas durante a produção da cana-de-açúcar. Por outro lado, a variedade CTC14 mostrou fração de massa maior de N ao ser comparada com as outras variedades estudadas. Ressalta-se que esta variedade coletada foi cana-soca de primeiro corte, enquanto as outras 11 variedades foram cana-planta, e o acúmulo de N é mais observado em cana-soca do que em cana-planta.

Outro fator importante para a biodisponibilidade de N é o tipo de solo e as respostas de produtividade para cana-planta podem ser altas ou baixas dependendo da textura do solo (DINARDO-MIRANDA et al., 2010). Existe grande variabilidade na resposta das variedades aos diferentes ambientes de produção, sendo que cada variedade pode exigir um solo menos ou mais fértil para ser produzida. Por exemplo, a variedade SP832847 cultivada em Neossolo Quartzarênico, solo de menor potencial produtivo, apresentou valores adequados de N, assim como dos outros nutrientes estudados, comparativamente a àqueles estabelecidos por Rajj et al (1996).

A Figura 40 apresenta os valores de N encontrados em variedades CTC11 e CTC15 cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV). Nesta Figura, a variedade CTC11 cultivada em Latossolo Vermelho, solo de maior potencial de produtividade, apresentou frações de massa de N menores do que aquelas obtidas em solos Cambissolo e Podzólico Vermelho, solos considerados de menor potencial de produtividade. Para a variedade CTC15, as frações de massa de N em Latossolo e Podzólico Vermelho tiveram valores médios muito próximos. Observou-se que o comportamento destas duas variedades não foi semelhante para os três tipos de solo estudados, devendo ser considerada também a adaptação da variedade ao meio de produção.

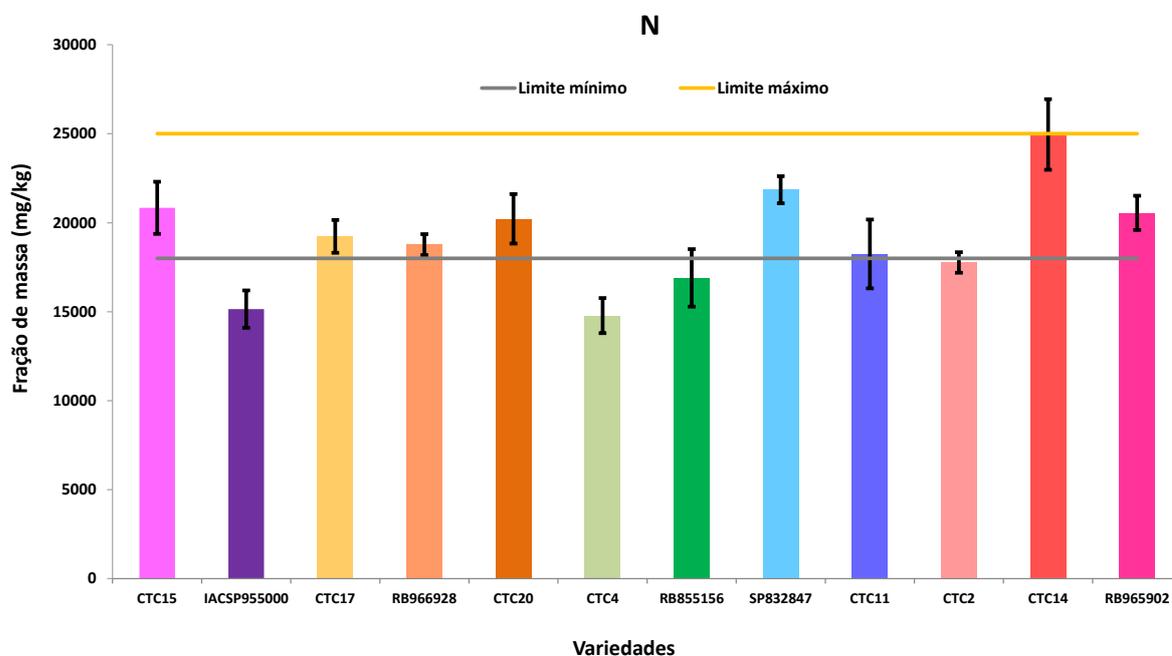


Figura 39. Fração de massa de N em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade RB965902 em Podzólico Vermelho e SP832847 em Quartzarênico

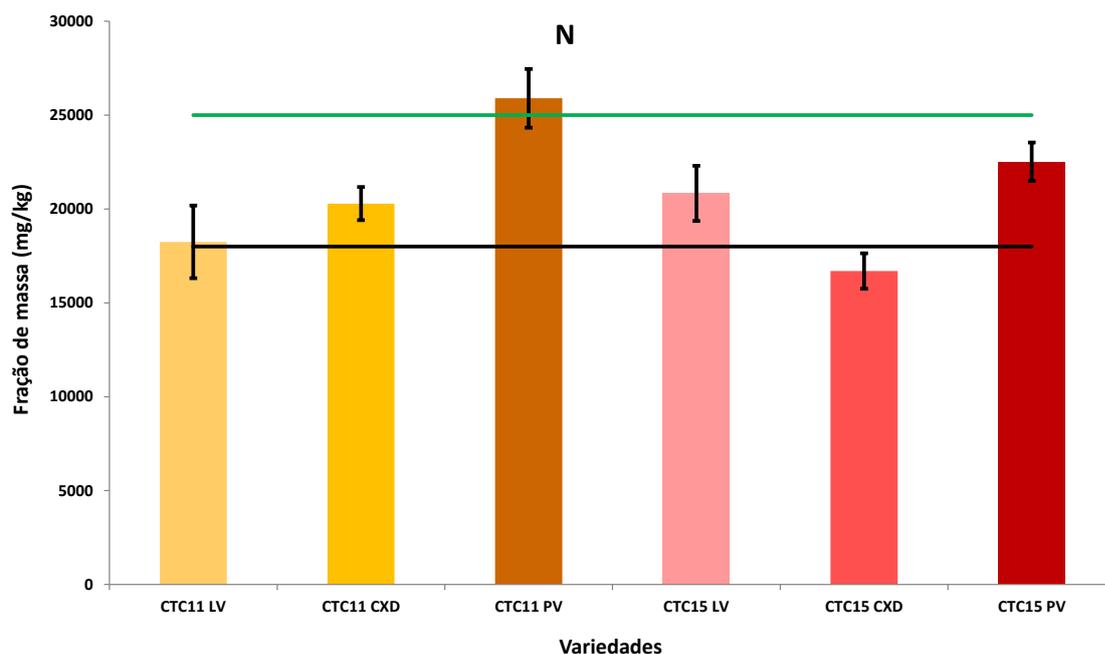


Figura 40. Fração de massa de N em duas variedades de cana-de-açúcar (CTC11 e CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)

4.1.3. Determinação de enxofre e sílicio por ED-XRF

ED-XRF foi utilizada para determinar S e Si em doze variedades de cana-de-açúcar. Estes elementos também foram determinados nas variedades CTC11 e CTC15 cultivadas em Latossolo Vermelho, Cambissolo Háplico e Podzólico Vermelho. A curva de calibração foi preparada em função de 23 variedades de cana-de-açúcar com concentrações conhecidas de S e Si. As intensidades de fluorescência de raios X de cada elemento e as concentrações estabelecidas por ICP OES foram consideradas para minimizar os erros de medição produzidos pelo efeito da matriz incrementando, assim, a precisão da técnica analítica. As amostras de folhas de cana-de-açúcar, materiais de referência e curva de calibração foram analisadas utilizando uma atmosfera de vácuo para melhorar a sensibilidade de detecção de elementos leves (Si e S).

A Tabela 16 apresenta os valores obtidos para a Equação linear da curva de calibração e coeficiente de correlação. O eixo X representa a fração de massa (mg/kg) obtida por ICP OES para cada uma das 23 variedades, enquanto o eixo Y representa as intensidades (cps/ μ A) obtidas por ED-XRF.

Tabela 16. Equação linear da curva de calibração de S e Si em folhas de cana-de-açúcar em função da fração de massa (mg/kg) e intensidade (cps/ μ A)

Elemento	K_{α} (keV)	Equação	R^2
Si	1,74	$y = 0,0018x + 0,0518$	0,9614
S	2,306	$y = 0,0069x - 0,0529$	0,9861

Os teores de S e Si variam em função da variedade, folha amostrada, idade da planta, corte e local de coleta (DINARDO-MIRANDA et al., 2010). No caso de enxofre, deficiências em cana-de-açúcar são pouco observadas, uma vez que o elemento está presente no fosfogesso, vinhaça e fertilizantes, encontrando-se sempre em níveis adequados. A Figura 41 mostra as frações de massa de S encontradas em doze variedades de cana-de-açúcar.

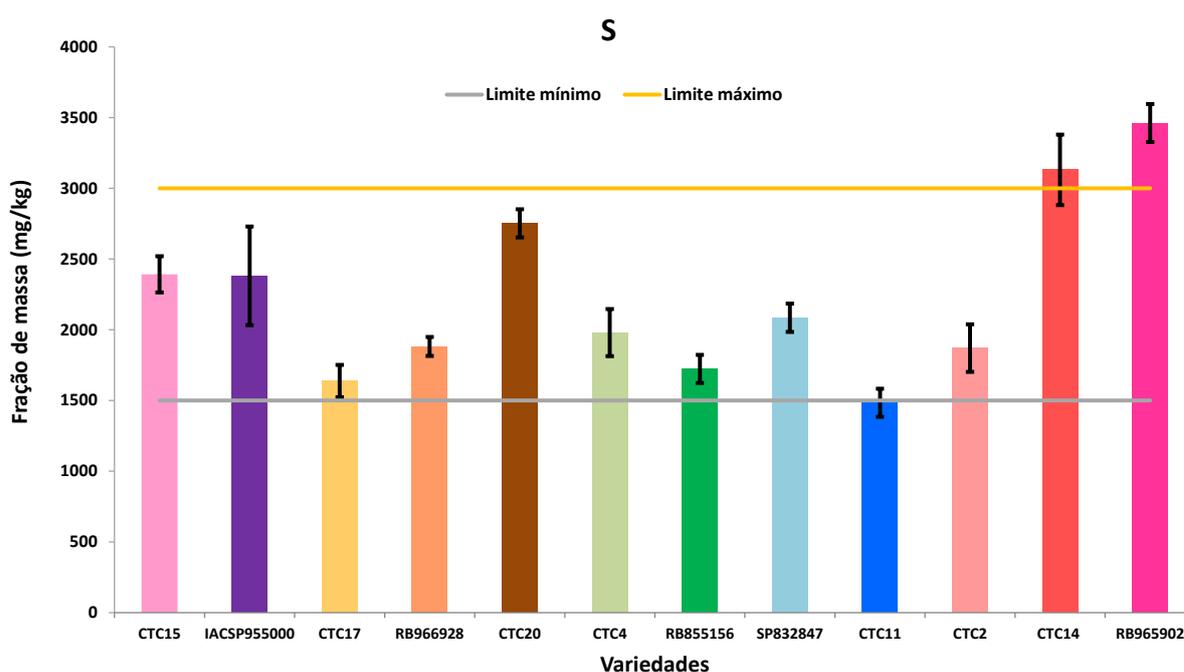


Figura 41. Fração de massa de S em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedade RB965902 em Podzólico Vermelho e SP832847 em Quartzarênico

Os valores obtidos foram comparados com a fração de massa adequada de S para cana-de-açúcar (1500 mg/kg - 3000 mg/kg) estabelecida por Raij et al (1996). Observou-se que onze variedades de cana-de-açúcar apresentam frações de massa adequadas de S, encontrando-se valores maiores nas variedades CTC14 (cana-soca, Latossolo Vermelho) e RB965902 (cana-

planta, Podzólico Vermelho). A variedade CTC11 cultivada em Latossolo Vermelho apresentou valores de S próximos ao limite inferior (1500 mg/kg).

Diferentemente da cana-planta, a cana-soca apresenta melhores respostas para os nutrientes aplicados, mas dependendo do número de corte pode ser observada queda de produtividade de cana-de-açúcar. No entanto, o solo Podzólico, considerado de menor potencial produtivo, pode fornecer nutrientes de forma adequada tal como foi observado para o N e S na variedade RB965902. A produção de cana-de-açúcar em solo Podzólico depende diretamente da variedade, exigência de nutrientes, déficit hídrico e declividade do terreno (DINARDO-MIRANDA et al., 2010).

A Figura 42 apresenta as frações de massa obtidas para duas variedades em diferentes condições de cultivo. Os valores de S obtidos representam a média de 10 amostras coletadas para cada variedade de cana-de-açúcar.

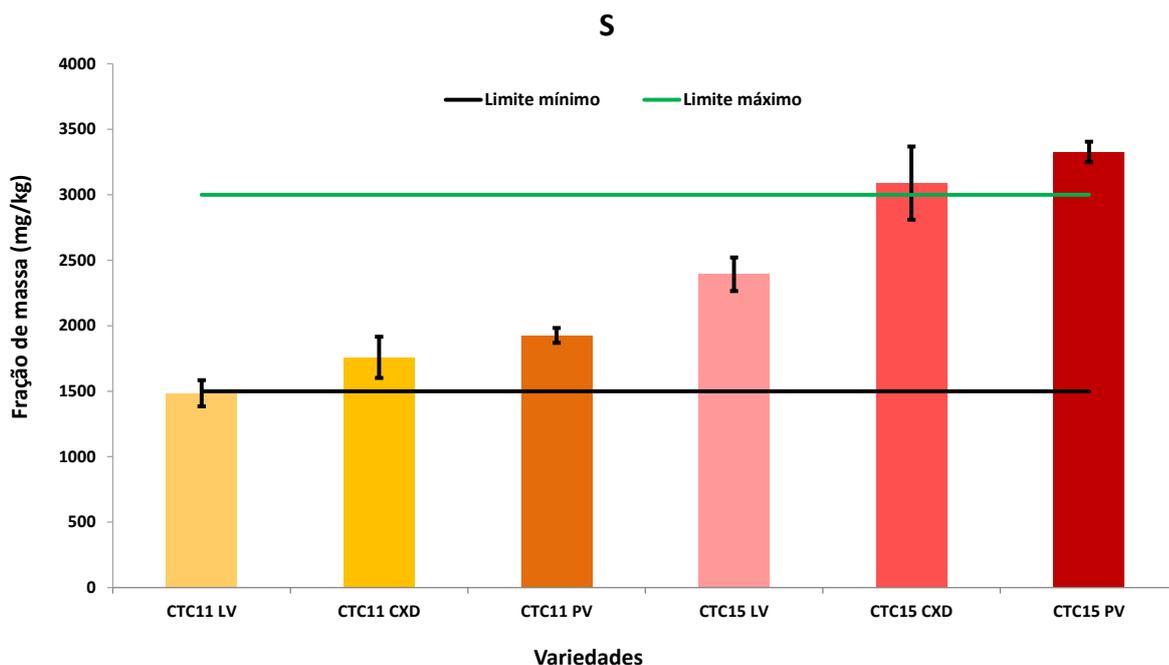


Figura 42. Fração de massa de S em duas variedades de cana-de-açúcar (CTC11 e CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)

Na Figura 42, observa-se que as frações de massa de S encontradas para a variedade CTC11 cultivada em Cambissolo e Podzólico Vermelho foram muito próximas, comportamento semelhante à variedade CTC15 cultivada em Cambissolo Háplico e Podzólico Vermelho. As variedades CTC11 e CTC15 cultivadas em Latossolo Vermelho apresentaram frações de massa menores de enxofre. Por outro lado, o silício é um elemento que cumpre um papel importante na produção de cana-de-açúcar. Este elemento fornece maior resistência às

pragas, doenças e tombamento, facilitando, desta maneira, a colheita mecanizada e o incremento na produtividade. No Brasil, faixas adequadas de Si em tecido foliar ainda não foram estabelecidas, mas uma pesquisa realizada na África do Sul mostrou níveis de Si em tecido foliar de cana-de-açúcar que devem ser considerados antes de sua aplicação, conforme Tabela 17 (DINARDO-MIRANDA et al., 2010).

Tabela 17. Frações de massa de Si (mg/kg) em folhas de cana-de-açúcar na África do Sul (DINARDO-MIRANDA et al., 2010)

Si (mg/kg)			
Muito deficiente	Deficiente	Marginal	Satisfatório
< 3500	3600 – 5000	5100 – 7500	>7500

Os resultados obtidos para Si em tecido foliar das doze variedades de cana-de-açúcar estudadas são apresentados na Figura 43. Considerando as frações de massa de Si estabelecidas na África do Sul, observaram-se quatro grupos: 1) variedades muito deficientes de Si, SP832847 e CTC17; 2) variedades deficientes de Si, CTC15 e RB855156; 3) variedades em nível aceitável de Si, RB965902, CTC2, IACSP955000, CTC4 e RB966928 e 4) variedades com níveis satisfatórios de Si, CTC14, CTC20 e CTC11.

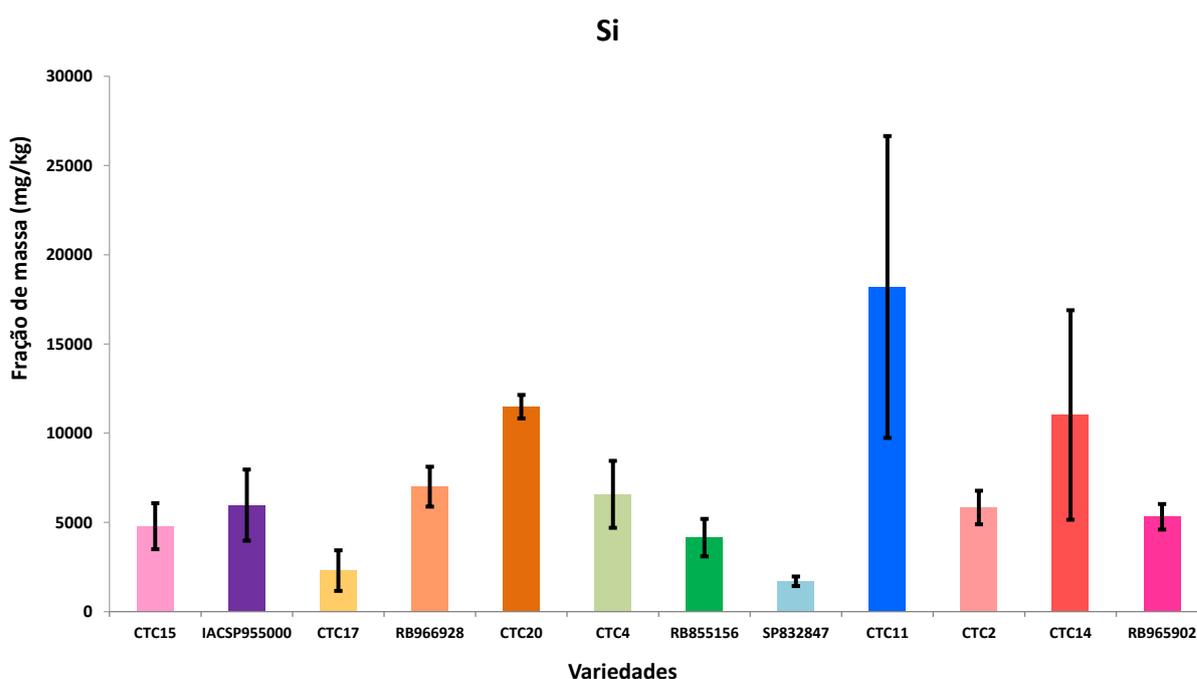


Figura 43. Fração de massa de Si em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedades RB965902 em Podzólico Vermelho e SP832847 em Quartzarênico

No entanto, as variedades CTC11, CTC14, CTC17 e IACSP955000 tiveram os maiores coeficientes de variação entre as 10 amostras coletadas por cada variedade, variando de 33% a 53%. Por outro lado, os resultados obtidos no estudo das variedades CTC11 e CTC15 cultivadas em três condições diferentes são apresentados na Figura 44.

A variedade CTC15 cultivada em Latossolo e Podzólico Vermelho apresentou valores deficientes de Si, tendo sido observado também um coeficiente de variação de 73% para amostras coletadas em solo Podzólico Vermelho. Aquela cultivada em solo do tipo Cambissolo teve valores de Si aceitáveis. A variedade CTC11 cultivada em solo do tipo Cambissolo e Podzólico Vermelho teve níveis aceitáveis de Si. No entanto, a variedade cultivada em Latossolo Vermelho apresentou níveis satisfatórios de Si, assim como um coeficiente de variação de 47% entre as amostras analisadas.

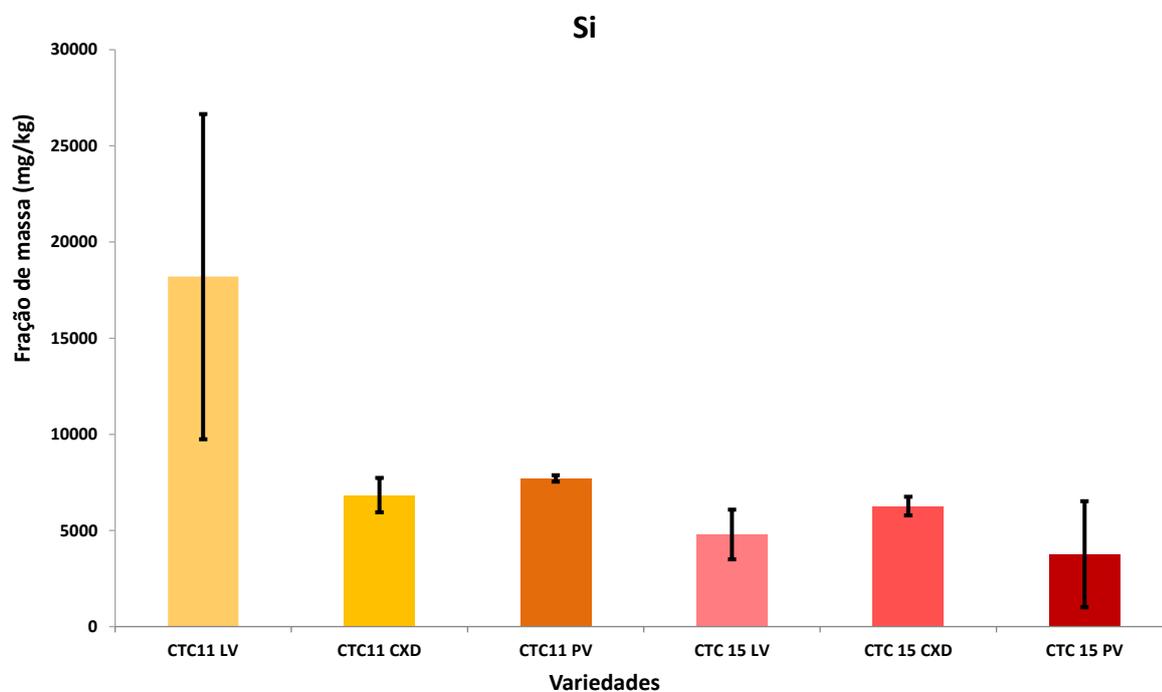


Figura 44. Fração de massa de Si em duas variedades de cana-de-açúcar (CTC11 e CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo Háplico (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)

4.1.4. Determinação de cinzas

A determinação de cinzas é um parâmetro importante no processamento da cana-de-açúcar, já que um teor alto de cinzas pode prejudicar a pureza do caldo e a qualidade do açúcar. As cinzas de folhas de cana-de-açúcar são consideradas uma fonte de nutrientes, principalmente Si, Ca e K, apresentando grande aplicação na adubação de solo e uso de fertilizantes. Neste

estudo, foram calcinadas doze variedades de folhas de cana-de-açúcar, em triplicata, totalizando 120 amostras. A Figura 45 mostra os resultados obtidos de cinzas em folhas de cana.

As variedades CTC11, CTC14, CTC20 e RB965902 apresentaram teores de cinza maiores, enquanto a SP832847 teve o menor teor. Os resultados obtidos estão relacionados com as frações de massa de macronutrientes, micronutrientes e Si encontradas nestas variedades de cana-de-açúcar.

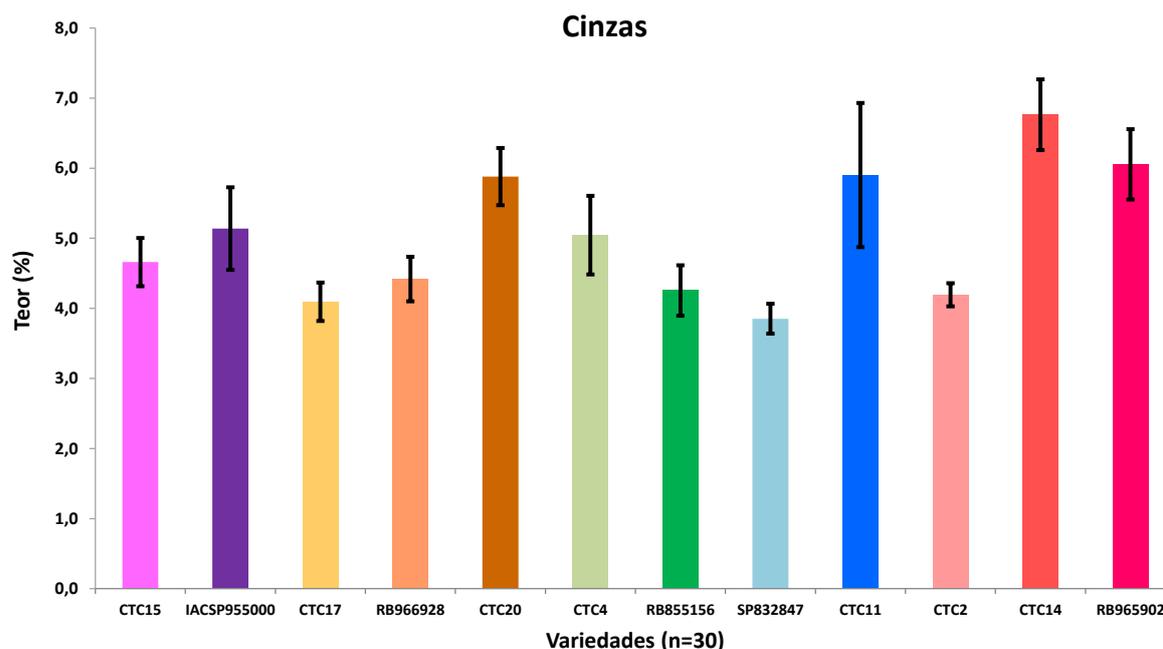


Figura 45. Teor de cinzas em dez variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Latossolo Vermelho, variedades RB965902 em Podzólico Vermelho e SP832847 em Quartzarênico

Na Figura 46, são apresentados os resultados obtidos de cinzas (%) das variedades CTC11 e CTC15 cultivadas em três condições diferentes.

Este estudo mostrou que a variedades CTC11 e CTC15 tiveram teores similares de cinzas nos três tipos de solos estudados. A variedade CTC11 cultivada em Latossolo Vermelho teve maiores teores de cinzas do que as cultivadas em Cambissolo e Podzólico Vermelho, assim como também o coeficiente de variação foi maior ao observado nas outras condições de cultivo. Cabe ressaltar que, a contribuição de cada nutriente pode variar em função da variedade e tipo do solo, tal como foi apresentado para Fe, Mg, N, S e Si (Seção 4.1.1 a 4.1.3).

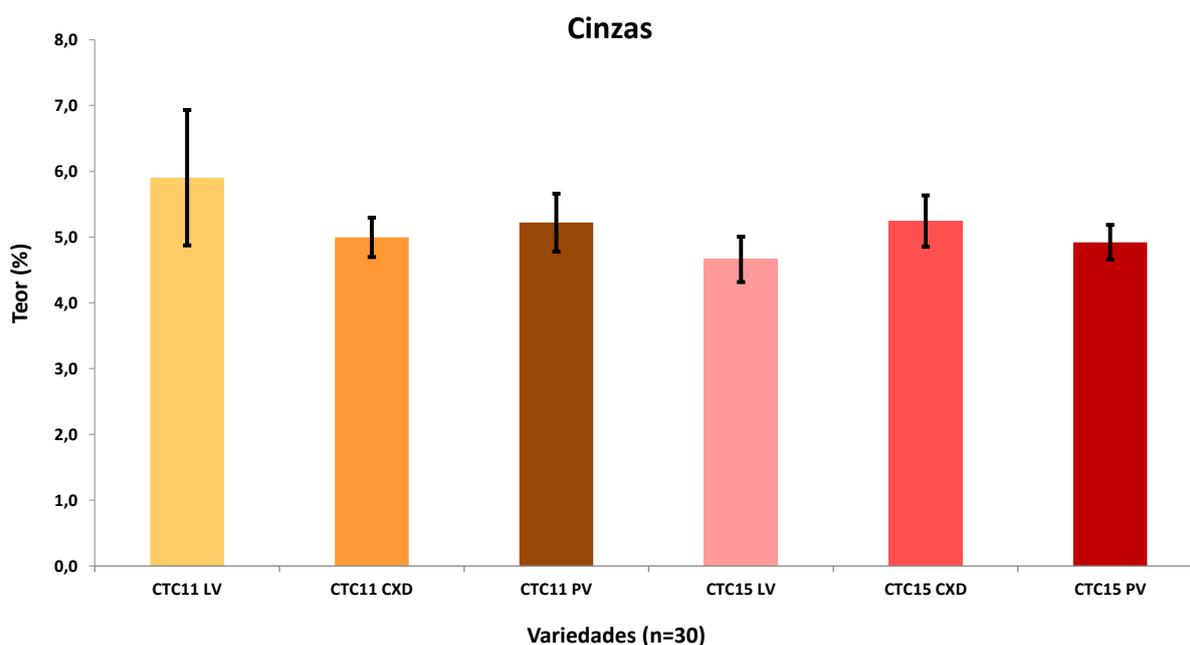


Figura 46. Teor de cinzas em duas variedades de cana-de-açúcar (CTC11 e CTC15) cultivadas em Latossolo Vermelho, Cambissolo (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)

4.2. Seleção da variedade de cana-de-açúcar

A seleção da variedade de folhas de cana-de-açúcar para o preparo do material de referência candidato é uma das etapas mais importantes deste estudo, uma vez que a variedade selecionada deve ser representativa das demais variedades cultivadas e encontrar-se em condições nutricionais adequadas para alta produtividade da cana-de-açúcar.

A escolha da variedade foi realizada em função dos resultados de fração de massa de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S), micronutrientes (Fe, Mn, Cu e Zn) e Si, obtidos para doze das variedades de cana-de-açúcar analisadas (CTC2, CTC4, CTC11, CTC14, CTC15, CTC17, CTC20, IACSP955000, RB855156, RB965902, RB966928 e SP832847). Foram considerados também os valores de umidade residual e coeficientes de variação da amostragem em campo (RSD), assim como as características e destaques agrônômicos próprios de cada variedade, *i.e.*, teor de sacarose, resistência a doenças e produtividade.

Os resultados de macronutrientes e micronutrientes mostraram-se frações de massa adequados para quase todas as variedades de cana-de-açúcar. No entanto, algumas variedades apresentaram Fe, Mg, Mn, N e S em níveis críticos, acima da faixa adequada necessária para a

produção da cana. Assim, estes elementos podem ser considerados tóxicos já que afetam a disponibilidade de outros elementos essenciais como Cu, K e Zn, e o desenvolvimento da cana.

As variedades que apresentaram elementos essenciais em níveis críticos acima da faixa adequada de suficiência para a produção de cana-de-açúcar foram CTC4 (Fe > 250 mg/kg), RB965902 (Fe > 250 mg/kg, Mg > 3000 mg/kg; Mn > 250 mg/kg; e S > 2000 mg/kg) e CTC14 (N > S > 2000 mg/kg). Frações de massa elevadas de S incrementam a acumulação de Mn e Al, afetando o pH do solo (ácido) e disponibilidade de outros nutrientes (RAIJ et al., 1996; MOORE; BOTHA, 2014). Por outro lado, foram observadas deficiências de N para as variedades CTC4 (14783 mg/kg) e IACSP955000 (15148 mg/kg), segundo o valor estabelecido (<16000 mg/kg) por Raij et al. (1996) e Malavolta (2006).

No caso do Zn, a maioria das variedades apresentou frações de massa no limite mínimo da faixa de suficiência adequada, com exceção da variedade RB966928 (<10 mg/kg). Já para o Cu, as frações de massa foram consideradas no limite inferior crítico para quase todas as variedades (< 6 mg/kg), enquanto a variedade RB965902 apresentou deficiência de Cu (5 mg/kg). A limitação destes micronutrientes é devida a sua forma disponível no solo à planta.

Por outro lado, os resultados obtidos para Si mostraram deficiência (< 5000 mg/kg) deste elemento nas variedades CTC15 (4785 mg/kg), CTC17 (2298 mg/kg), RB855156 (4147 mg/kg) e SP832847 (1699 mg/kg), e um nível aceitável (5100 mg/kg – 7500 mg/kg) nas variedades CTC2 (5831 mg/kg), CTC4 (6577 mg/kg), IACSP955000 (5968 mg/kg), RB965902 (5315 mg/kg) e RB966928 (7000 mg/kg) ao serem comparados com os dados obtidos para cana-de-açúcar na África do Sul apresentados na Tabela 18 (DINARDO-MIRANDA et al., 2010).

Os valores de umidade residual encontrados nas oito variedades de cana-de-açúcar ficaram entre 4,5 % a 7,0 %. Observou-se que as variedades RB966968 e CTC17 apresentaram teores mais baixos do que as outras variedades.

As Tabelas 18 e 19 apresentam os valores de desvio padrão relativo (RSD) para a amostragem em campo de macronutrientes, micronutrientes e Si estabelecidos em dez pontos amostrais das doze variedades de cana-de-açúcar.

As variedades selecionadas apresentaram baixos coeficientes de variação de macronutrientes (< 30%) entre as amostras coletadas. Para Ca, a faixa de coeficientes de variação foi 5,12 % (CTC11) a 21,8% (RB965902). A variação de Mg entre os pontos amostrados de uma variedade foi 7,61% (CTC4) a 21,1% (CTC14). O P apresentou variação de 4,20 % (CTC2) a 18,7% (CTC17). Já a variação de K nos pontos amostradas da mesma

variedade foi 3,47% (RB966928) a 15,1% (RB965902). O N variou de 3,15 % (RB966928) a 10,6 % (CTC11), enquanto o S foi 3,59 (RB966928) a 14,6 % (IACSP955000).

Tabela 18. Valores de coeficientes de variação relativos (RSD) dos macronutrientes em doze variedades de cana-de-açúcar

Variedade	RSD (%)					
	Ca	P	K	Mg	N	S
CTC2	7,53	4,20	4,58	6,50	3,26	8,99
CTC4	13,1	15,2	8,87	7,61	6,71	8,40
CTC11	5,12	5,94	7,23	16,4	10,6	6,69
CTC14	12,4	9,71	8,85	21,1	7,97	7,96
CTC15	12,8	15,7	7,62	13,6	7,04	5,37
CTC17	18,6	18,7	9,91	13,8	4,80	6,99
CTC20	15,6	14,6	12,4	19,9	6,86	3,63
IACSP955000	20,2	8,57	7,06	19,8	6,93	14,6
RB855156	21,8	10,8	9,45	11,5	9,57	5,80
RB965902	17,1	10,1	15,1	15,5	4,71	3,88
RB966928	15,5	15,2	3,47	13,1	3,15	3,59
SP832847	11,3	10,8	13,6	19,3	3,50	4,80

A Tabela 19 mostra os valores de RSD (amostragem em campo) para os micronutrientes e Si estabelecidos em dez pontos amostrais das doze variedades de cana-de-açúcar.

Os valores obtidos para Mn foram adequados para todas as variedades, no entanto foram observados altos coeficientes de variação (31% - 115%) entre as amostras coletadas para as variedades CTC4, CTC15, CTC17, IACSP955000, RB855156 e RB965902. Observaram-se também altos coeficientes de variação para Fe nas variedades CTC4 (57,3 %), RB855156 (33,9 %) e RB965902 (34,5 %). Para o Si, altos coeficientes de variação de amostragem em campo (> 30 %) foram observados nas variedades CTC11 (46,5 %), CTC14 (53,3 %), CTC17 (49,6 %) e IACSP955000 (33,4 %).

Tabela 19. Valores de coeficientes de variação relativos (RSD) de micronutrientes e Si em doze variedades de cana-de-açúcar

Variedade	RSD (%)				
	Fe	Mn	Zn	Cu	Si
CTC2	7,73	31,7	39,3	20,6	16,1
CTC4	57,3	72,7	29,3	12,6	28,5
CTC11	6,18	23,1	18,3	21,8	46,5
CTC14	12,3	11,7	12,3	21,1	53,3
CTC15	22,8	82,0	15,9	19,3	27,1
CTC17	13,8	47,7	16,7	10,12	49,6
CTC20	29,6	29,7	13,3	15,4	5,75
IACSP955000	29,8	115	16,1	16,1	33,4
RB855156	33,9	41,1	16,3	16,8	25,4
RB965902	34,5	31,4	7,90	20,3	13,4
RB966928	16,9	29,8	11,4	14,9	16,1
SP832847	20,7	29,8	18,0	19,2	16,1

Nesse sentido, considerando-se os resultados obtidos de macronutrientes, micronutrientes e coeficientes de variação de amostragem em campo, foram inicialmente selecionadas três variedades de cana-de-açúcar (CTC20, RB966928 e SP832847) como candidatas para a preparação do material de referência. Estas variedades apresentaram valores nutricionais adequados de macronutrientes e micronutrientes, assim como baixos coeficientes de variação relativos (<30%).

Destas três variedades, RB966928 foi escolhida devido a seus destaques agrônomicos como alta produtividade (ambiente de produção do tipo A), tolerância a pragas e doenças e alto teor de sacarose. Além disso, a variedade RB966928 é a quarta mais plantada no Brasil e a segunda mais plantada no estado de São Paulo. Análise estatística supervisionada de

discriminante linear apresentada nas Figuras 48 e 49 corroboraram a escolha da variedade RB966928.

4.2.1. Análise estatística

A análise estatística multivariada supervisionada de análise de discriminante linear (LDA) foi empregada para discriminar e classificar variedades de cana-de-açúcar em função da composição nutricional e elementos traços. Os testes avaliados para determinar as diferenças dentro e entre variedades e escores de coeficientes foram Wilk's lambda, Pillai's trace, Hotelling-Lawley e Roy's Root.

A Figura 47 apresenta o resultado obtido de LDA para as variedades CTC4, CTC15, CTC17, CTC20, IACSP955000 e RB966928, empregando Br, Ca, Co, Cr, Cs, Fe, K, La, Na, P, Rb, Sc e Zn determinados por INAA.

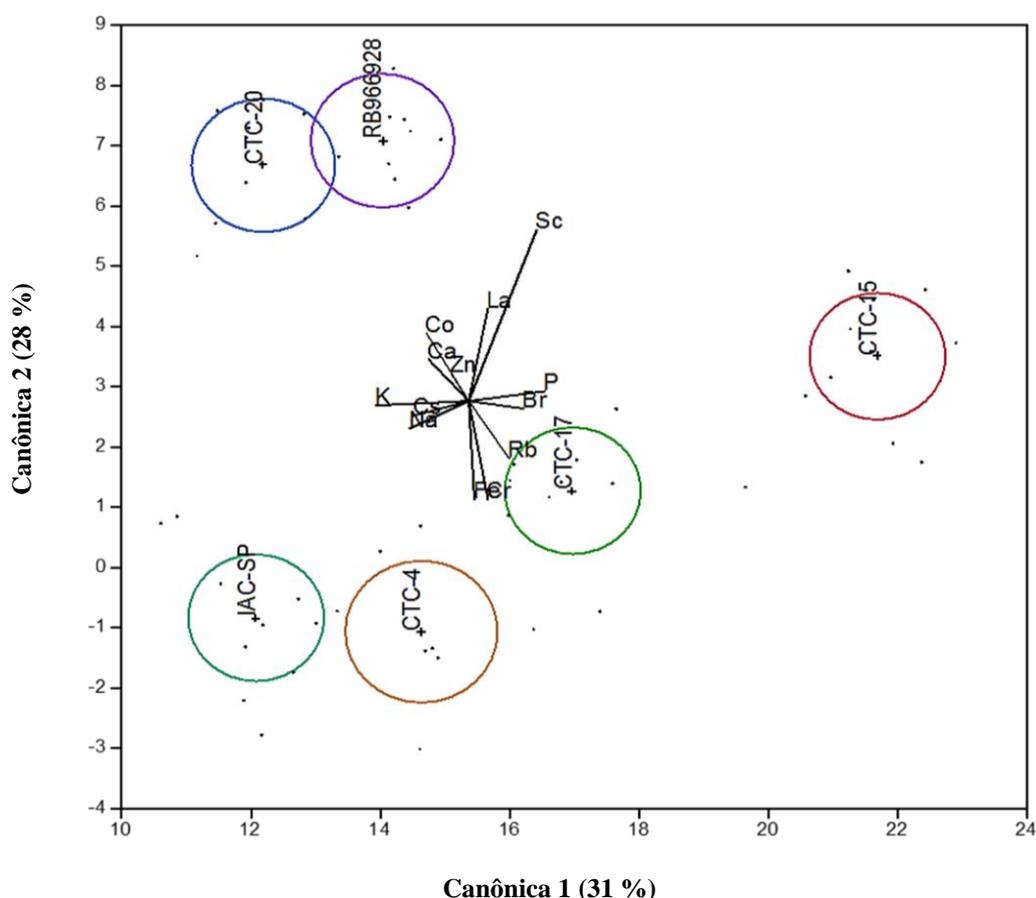


Figura 47. LDA para seis variedades de cana-de-açúcar em função de Br, Ca, Co, Cr, Cs, Fe, K, La, Na, P, Rb, Sc e Zn

LDA permitiu a discriminação das seis variedades usando 59 % da informação total. A variedade CTC15 foi diferenciada em função das frações de massa de Br, P e Sc, enquanto Rb, Cr e Br permitiram a separação da variedade CTC17. As variedades CTC20 e RB966928 foram

agrupadas pelas frações de massa de Ca, K, Co e Zn. A variedade CTC4 foi influenciada pelo Fe, enquanto IACSP955000 por K, Cs e Na, sendo observados 6 grupos.

Outro estudo realizado foi utilizando LDA para avaliar o comportamento das doze variedades em função dos macronutrientes Ca, K, Mg e P determinados por ICP OES e N por Kjeldahl. A Figura 48 apresenta o resultado obtido de LDA para as doze variedades de cana-de-açúcar.

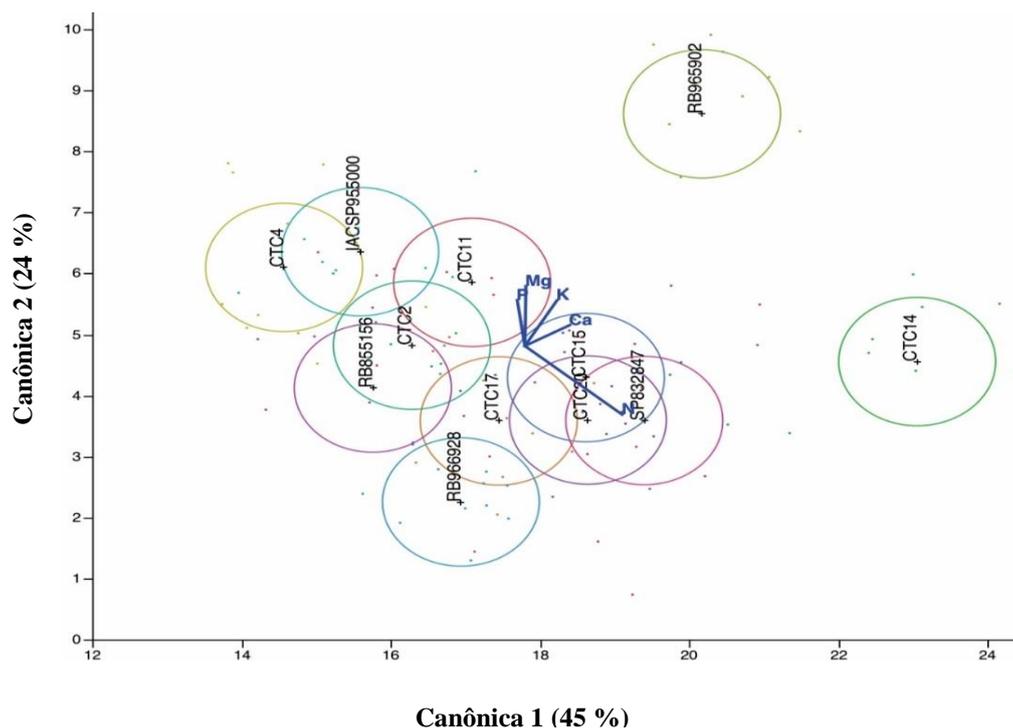


Figura 48. LDA para doze variedades de cana-de-açúcar em função de Ca, K, Mg, N e P

A Figura 48 mostra três grupos bem diferenciados: o primeiro grupo constituído por dez variedades de cana-de-açúcar que apresentam composição similar em Ca, K, Mg, N e P; o segundo grupo pela CTC14, discriminada em função de N e o terceiro grupo pela RB965902 em função de Ca, K e Mg. A quantidade de informação total utilizada foi de 69 %.

Por outro lado, a contribuição dos macronutrientes (Ca, K, Mg, N e P) e micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn) na diferenciação de variedades foi também estudada. A Figura 49 apresenta o gráfico de LDA para as 12 variedades de cana-de-açúcar avaliadas por ICP OES. A Figura 49 mostrou dois grupos bem diferenciados. Onze variedades de cana-de-açúcar foram agrupadas no mesmo grupo, sendo observado que a variedade CTC14 é discriminada pelo N e a CTC4 pelo Fe. Já a RB965902 foi discriminada das onze variedades principalmente pelo Mg. LDA permitiu a diferenciação destas variedades usando 62 % da informação total.

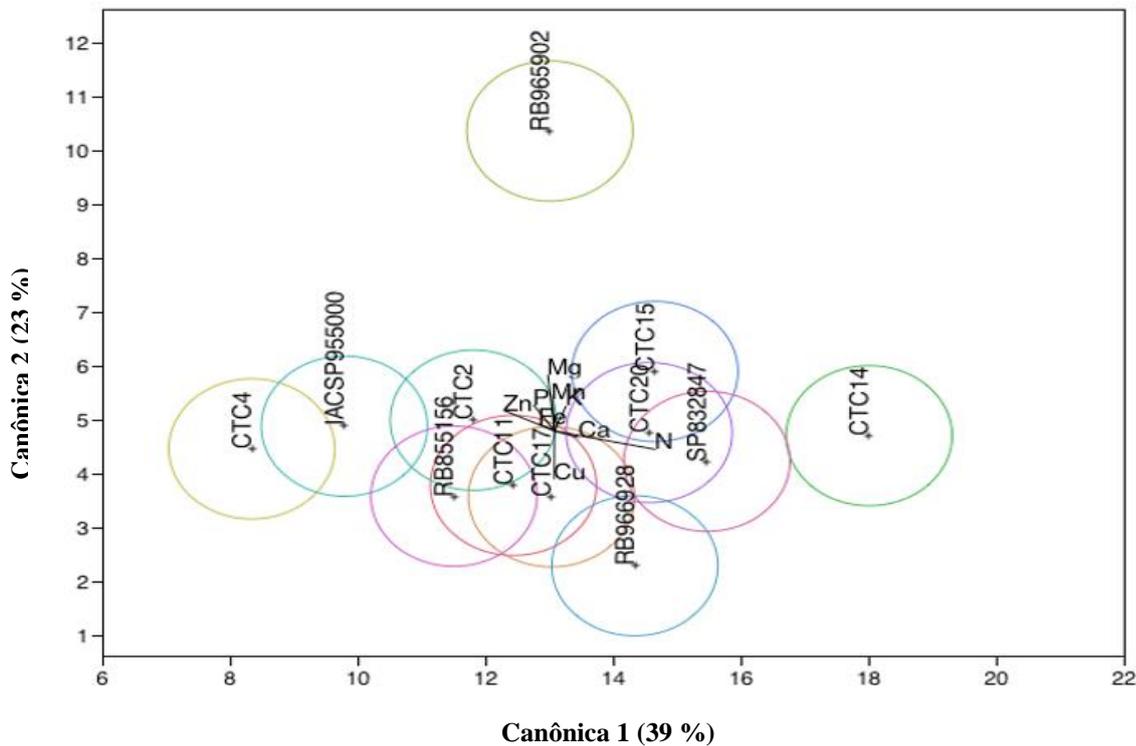


Figura 49. LDA para macronutrientes (Ca, K, Mg, N e P) e micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn) estabelecidos em doze variedades de cana-de-açúcar

As informações estatísticas de LDA mostram que a variedade RB966928 escolhida para a preparação do material de referência é representativa das outras dez variedades, já que possui similar composição de macronutrientes e micronutrientes determinados por ICP OES, assim como valores de RSD (< 30%) e umidade adequados.

Outro estudo relevante foi o efeito das condições de cultivo (tipo de solo) no crescimento e desempenho das variedades. LDA mostrou que as duas variedades podem ser discriminadas em função do tipo de solo.

A Figura 50 apresenta os resultados para as duas variedades. A variedade CTC15 cultivada em solo podzólico é diferenciada pelo Mg, enquanto a variedade CTC11 cultivada no mesmo tipo de solo é diferenciada pelo N. Em solo cambissolo, foi observado que a variedade CTC15 é discriminada da variedade CTC11 em função de Fe e K. Já em latossolo vermelho, a composição nutricional das variedades CTC11 e CTC15 foi similar para Ca, K, P e N, sendo agrupadas a uma distância mais próxima. A quantidade de informação utilizada por LDA foi de 83 %.

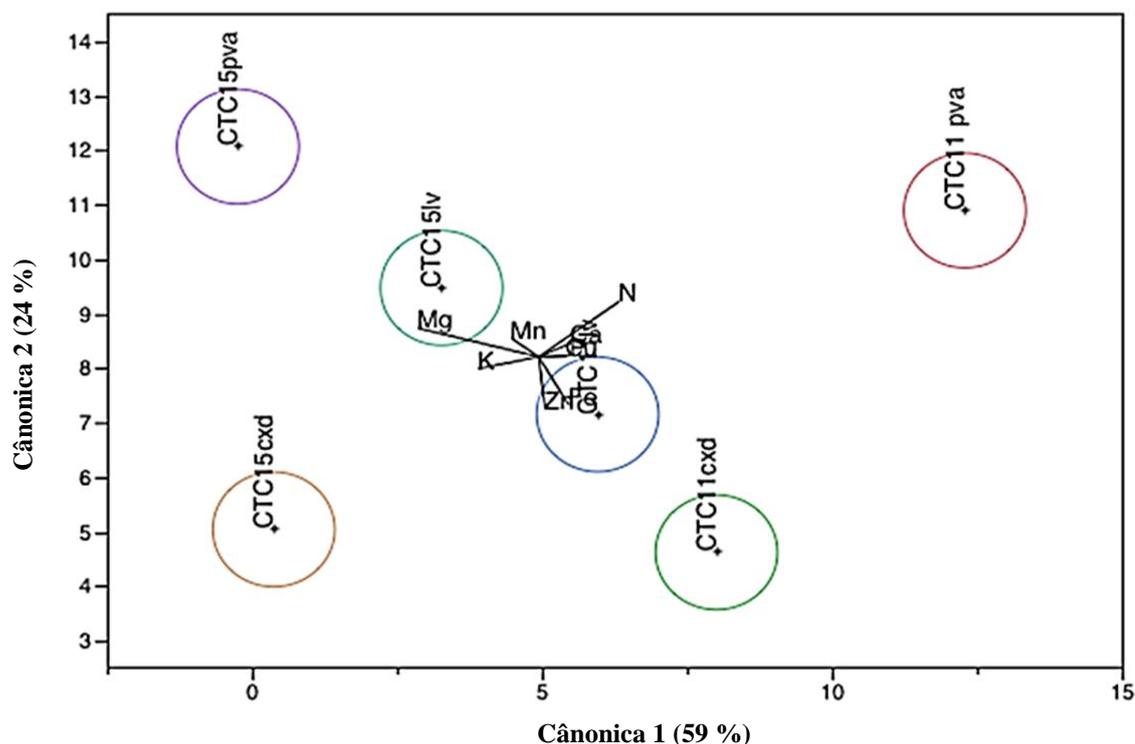


Figura 50. LDA em função dos nutrientes Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, N, P e Zn estabelecido para as variedades CTC11 e CTC15 cultivadas em Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo (CXD) e Podzólico Vermelho (PV)

4.3. Produção de material de referência

No preparo do material candidato, as etapas de limpeza, secagem e moagem são de grande relevância. Os procedimentos devem ser adequados para não afetar a composição do material por contaminação ou perda de elementos químicos de interesse. Assim, o procedimento de limpeza do material foi realizado a seco tirando-se a poeira superficial das folhas, enquanto o processo de secagem foi liofilização já que conserva melhor as características físicas do material.

Anteriormente à moagem do material de referência, foram realizados testes para otimizar o procedimento. Amostras de sacrifício de folhas de cana-de-açúcar secas em estufa, assim como do material candidato seco por liofilização, foram empregados para realizar testes usando três tipos de moinho, ou seja, moinho de facas, moinho de rotor e moinho de bolas.

Objetivando a escolha do tipo de moinho e otimização do procedimento de moagem para o preparo do material candidato, foram considerados três fatores importantes: composição das peças do moinho, para evitar ao máximo contaminação com elementos de interesse,

capacidade de moagem, devido ao grande volume de amostra, e tamanho de partícula final obtido, fundamental para a homogeneidade do material.

No moinho de facas, foram utilizadas lâminas de titânio e recipientes coletores de amostra de polipropileno. No moinho de rotor, foram utilizados rotor e peneira de 80 μm , ambos em aço inox, e um recipiente coletor de amostra revestido de teflon. Já o moinho de bolas foi composto de frascos e bolas revestidas de coríndon sintetizado. Os resultados da distribuição de partículas obtidos para o material seco em estufa (amostras A, B, C, D) e liofilizado (amostras E, F, G) são apresentados nas Figuras 51 a 57.

Na Figura 51, usando moinho de facas, foram observados tamanhos de partículas de aproximadamente 2000 μm , enquanto na Figura 52, utilizando adicionalmente uma peneira de 250 μm , foram encontrados tamanhos de partículas de 518 μm com 90 % de volume acumulado. Apesar da redução do tamanho de partícula, foi ainda necessário usar outro tipo de moinho para se chegar a um tamanho de partícula adequado para o material candidato. As Figuras 53 e 54 mostram os resultados obtidos usando moinhos de facas, rotor e peneiras granulométricas de 250 μm e 100 μm , sendo observados melhores valores usando a peneira de 100 μm . Após esses resultados para amostras secas em estufa, foi avaliado o uso de moinho de facas, rotor e peneira de 100 μm em amostras liofilizadas, observando-se partículas menores de 200 μm com 90 % de volume acumulado (Figura 55).

Não obstante, algumas dificuldades foram encontradas no processamento do material relacionadas com o tempo de moagem e a quantidade de material residual gerado que não pôde ser novamente processado. Com isso, foi avaliado o uso de moinho de facas e bolas, observando-se na Figura 56 uma distribuição de partículas não uniforme e tamanho de partículas de 204 μm . No entanto, melhores resultados foram obtidos usando as mesmas condições de moagem e peneirando o material a 100 μm .

Na Figura 57, observa-se uma melhor distribuição das partículas e tamanhos de partículas menores que 100 μm com 90 % de volume acumulado.

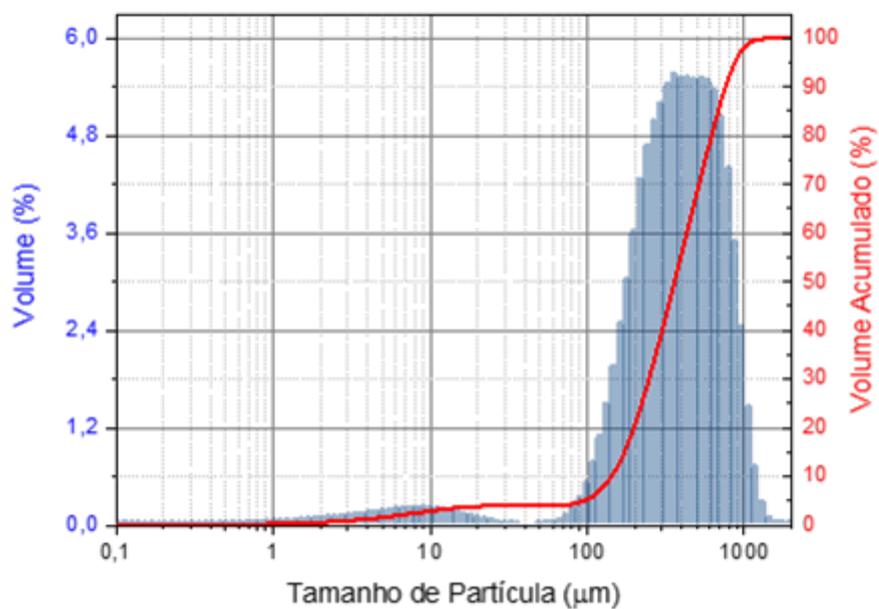


Figura 51. Amostra A, seca em estufa, processada em moinho de facas

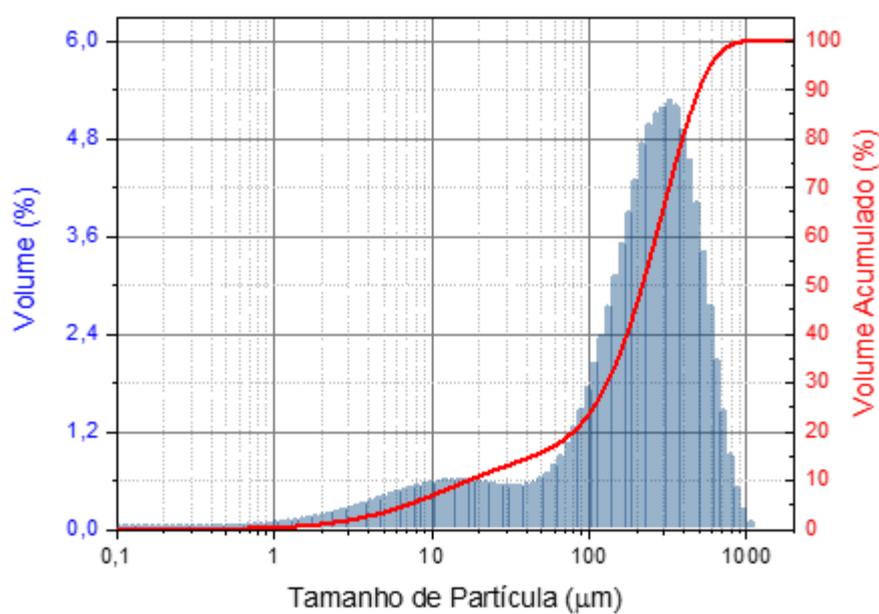


Figura 52. Amostra B, seca em estufa, processada em moinho de facas e peneirada em nylon de 250 μm

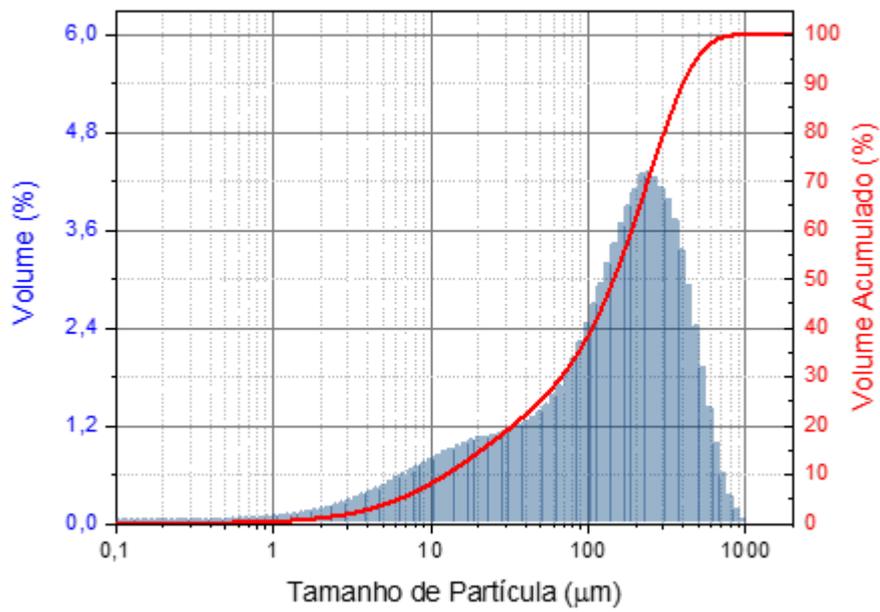


Figura 53. Amostra C, seca em estufa, processada em moinho de facas e moinho de rotor, peneirada em nylon de 250 μm

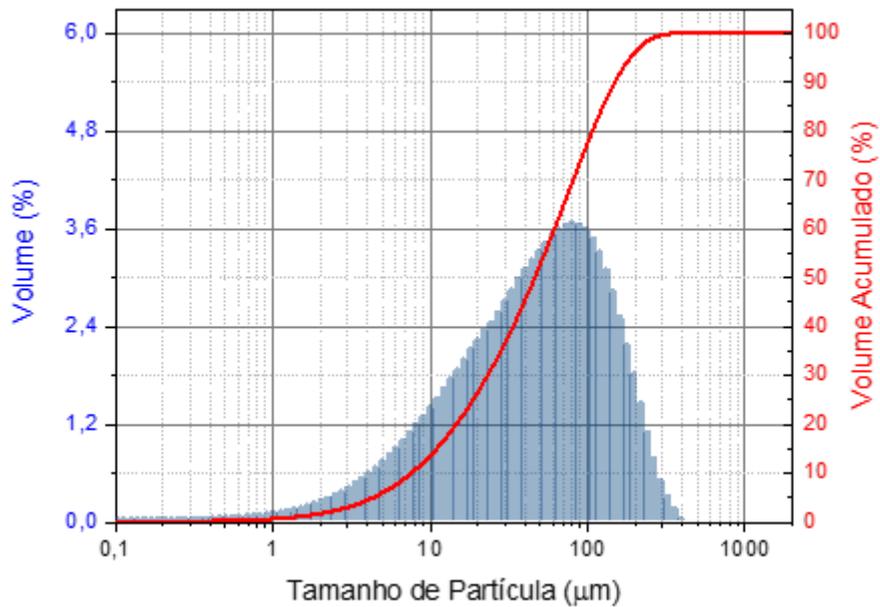


Figura 54. Amostra D, seca em estufa, processada em moinho de facas e moinho de rotor, peneirada em nylon de 100 μm

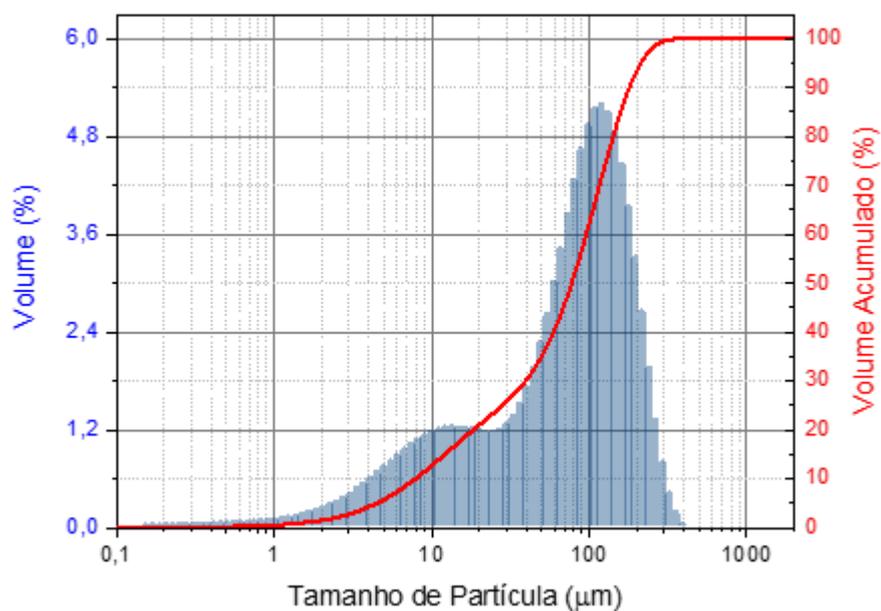


Figura 55. Amostra E, liofilizada, processada em moinho de facas e moinho de rotor, peneirada em nylon de 100 μm

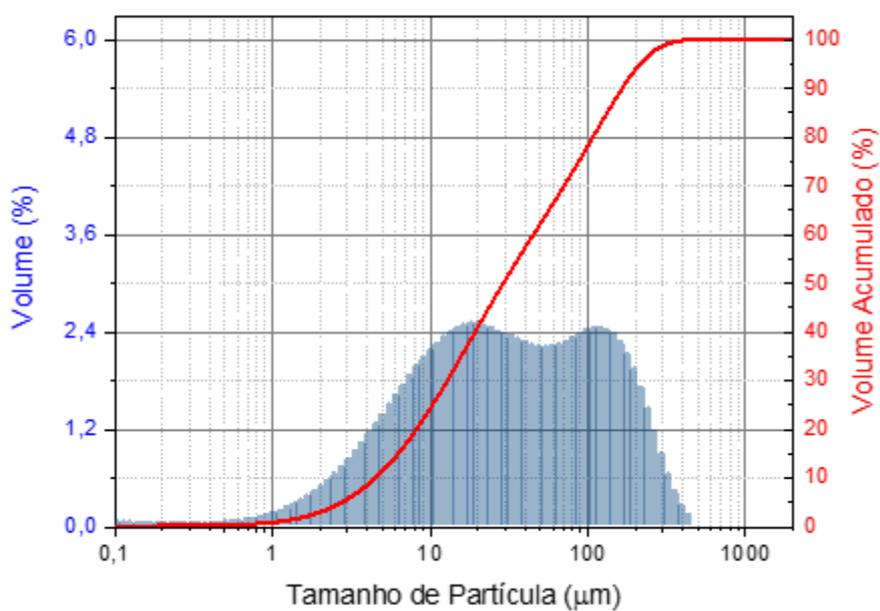


Figura 56. Amostra F, liofilizada, processada em moinho de facas e moinho de bolas

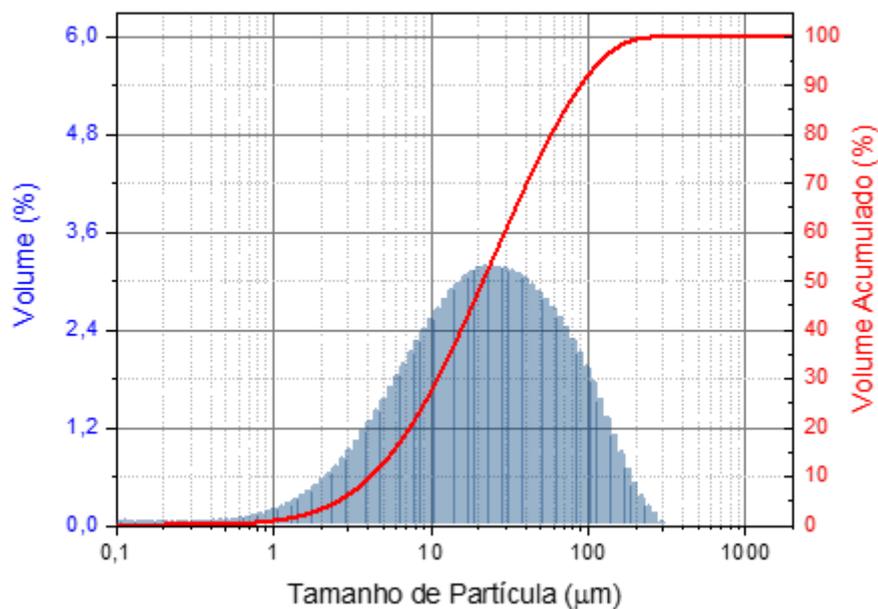


Figura 57. Amostra G, liofilizada, processada em moinho de facas e moinho de bolas, peneirada em nylon de 100 μm

A Tabela 20 apresenta os valores de tamanho de partículas encontrados em folhas de cana-de-açúcar com 10 %, 50 % e 90 % de volume acumulado.

Tabela 20. Tamanho de partículas estabelecido em folhas de cana-de-açúcar usando vários procedimentos de moagem

Amostra	Tamanho de partícula (μm)		
	Volume acumulado		
	10 %	50 %	90 %
A	145	370	750
B	18	226	518
C	13	147	400
D	8	47	151
E	8	80	187
F	5	40	204
G	4	22	94

Nesse sentido, foi considerada a condição da amostra G para o preparo do material de referência candidato, ou seja, moinho de facas, moinho de bolas e peneira de nylon de 100 μm .

Após a moagem, todo o material obtido foi misturado e homogeneizado e amostradas três porções para a caracterização física do material final, cujos resultados de tamanho de partícula para 10 %, 50 % e 90 % do volume acumulado são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Tamanho de partícula obtido para o material de referência candidato

Amostra	Tamanho de partícula (μm)		
	Volume acumulado		
	10 %	50 %	90 %
RM1	4	25	110
RM2	4	25	112
RM3	4	25	110

As Figuras 58 a 60 apresentam a distribuição do tamanho de partícula do material candidato.

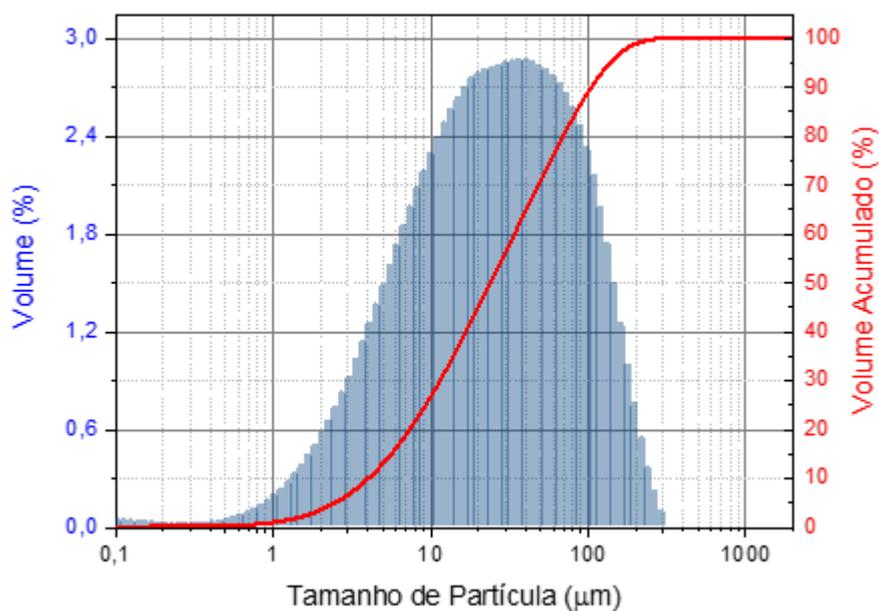


Figura 58. RM1 - Distribuição do tamanho de partícula na amostra 1

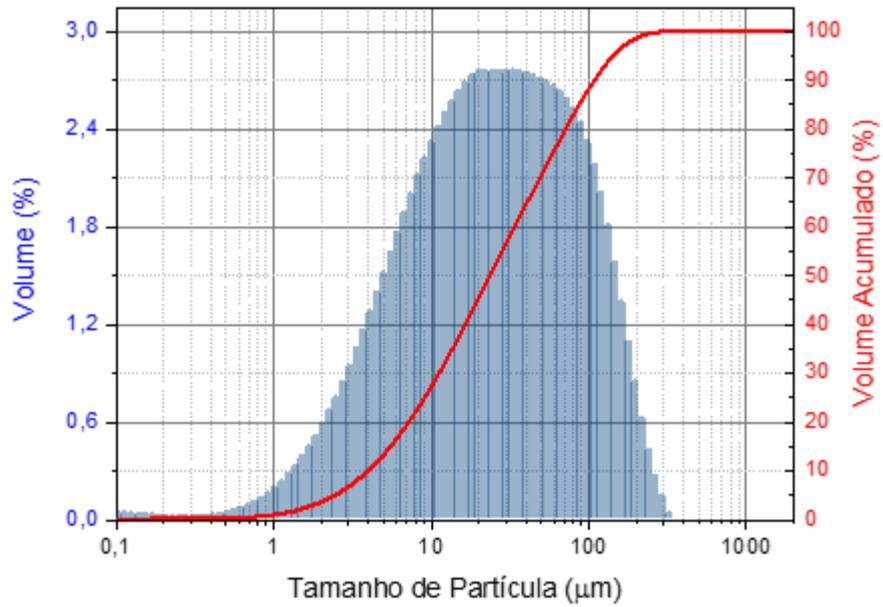


Figura 59. RM2 - Distribuição do tamanho de partícula na amostra 2

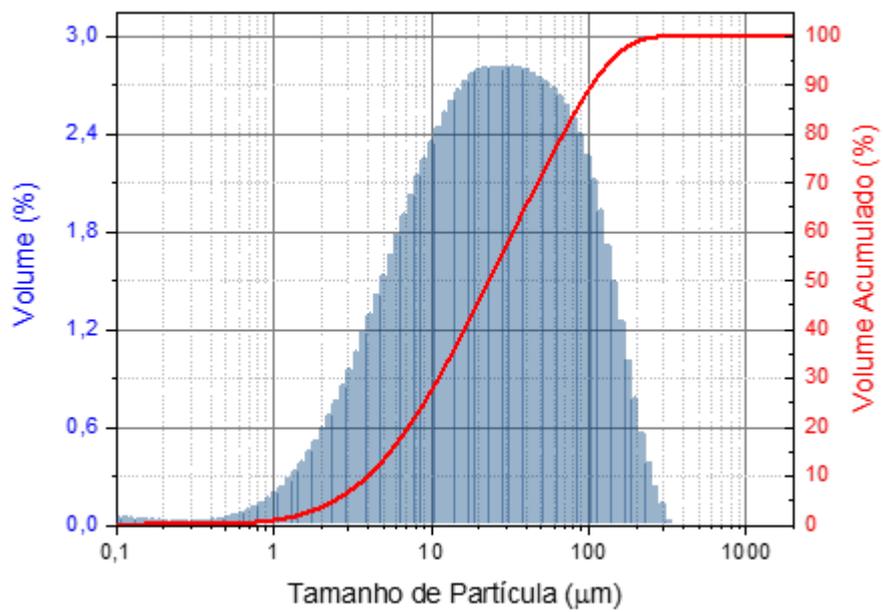


Figura 60. RM3 - Distribuição do tamanho de partícula na amostra 3

Após a homogeneização todo o material foi envasado em 410 frascos de plástico âmbar, contendo 20 g cada. O material de referência candidato foi irradiado com dose mínima de 15 kGy e máxima de 25 kGy. O material inicial foi comparado com o material irradiado não sendo observada mudança na composição química. A Tabela 22 apresenta os valores obtidos para elementos determinados por INAA, comparando os frascos com e sem irradiação.

Tabela 22. Composição do material de referência antes e após irradiação com raios gama (^{60}Co) em diferentes doses. Valores expressos em mg/kg de massa seca e respectivas incertezas expandidas

Elemento	Frasco Inicial	Dose de irradiação (kGy)			
		10	15	20	25
Br	24,7 ± 1,3	25,3 ± 1,4	24,5 ± 1,3	25,3 ± 1,3	24,6 ± 1,2
Ca	4375 ± 332	4240 ± 416	4292 ± 343	4319 ± 501	4481 ± 547
Ce	1,60 ± 0,10	1,64 ± 0,19	1,58 ± 0,14	1,63 ± 0,16	1,65 ± 0,19
Co	0,037 ± 0,004	0,038 ± 0,004	0,037 ± 0,004	0,039 ± 0,004	0,037 ± 0,004
Cs	0,214 ± 0,014	0,217 ± 0,016	0,207 ± 0,015	0,218 ± 0,016	0,216 ± 0,017
Fe	229 ± 10	231 ± 10	227 ± 10	235 ± 11	232 ± 10
Hf	0,180 ± 0,011	0,172 ± 0,011	0,172 ± 0,010	0,189 ± 0,011	0,176 ± 0,011
K	16834 ± 740	17043 ± 1192	16490 ± 1022	17154 ± 686	16939 ± 846
La	0,7831 ± 0,0313	0,786 ± 0,035	0,764 ± 0,031	0,796 ± 0,035	0,799 ± 0,045
Na	8,97 ± 0,72	9,87 ± 0,77	9,52 ± 1,13	9,07 ± 0,80	8,93 ± 0,73
Rb	17,3 ± 1,2	17,4 ± 1,1	17,3 ± 1,1	17,4 ± 1,3	17,3 ± 1,1
Sc	0,052 ± 0,002	0,052 ± 0,002	0,051 ± 0,002	0,053 ± 0,002	0,052 ± 0,002
Sm	0,057 ± 0,006	0,060 ± 0,006	0,061 ± 0,005	0,058 ± 0,007	0,061 ± 0,006
Sr	24,5 ± 3,2	27,2 ± 2,8	26,9 ± 3,3	24,9 ± 2,9	27,6 ± 5,1
Th	0,028 ± 0,005	0,027 ± 0,004	0,032 ± 0,005	0,032 ± 0,005	0,032 ± 0,007
Zn	13,3 ± 0,8	13,6 ± 0,8	12,7 ± 0,7	13,5 ± 0,8	13,5 ± 0,8

4.3.1. Estudo de homogeneidade

4.3.1.1. Estudo de massa mínima

A INAA, empregada para avaliar a massa mínima do material de referência de folhas de cana-de-açúcar, permitiu determinar dezessete elementos, ou seja, Br, Ca, Ce, Co, Cs, Fe, Hf, K, La, Na, P, Rb, Sc, Sm, Sr, Th e Zn. Para complementar esse estudo, o método de Kjeldahl

permitiu a medição de N. Os resultados para os dezoito elementos, correspondentes às massas de amostra de 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg, são apresentados nas Figuras 61 a 78. Foram avaliadas dez replicatas para cada massa de amostra, juntamente com três CRMs (SRM 1515, SRM 1570a e INCT-OBTL-5) utilizados para o controle da qualidade do procedimento realizado. Esses CRMs foram estabelecidos devido às faixas de concentração dos elementos certificados e composição matricial de folhas.

A homogeneidade dentro do frasco usando as quatro massas foi avaliada com gráficos de controle de Shewhart, considerando aceitável como limite inferior e superior valores de $\pm 5\%$ (Br, Ca, Ce, Cs, Fe, Hf, K, N, P, Rb, Sm e Zn) e $\pm 10\%$ (Co, La, Na, Sc, Sr e Th) do valor da média geral. O fundo de escala utilizado nos gráficos foi de $\pm 60\%$ para possibilitar a comparação das dispersões obtidas para os diversos elementos. As barras de erro representam a incerteza padrão de cada resultado individual. Para a massa de 10 mg houve grande variação entre as dez repetições para Na, Sr e Th, assim esses dados não foram considerados na média para os três elementos.

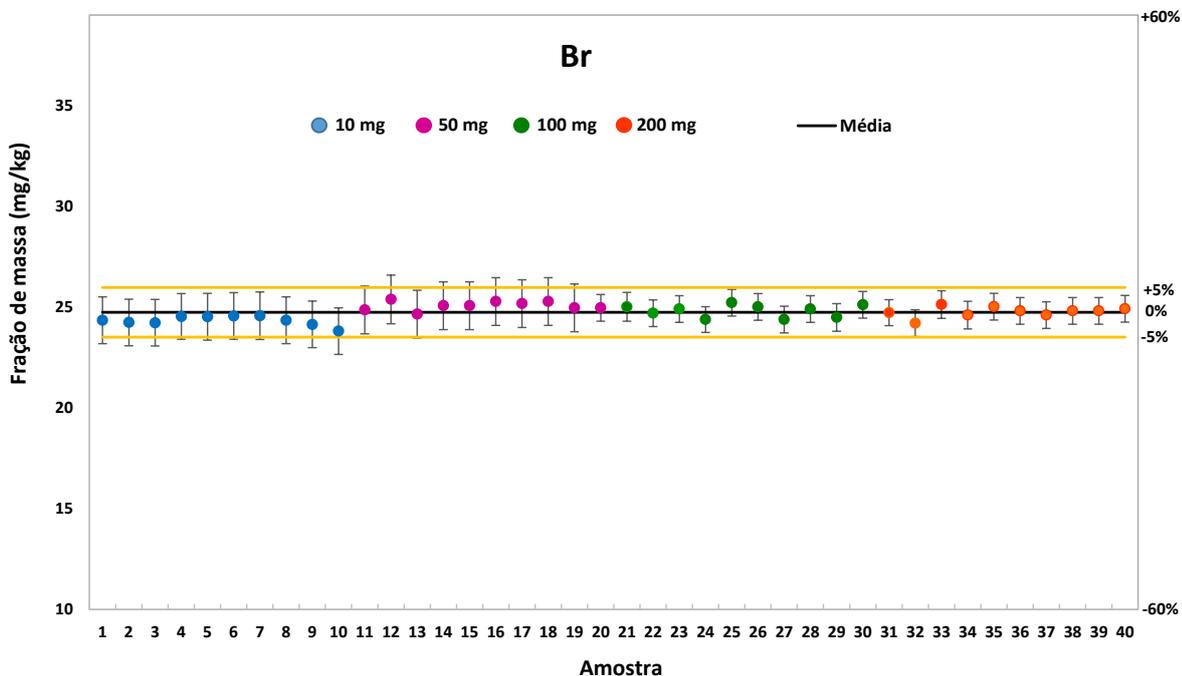


Figura 61. Br - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

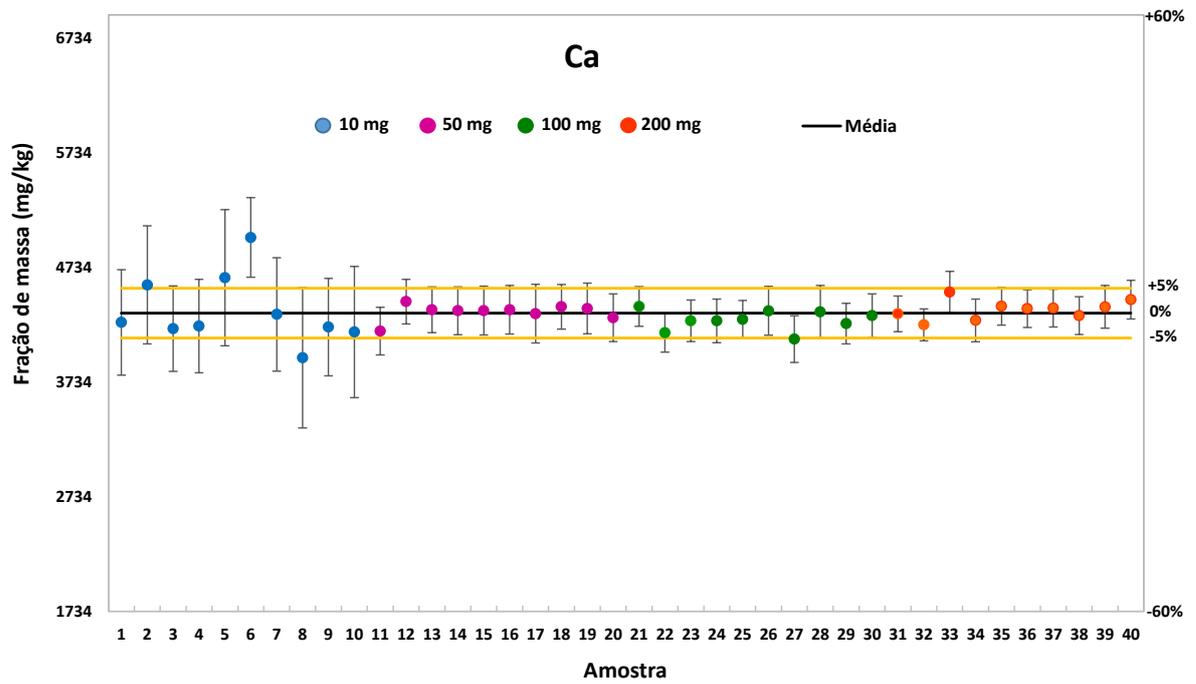


Figura 62. Ca – Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

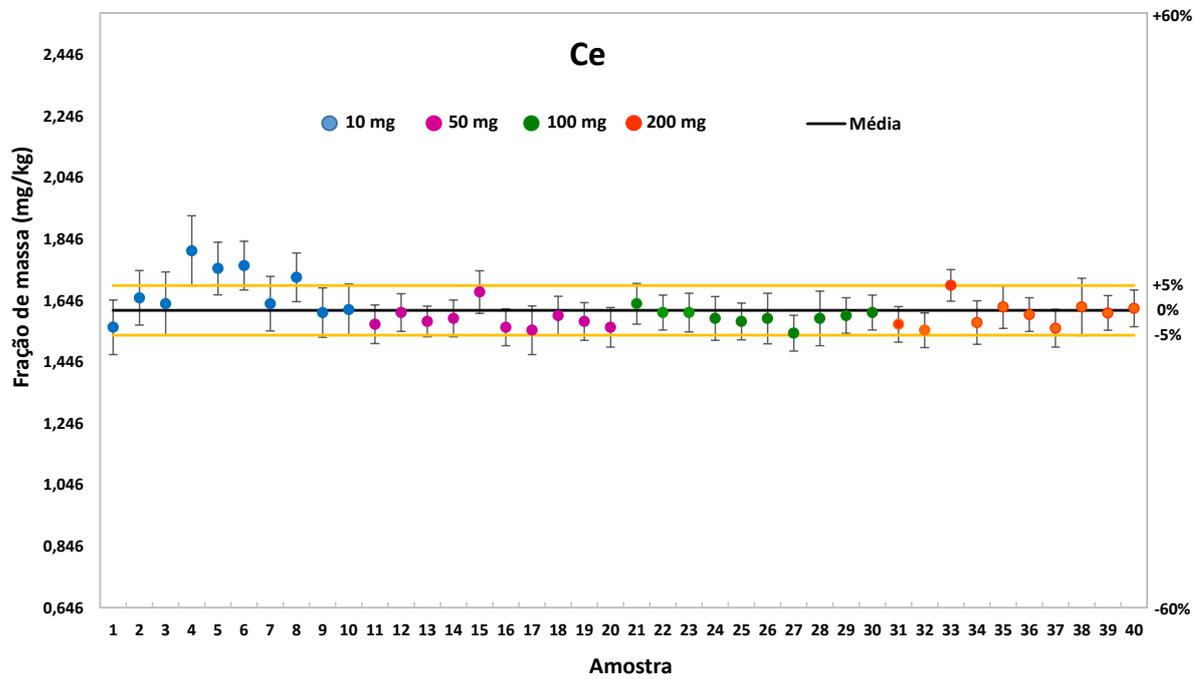


Figura 63. Ce – Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

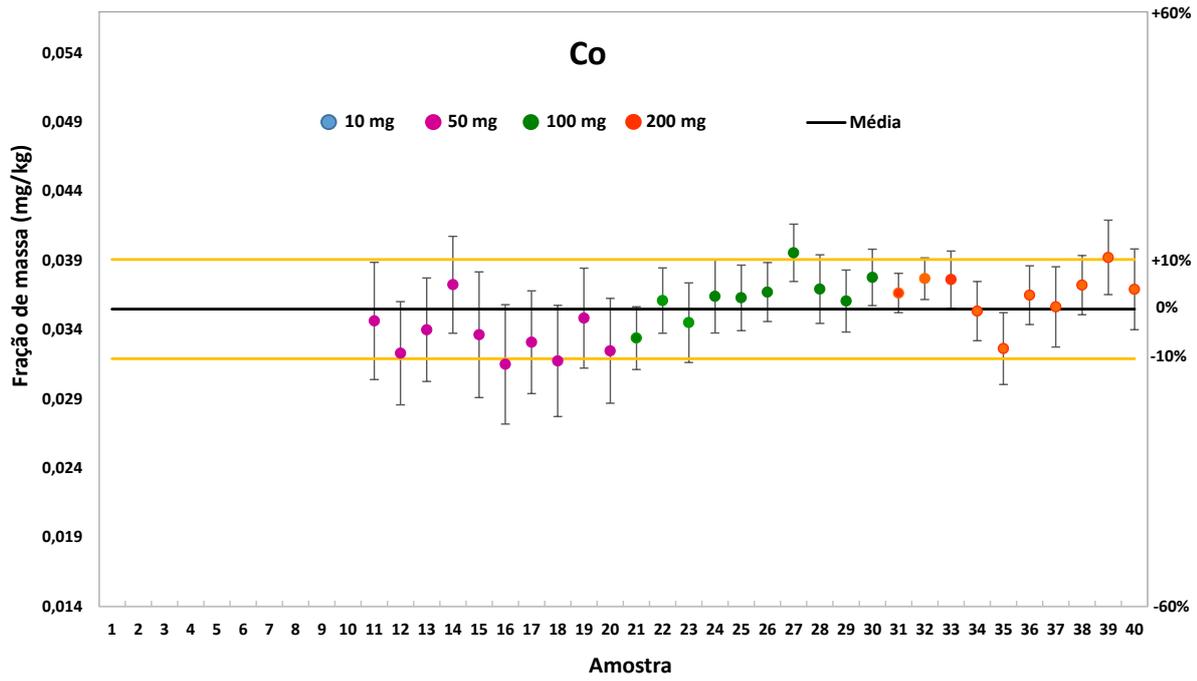


Figura 64. Co – Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

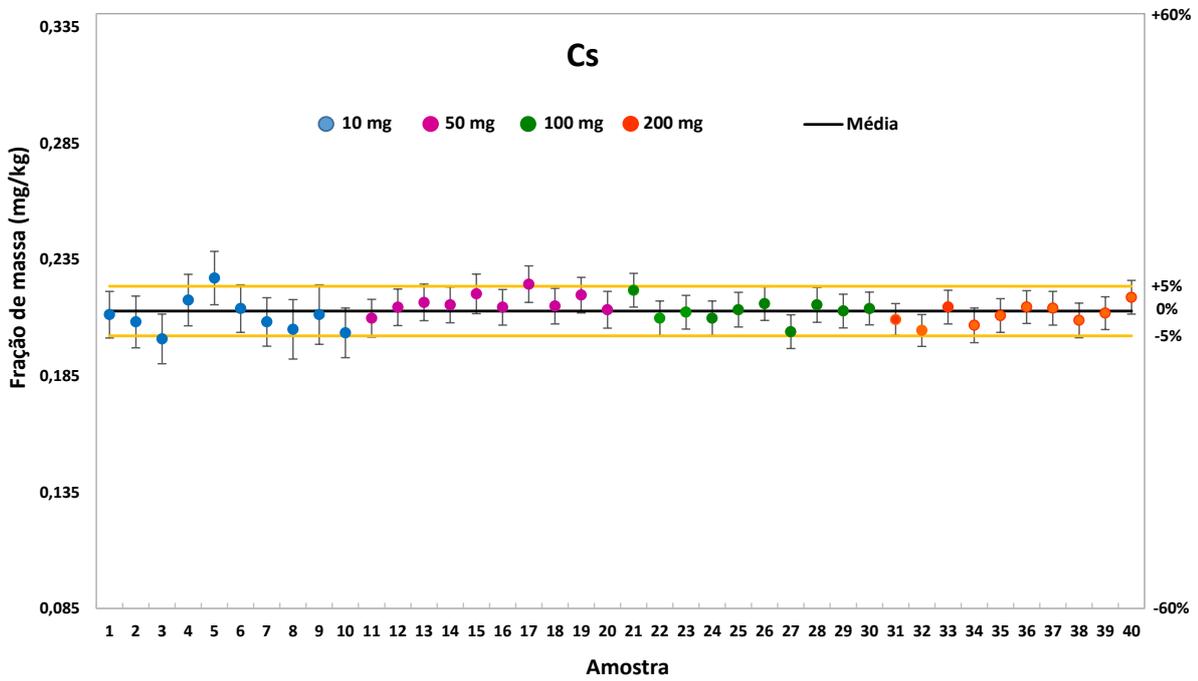


Figura 65. Cs – Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

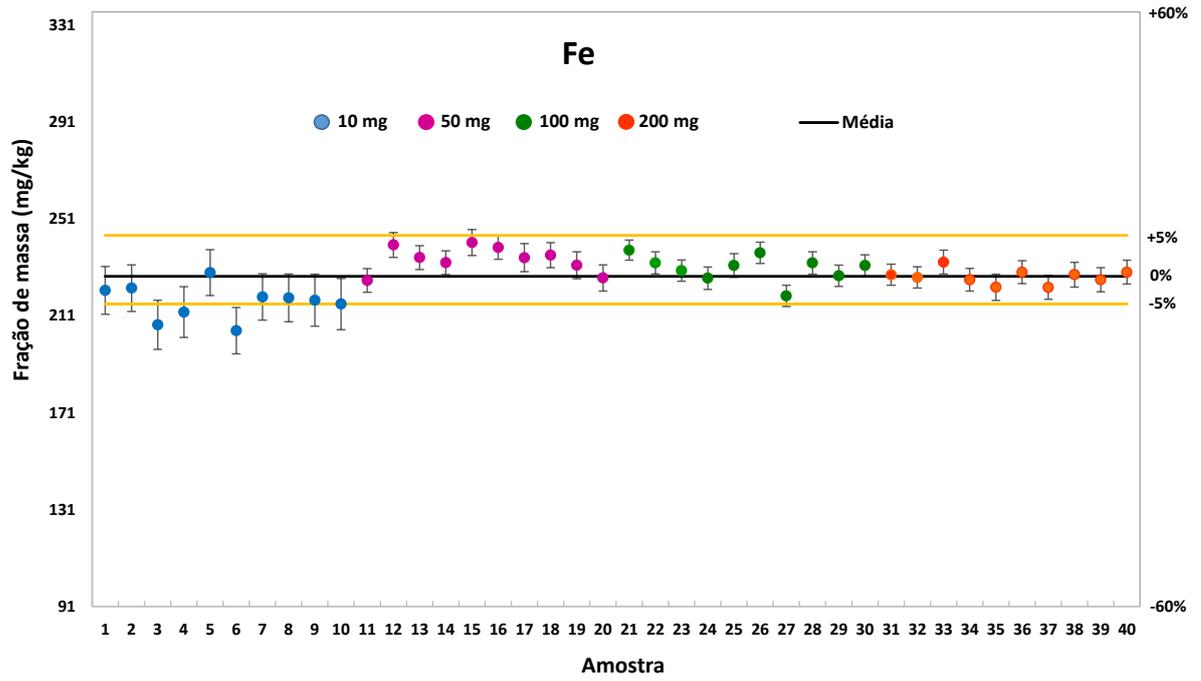


Figura 66. Fe – Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

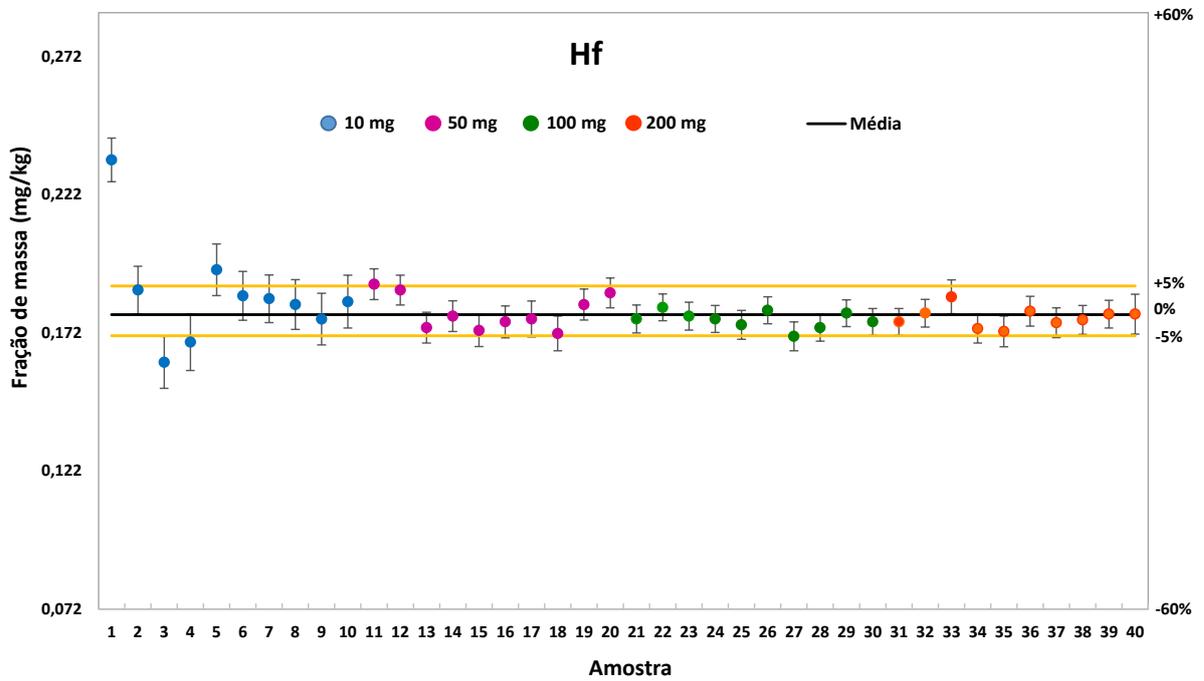


Figura 67. Hf – Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

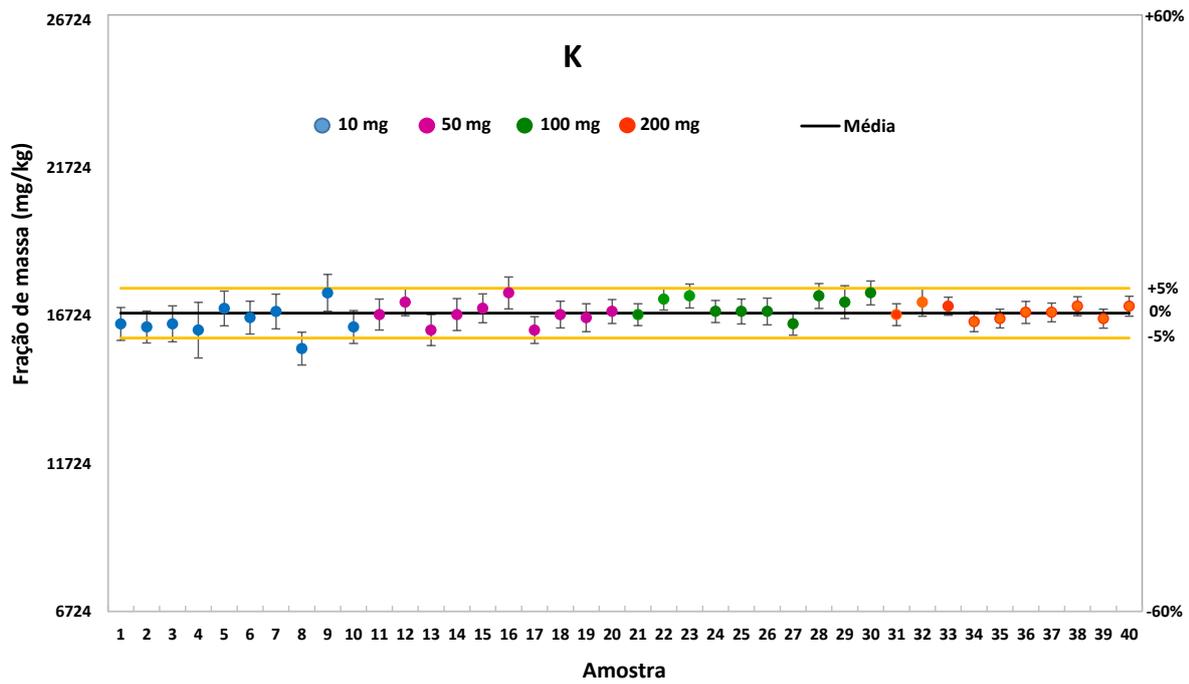


Figura 68. K – Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

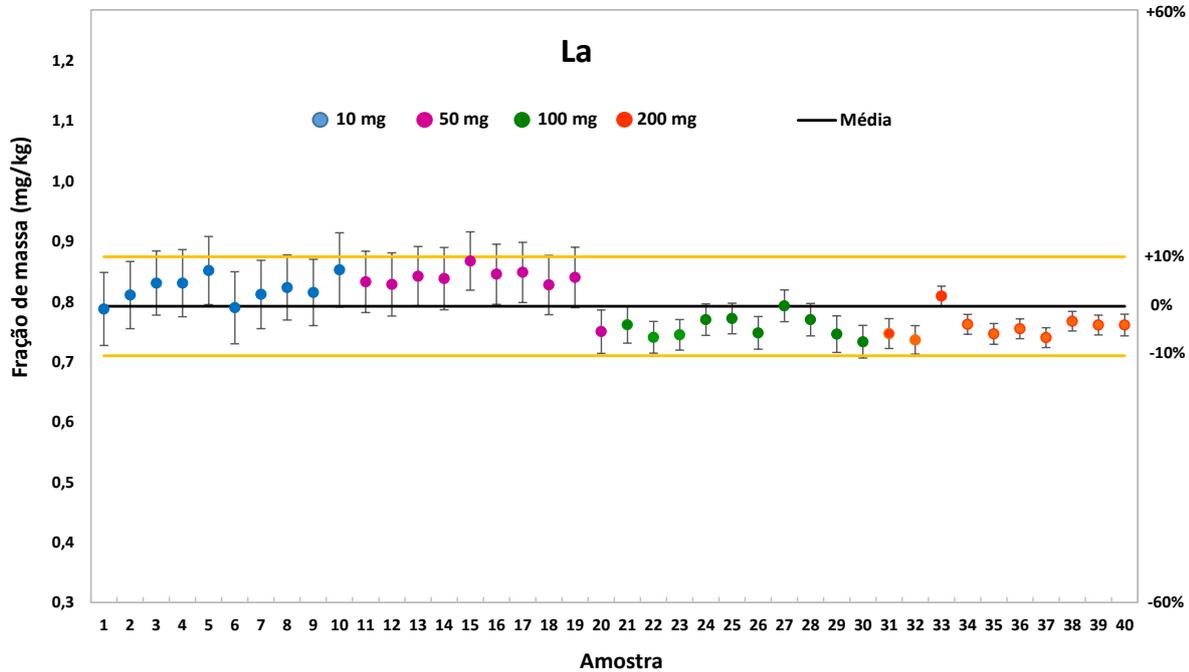


Figura 69. La - Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

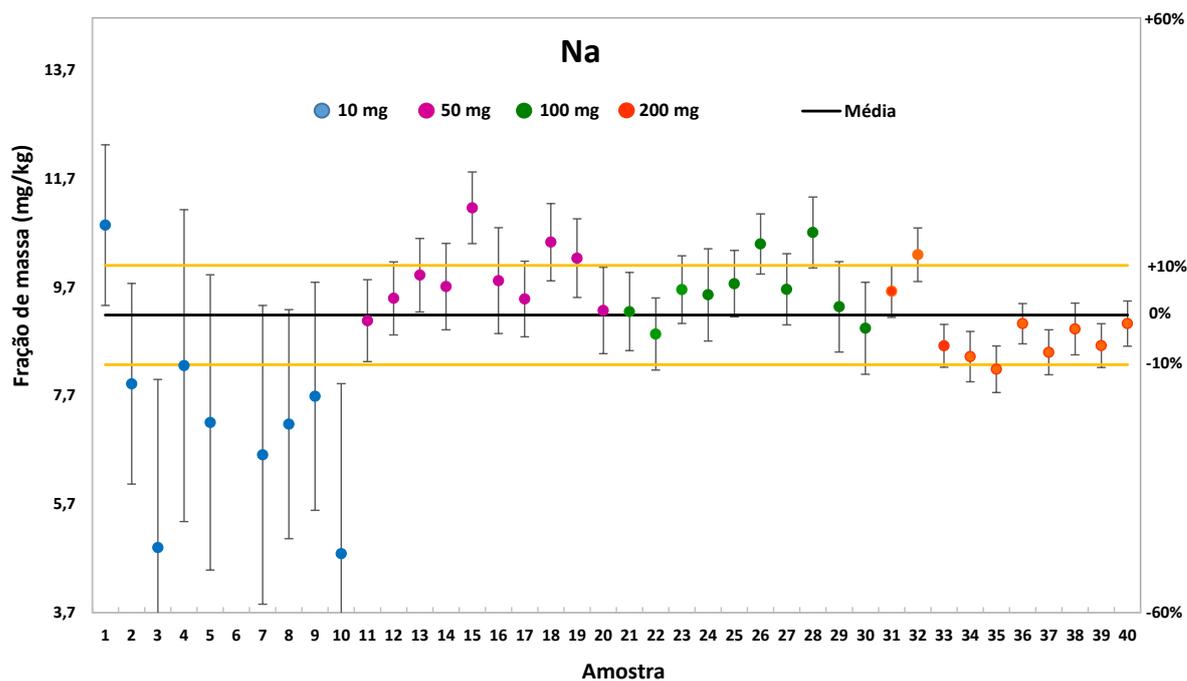


Figura 70. Na – Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

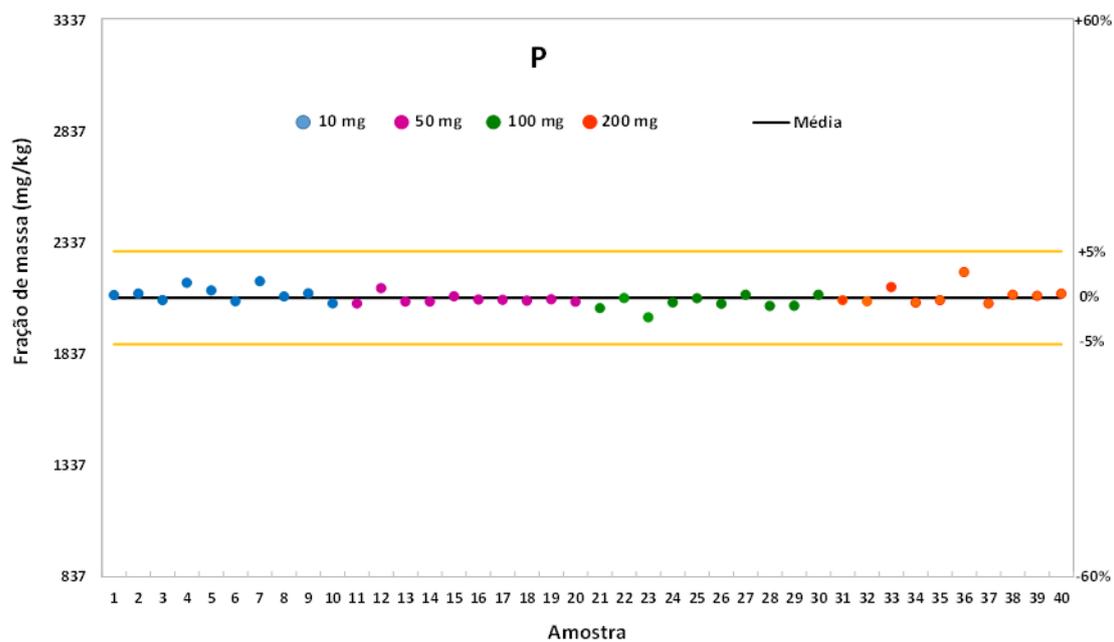


Figura 71. P – Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

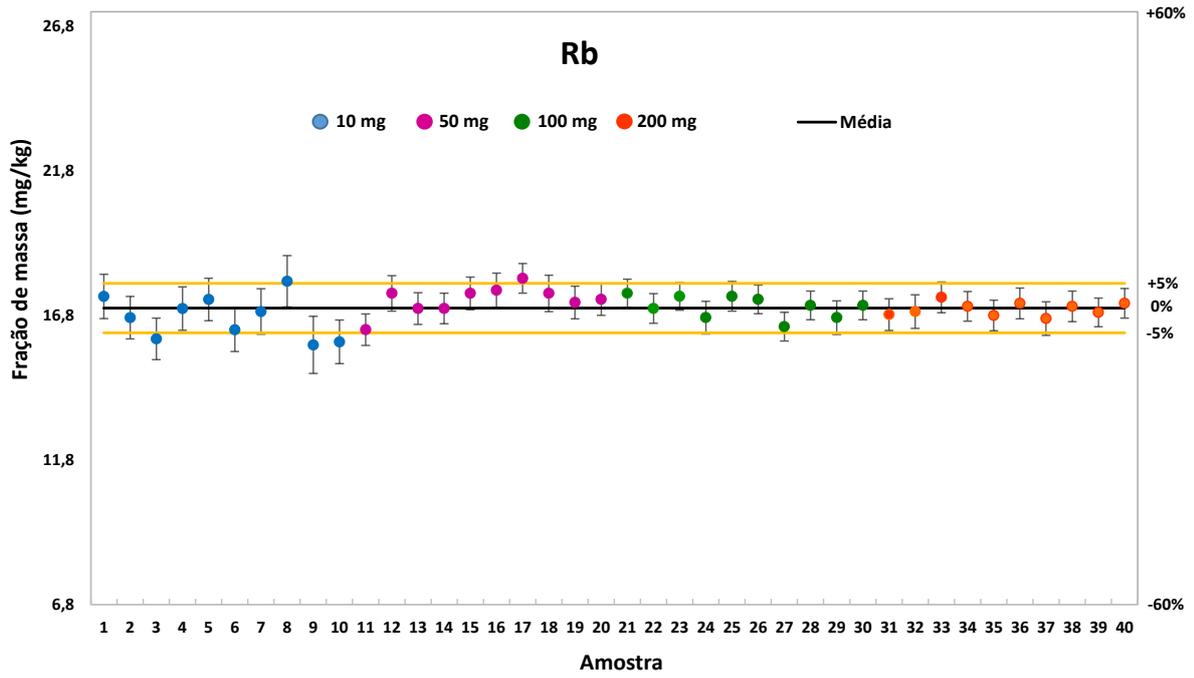


Figura 72. Rb – Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

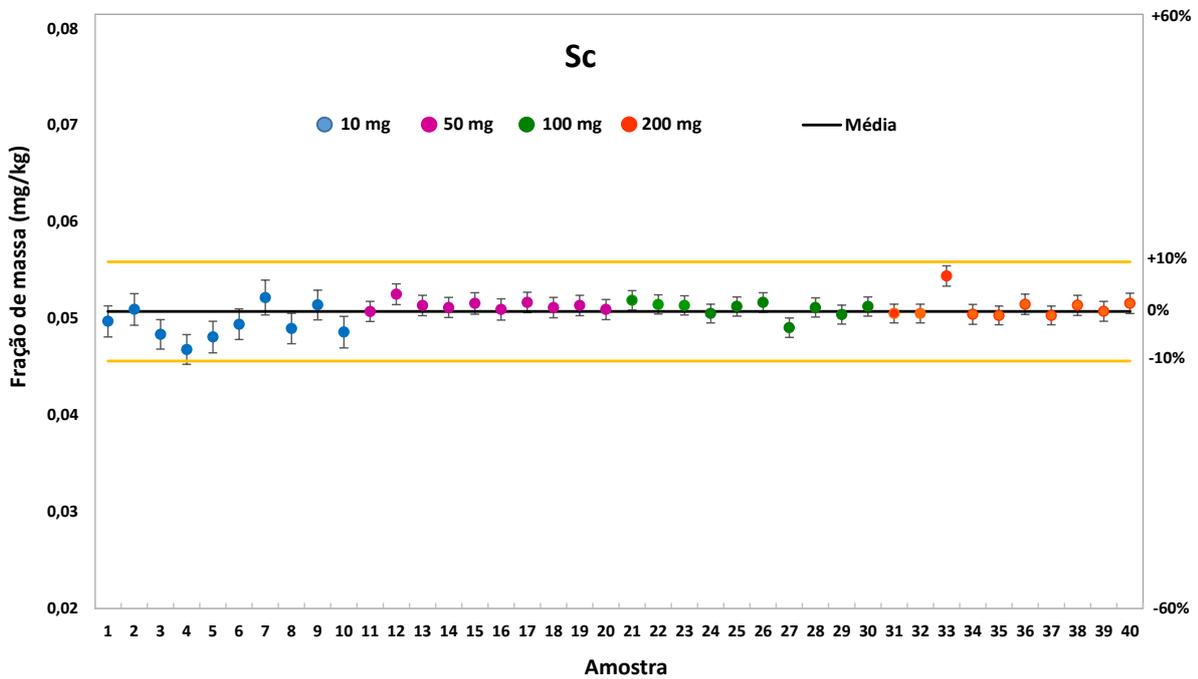


Figura 73. Sc – Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

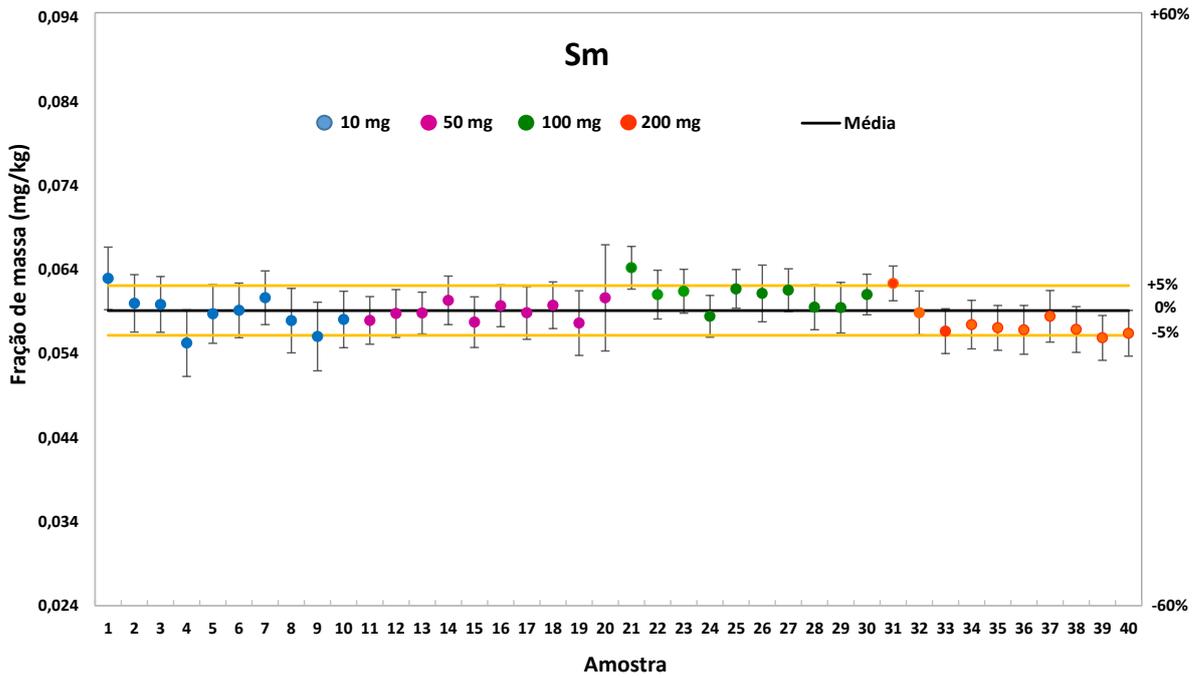


Figura 74. Sm – Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

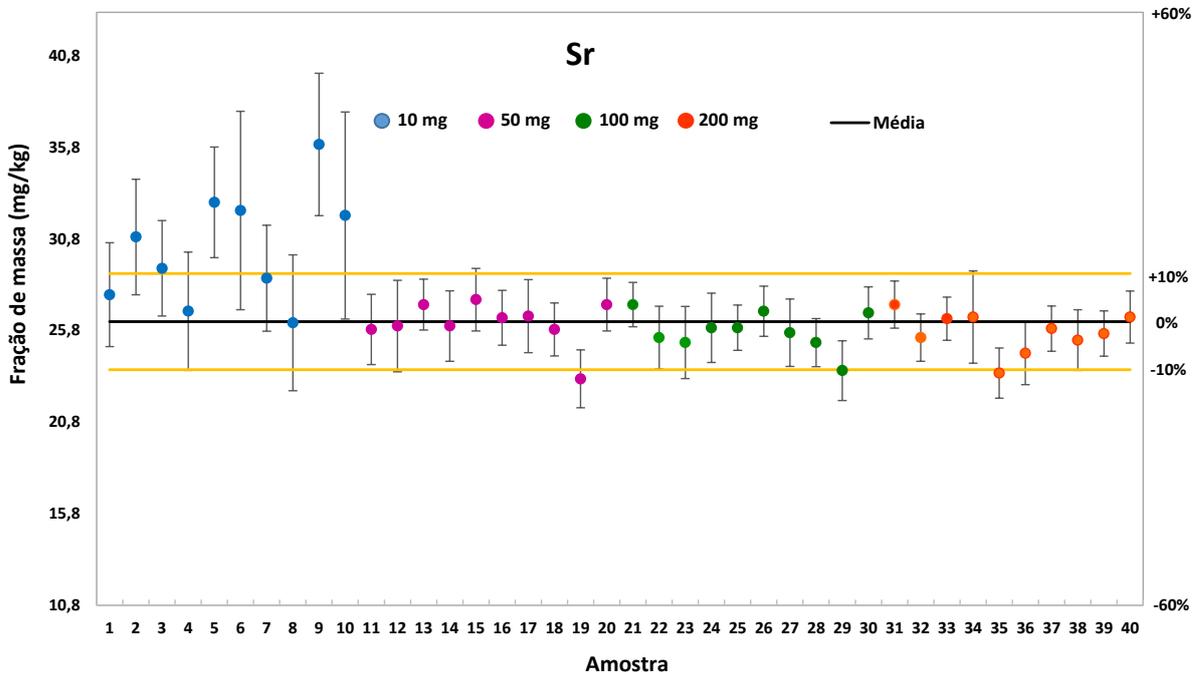


Figura 75. Sr – Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

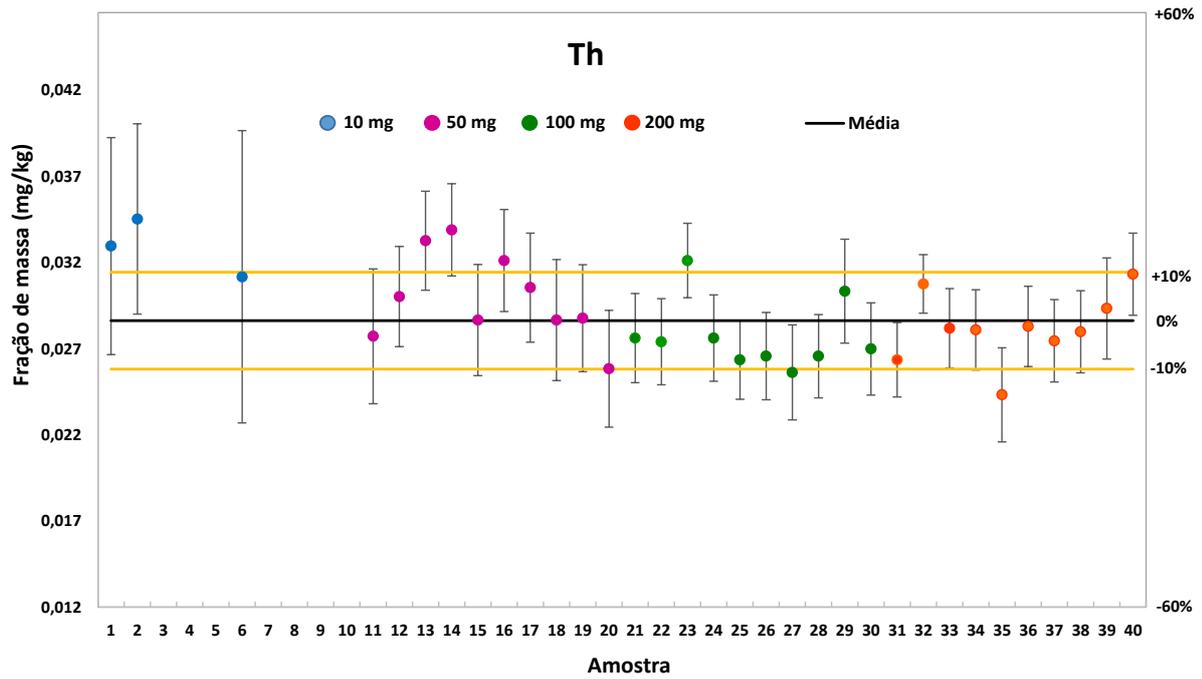


Figura 76. Th – Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

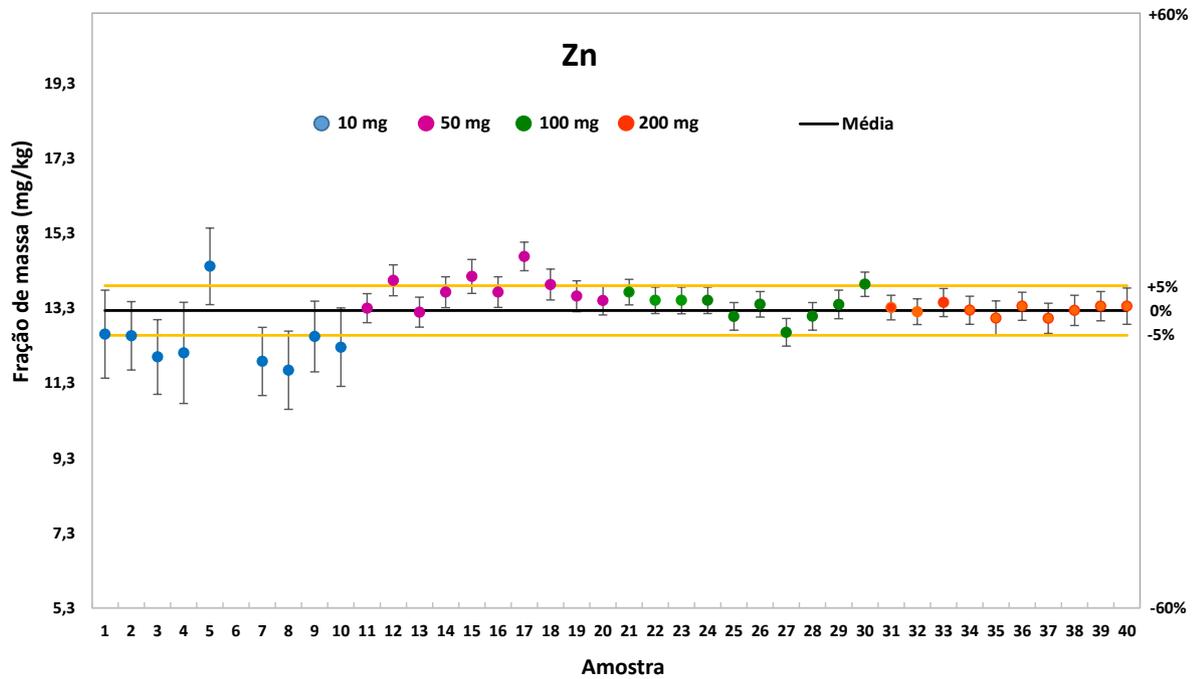


Figura 77. Zn – Estudo de massa mínima usando 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

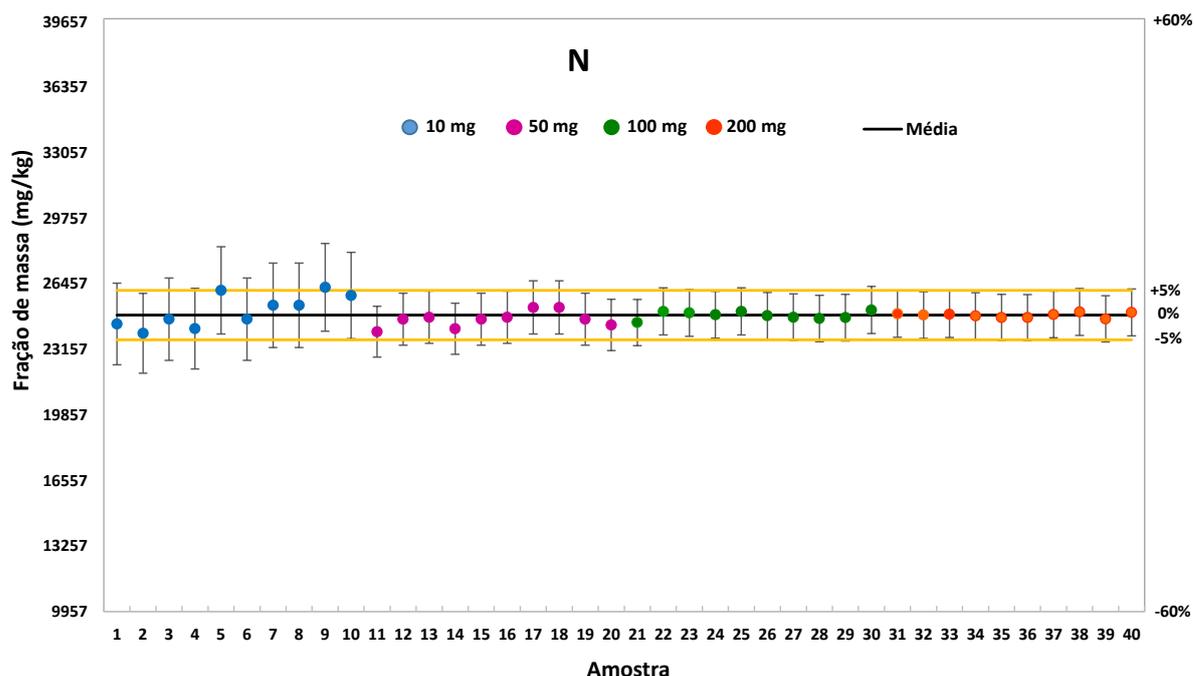


Figura 78. N – Estudo de massa mínima usando massas de 10 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg

No caso de Co, a baixa contagem acumulada nas energias 1173 keV e 1332 keV não foi suficiente para quantificação usando massa de 10 mg. O desvio padrão relativo (RSD) para as quatro massas avaliadas dos dezoito elementos determinados variou de 1,5 % (Br) até 32 % (Na). A maior variação observada foi para massas de 10 mg e a menor para massas de 100 mg e 200 mg.

ANOVA e teste de Tukey-Kramer (HSD), com 95% de confiança ($\alpha = 0,05$), foram utilizados para comparar os resultados obtidos e avaliar se há diferença significativa entre as quatro massas empregadas. A Tabela 23 sumariza os resultados estatísticos para cada elemento. Valores seguidos pela mesma letra e na mesma fila não apresentam diferença significativa.

O teste de Tukey mostrou que não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre as quatro massas para Ca, N e Hf. Por outro lado, para Br, K, Rb, Ce, Cs, Sc, Sr e Th, houve diferença significativa ($p < 0,05$) para massas de 10 mg. Nesse caso, as massas recomendadas foram de 50 mg a 200 mg. Já para Fe, Na, Co, Zn, La e Sm, massas de 100 e 200 mg foram mais apropriadas. Portanto, em geral, considera-se que as massas de 100 mg e 200 mg apresentaram melhores resultados com menores coeficientes de variação.

Tabela 23. ANOVA e teste Tukey aplicado em resultados de macronutrientes e micronutrientes para 4 massas de amostra

Elemento	Massa (mg)			
	10	50	100	200
Br	24.2 ± 0.2 ^a	24.9 ± 0.2 ^b	24.7 ± 0.3 ^b	24.6 ± 0.3 ^b
Ca	4355 ± 302 ^a	4345 ± 69 ^a	4274 ± 87 ^a	4366 ± 84 ^a
Ce	1.67 ± 0.08 ^a	1.59 ± 0.04 ^b	1.59 ± 0.02 ^b	1.60 ± 0.04 ^b
Co	--	0.0339 ± 0.0017 ^a	0.0367 ± 0.0017 ^b	0.0369 ± 0.0018 ^b
Cs	0.211 ± 0.008 ^a	0.217 ± 0.004 ^a	0.213 ± 0.005 ^a	0.212 ± 0.004 ^a
Fe	217 ± 7 ^c	234 ± 5 ^a	230 ± 5 ^{ab}	227 ± 3 ^b
K	16540 ± 502 ^a	16792 ± 383 ^b	17054 ± 340 ^b	16850 ± 220 ^b
Hf	0.186 ± 0.020 ^a	0.180 ± 0.006 ^a	0.177 ± 0.333 ^a	0.177 ± 0.004 ^a
La	0.85 ± 0.02 ^a	0.86 ± 0.03 ^a	0.79 ± 0.02 ^b	0.79 ± 0.02 ^b
N	25108 ± 823 ^a	24685 ± 400 ^a	24887 ± 195 ^a	24888 ± 116 ^a
Na	9 ± 6 ^a	9.8 ± 0.6 ^b	9.6 ± 0.6 ^{bc}	8.9 ± 0.6 ^c
P	2111 ± 33 ^a	2086 ± 19 ^{ab}	2070 ± 31 ^{bc}	2105 ± 43 ^{ab}
Rb	16.8 ± 0.7 ^a	17.4 ± 0.4 ^a	17.1 ± 0.4 ^a	17.1 ± 0.2 ^a
Sc	0.0499 ± 0.0017 ^a	0.0518 ± 0.0005 ^b	0.0515 ± 0.0008 ^b	0.0517 ± 0.0012 ^b
Sm	0.058 ± 0.002 ^{ab}	0.0590 ± 0.0011 ^{ab}	0.6097 ± 0.0016 ^a	0.0577 ± 0.0019 ^b
Sr	30 ± 3 ^a	26.2 ± 1.2 ^b	25.8 ± 1.1 ^b	25.7 ± 1.1 ^b
Th	0.039 ± 0.005 ^a	0.029 ± 0.003 ^b	0.027 ± 0.001 ^b	0.028 ± 0.002 ^b
Zn	16 ± 11 ^a	13.8 ± 0.4 ^b	13.4 ± 0.4 ^b	13.25 ± 0.14 ^b

* Valores seguidos pela mesma letra e na mesma fila não apresentam diferença significativa.

4.3.1.2. Homogeneidade dentro do frasco

A avaliação da homogeneidade dentro do frasco de 18 elementos usando massas de 200 mg esta sumarizada na Tabela 24. A fração de massa representa ao valor médio das 10 replicatas com incertezas expandidas associadas e desvio padrão relativo (RSD) para cada elemento. Os valores de RSD observados foram menores que 5%, com exceção de Na e Th. Análise estatística de ANOVA demonstrou que não houve diferença significativa entre as 10 replicatas amostradas ($p > 0,05$; $F < F_{crit}$), sendo, o material homogêneo para 16 elementos. No caso particular do Na, foram obtidos valor de $F > F_{crit}$ e $p < 0,05$; observando-se um grau de heterogeneidade do material dentro do frasco.

Tabela 24. Homogeneidade dentro do frasco dos elementos químicos no material de referência candidato, para massas de 200 mg e 10 replicatas, U representa a incerteza combinada

	Fração massa (mg/kg)	U (mg/kg)	RSD (%)
Br	24,6	1,33	1,0
Ca	4360	330	1,9
Ce	1,60	0,13	2,7
Co	0,037	0,004	4,7
Cs	0,212	0,014	2,0
Fe	227	9,7	1,4
K	16850	693	1,3
Hf	0,180	0,011	2,0
La	0,79	0,04	2,6
N	24890	--	0,5
Na	8,87	0,87	7,0
P	2105	--	2,0
Rb	17,1	1,07	1,3
Sc	0,051	0,002	2,4
Sm	0,058	0,005	3,2
Sr	25,7	2,98	4,3
Th	0,028	0,005	7,3
Zn	13,2	0,79	1,0

4.3.1.3. Homogeneidade entre frascos

Amostras em duplicata foram tomadas de dez frascos aleatoriamente selecionados, sendo utilizada INAA para determinar os elementos Al, Ca, Cl, Cu, Mg, Mn, Mo, V, Br, K, La, Sm, Na, Co, Cs, Fe, Rb, Sb, Sc, Th e Zn. As frações de massas de Cu e Mo foram encontradas abaixo do limite de detecção (Cu < 6,0 mg/kg e Mo < 1,4 mg/kg), assim a Tabela 25 sumariza os resultados obtidos para os outros dezenove elementos.

Para cada elemento, é apresentada a avaliação de incerteza e o cálculo da incerteza devido à homogeneidade (u_{HOM}). Em alguns casos, os elementos foram quantificados usando duas linhas de raios gama, que forneciam resultados similares.

Para a avaliação da homogeneidade do material candidato, foi considerada a contribuição das incertezas associadas à variação das medições entre frascos. As incertezas calculadas foram incerteza experimental (u_{exp}) devido à variação entre os 10 frascos, incerteza da estatística de contagem (u_c), incerteza analítica (u_{AN}) e incerteza devido à homogeneidade do material (u_{HOM}) (GREENBERG et al., 2011).

A incerteza devido à homogeneidade (u_{HOM}) foi calculada a partir da Equação 15:

$$u_{\text{HOM}} = \sqrt{u_{\text{exp}}^2 - (u_c^2 + u_{\text{AN}}^2)} \quad (15)$$

Os valores da incerteza experimental (u_{exp}) para radionuclídeos de meia-vida curta (dos elementos Al, Ca, Cl, Mg e Mn) ficaram no intervalo de 0,59 % a 4,79 %, enquanto as incertezas devido à estatística de contagem (u_c) variaram entre 0,41 % e 4,59 %. Comparando as incertezas obtidas para a maioria dos elementos, u_c foi menor que u_{exp} . No caso do vanádio (V), u_{exp} foi 14,9 %, enquanto u_c foi 13,1%. Os valores de incerteza foram maiores devido à pequena área do fotopico observado no espectro.

Para os nuclídeos de meia-vida mais longa (dos elementos Br, Co, Cs, Fe, K, La, Na, Rb, Sc, Sm, Th e Zn), o intervalo de u_{exp} foi de 1,24 % a 7,24 %, enquanto u_c variou entre 0,60% e 7,92%. Por outro lado, as incertezas obtidas para Sb foram elevadas devido à baixa fração de massa e pequenas áreas de fotopicos observados no espectro, u_c foi 13,3% e o u_{exp} de 18,0%. O fotopico de ^{124}Sb em 603 keV é difícil de avaliar por conta da interferência de ^{134}Cs em 605 keV, assim a energia alternativa utilizada para esse elemento foi 1690 keV. No caso de Zn, foi observado que interferências espectrais por conta da presença de ^{46}Sc (1120 keV) e ^{152}Eu (1112 keV) incrementam a contribuição da incerteza experimental para ^{65}Zn (1115 keV) mostrada na Tabela 25.

O material candidato, usando massas de 180 mg, pode ser considerado homogêneo para 18 elementos, à exceção de Sb que apresentou incerteza devido à homogeneidade de 12 %. Testes de análise estatística de ANOVA e Wilcoxon/Kruskal-Walis foram aplicados, sendo confirmada a homogeneidade desses elementos em nível de 95 % de confiança ($p > 0,05$).

Tabela 25. Homogeneidade dos elementos químicos no material de referência candidato determinado por INAA, para massas de 180 mg e 20 replicatas. 1σ representa a incerteza da estatística de contagem para a área do fotopico

	Energia keV	Fração massa (mg/kg)	1σ	u_{exp} (%)	u_c (%)	u_{AN} (%)	u_{HOM} (%)
Al	1778	1882	9	0,66	0,41	1,21	* -
Br	554	21,71	0,23	1,24	1,07	1,50	-
	777	21,83	0,24	1,33	1,10	1,50	-
Ca	3081	4236	81	1,96	1,66	1,21	-
Cl	1642	3603	27	0,78	0,63	1,21	-
	2178	3605	21	0,65	0,49	1,21	-
Co	1173	0,039	0,001	5,80	3,05	2,00	4,51
	1332	0,039	0,001	6,37	2,67	2,00	5,43
Cs	605	0,222	0,002	3,53	1,28	2,00	2,62
	795	0,214	0,003	3,59	1,50	2,00	2,57
Fe	1099	233,3	1,7	2,06	0,71	2,00	-
	1292	232,0	1,7	2,35	0,74	2,00	0,99
K	1524	17800	106	1,83	0,60	1,50	0,93
La	487	0,818	0,010	2,45	1,28	1,50	1,46
	1596	0,818	0,006	2,84	0,77	1,50	2,32
Mg	843	1720	46	4,40	2,29	1,21	3,56
	1014	1604	80	4,79	4,59	1,21	0,67
Mn	846	130,8	0,7	0,80	0,45	1,21	-
	1811	131,3	1,7	0,59	1,07	1,21	-
Na	1368	5,28	0,09	5,76	0,99	1,50	5,48
	2754	5,28	0,06	5,91	0,70	1,50	5,68
Rb	1076	16,14	0,11	2,37	0,69	2,00	1,07
Sb	1690	0,013	0,001	18,0	13,3	2,00	12,02
Sc	889	0,0511	0,0005	2,16	0,94	2,00	-
	1120	0,0543	0,0005	2,39	0,92	2,00	0,94
Sm	103	0,060	0,002	3,13	2,86	1,50	-
Th	312	0,0271	0,0016	5,80	6,02	2,00	-
V	1434	0,550	0,071	14,9	13,1	1,21	6,95
Zn	1115	13,85	0,08	3,02	0,57	2,00	2,19

* u_{HOM} não foi calculada devido à diferença negativa das variâncias entre u_{exp} , u_c e u_{AN}

O método de Kjeldahl foi empregado para avaliar a homogeneidade entre frascos para N. Porções de 100 mg foram retiradas em triplicata de cada um dos dez frascos, sendo os resultados apresentados na Figura 79. As barras de erro representam o desvio padrão (SD) das médias de cada frasco (n = 3). O gráfico de Shewart apresenta como limites inferior e superior ± 2 SD, em um intervalo de confiança de 95 %.

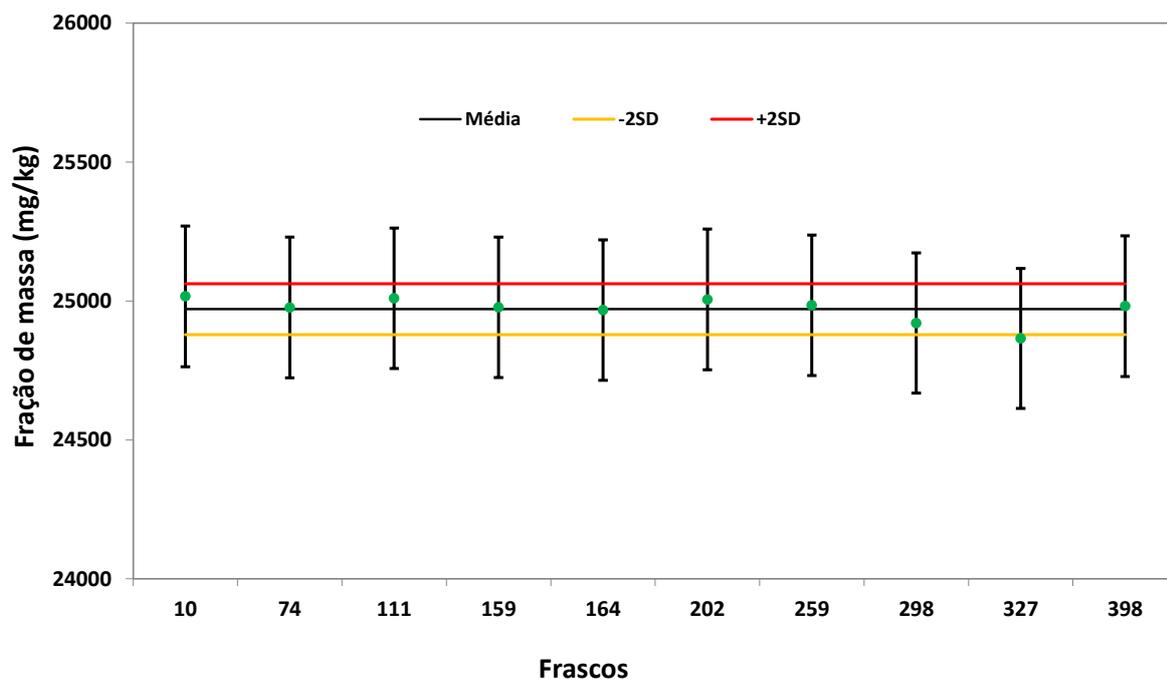


Figura 79. N - Teste de homogeneidade entre frascos usando o método de Kjeldahl

O valor médio de N das 30 medições realizadas foi de 24970 mg/kg com desvio padrão relativo (RSD) de 0,43 %. Testes estatísticos de análise de variância ANOVA e teste Wilcoxon/Kruskal – Wallis confirmaram a homogeneidade de N no material de referência candidato com 95 % de confiança ($p > 0,05$).

4.3.1.4. Estudo de micro-heterogeneidade

A micro-heterogeneidade do material foi avaliada usando pequenas quantidades de amostra (3 mg), tomadas dos mesmos dez frascos utilizados no teste de homogeneidade entre frascos. O grau de homogeneidade do material foi avaliado usando as constantes de Ingamells (K_s) e Kurfürst (H_E). A Tabela 26 apresenta os resultados analíticos, as componentes da incerteza da homogeneidade a 1% e a constante de amostragem de Ingamells (K_s) e Kurfürst (H_E).

Tabela 26. Homogeneidade dos elementos químicos no material de referência candidato determinado por INAA (NIST), para massas de 3 mg e 12 replicatas, 1σ é a incerteza originada das contagens acumuladas na área do fotopico

Elemento	Energia keV	Fração massa (mg/kg)	1σ	u_{exp} (%)	u_c (%)	u_{AN} (%)	u_{HOM} (%)	H_e	K_s (mg)
Al	1778	2038	20	3,04	1,00	1,28	2,56	4,44	19,7
Br	554	25,23	0,29	3,64	1,14		3,45	5,98	35,8
	777	24,63	0,29	3,40	1,17		3,19	5,53	30,5
Ca	3081	3856	93	2,76	2,41	1,28	0,42	0,73	0,53
Cl	1642	3509	51	2,12	1,47	1,28	0,83	1,44	2,09
	2178	3568	33	1,45	0,93	1,28	*-	-	-
K	1524	19429	149	1,19	0,77		0,91	1,57	2,48
La	487	0,907	0,024	2,46	2,70		-	-	-
	1596	0,896	0,016	1,77	1,74		0,33	0,57	0,33
Mg	843	1924	74	4,32	3,77	1,28	1,68	2,91	8,47
	1014	1867	145	7,18	7,76	1,28	-	-	-
Mn	846	140,6	0,6	4,00	0,42	1,28	3,76	6,52	42,4
	1811	141,2	1,7	3,90	1,21	1,28	3,48	6,03	36,4
Na	1368	8,12	0,24	8,88	2,11		8,62	14,9	223
	2754	7,94	0,20	8,57	1,74		8,40	14,5	212
Sm	103	0,066	0,003	5,84	4,81		3,31	5,73	32,9
V	1434	1,079	0,106	13,8	9,74	1,28	9,74	16,9	285

Os valores da incerteza experimental (u_{exp}) e contagem estatística (u_c) apresentados na Tabela 26 são influenciados diretamente pela diferença na espessura da pastilha (0,1 mm) e do padrão (1,5 mm) e a distância da amostra e padrão ao detector. Para radionuclídeos de meia-vida mais curta (para os elementos Al, Br, Ca, Cl, K, La, Mg, Mn, Na, Sm e V), a distância ao detector foi de 2 cm. A incerteza experimental (u_{exp}) devido ao desvio padrão entre as amostras aumenta à medida que diminui a massa de amostra, tal como foi observado no teste de homogeneidade dentro do frasco usando massas de 10 mg.

As u_{exp} para V e Na foram elevadas 8,62 % e 9,74% respectivamente; enquanto os valores de u_c foram menores que de u_{exp} , com exceção de ^{27}Mg na linha 1014 keV, onde $u_c > u_{exp}$.

As incertezas relativas para massas de 3 mg foram as seguintes: $u_{\text{exp}} = 1,19\%$ a $13,8\%$, $u_{\text{c}} = 0,42\%$ to $9,74\%$, $u_{\text{HOM}} = 0,33\%$ a $9,74\%$, com valores de $K_{\text{s}} = 0,33\text{ mg}$ a 285 mg e $H_{\text{E}} = 0,57$ to $16,9$. O fator de homogeneidade (H_{E}) para determinação de elementos traços é geralmente aceito como menor que dez ($H_{\text{E}} < 10$). Assim, os resultados obtidos foram insatisfatórios para Na (14,5) e V (16,9).

4.3.2. Determinação de nutrientes por PGAA

Para a determinação de N e Si em material de referência candidato foram selecionados 4 frascos, 10, 111, 159 e 202. Os resultados obtidos para Si e N em diferentes energias de raios gama são apresentados na Tabela 27.

Tabela 27. Fração de massa de Si e N em material de referência de folhas de cana-de-açúcar usando PGAA, expresso em mg/kg

Elemento	Energia keV	Frascos				Média	SD	RSD (%)
		10	111	159	202			
N	5297	31968	25538	28293	26456	28064	2844	10,1
	5532	28406	26302	28406	28406	27880	1052	3,8
	10829	26859	26016	30654	27703	27808	2019	7,3
Si	3539	6497	6612	7128	6978	6804	298	4,4
	4934	6867	6452	7116	7118	6888	314	4,6

Para Si, as frações de massa médias encontradas em 3539 keV e 4934 keV foram similares, com $\text{RSD} < 5,0\%$. A fração de massa de Si no material candidato foi estimada como o valor médio do resultado obtido para ambas as energias, isto é, 6846 mg/kg com RSD de 4.2% . Já para o N, foram consideradas as energias de raios gama 5297 keV, 5532 keV e 10829 keV. A fração de massa de N foi 27917 mg/kg com RSD de 6.8% . A determinação de B usando PGAA apresentou diferentes dificuldades relacionadas com o alto sinal de fundo, teor de B no branco analítico (papel filtro), baixa taxa de contagem na amostra (11cps) e interferências espectrais de Na (472 keV) e Ni (483 keV). Assim não foi possível quantificar este elemento. A Figura 80 apresenta o espectro típico para B em 478 keV para o branco, material de referência e cana-de-açúcar.

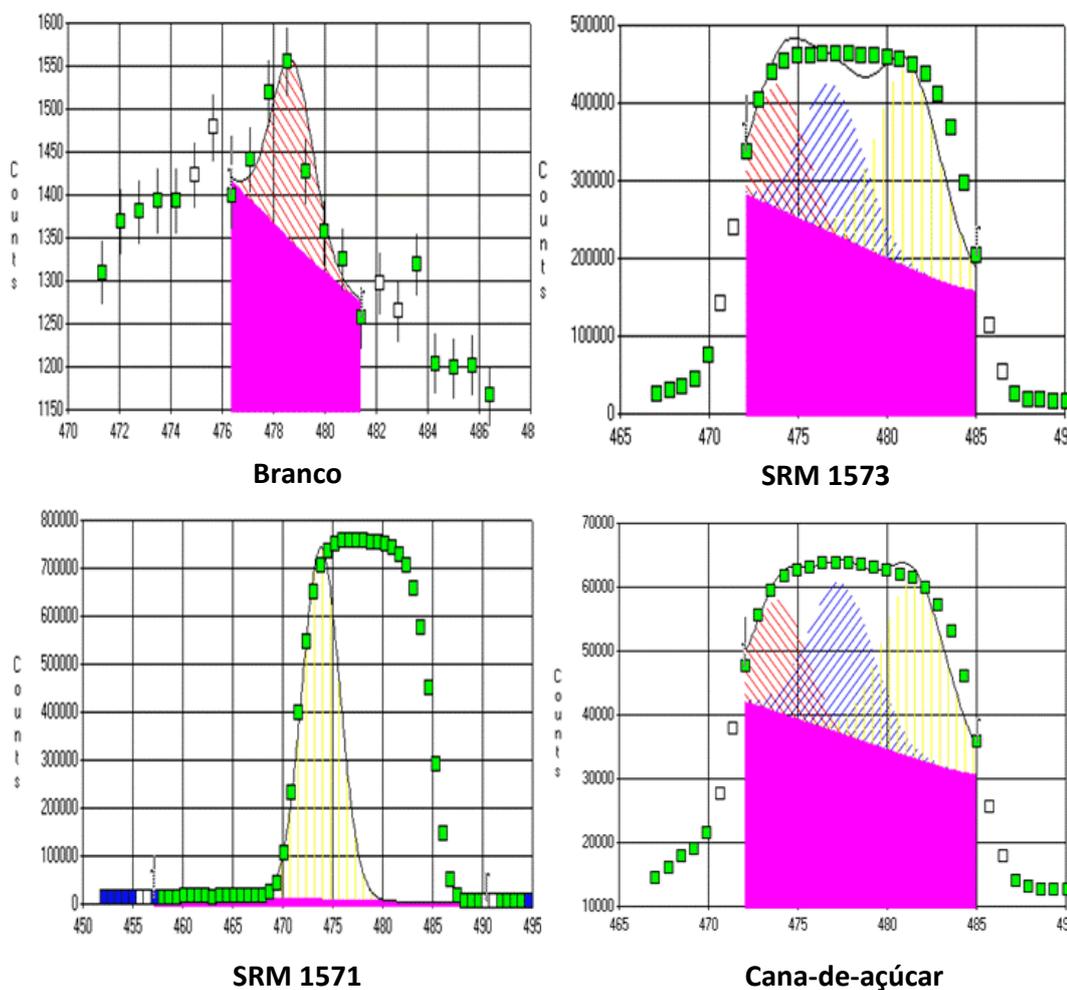


Figura 80. Espectros típicos de boro (B) em SRMs, amostra de folhas de cana-de-açúcar e branco determinados por PGAA

4.3.3. Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade para o material de referência candidato foi dividido em estabilidade a curto prazo e a longo prazo. Foram selecionados 18 frascos dos 410 frascos produzidos e armazenados em três condições de temperatura (-20°C , $+20^{\circ}\text{C}$, $+40^{\circ}\text{C}$), a temperatura de referência foi considerada $+20^{\circ}\text{C}$. Foram determinados Br, Ca, Ce, Co, Cs, Fe, Hf, K, La, Na, Rb, Sc, Sm, Sr, Th e Zn por INAA e N pelo método de Kjeldahl.

4.3.3.1. Estabilidade a curto prazo

A estabilidade a curto prazo foi realizada usando 6 frascos armazenados a +40°C por um período de 2 meses. Foram realizadas amostragens do material para $t = 0, 1$ e 2 meses. Os resultados obtidos para os 17 elementos a +40 °C foram comparados com resultados a +20°C, temperatura considerada de referência. Para avaliar a estabilidade do material foram utilizados gráficos de controle de Shewart, considerando como limite inferior e superior dois desvios-padrão da média ($\pm 2SD$). As Figuras 81 a 97 apresentam os resultados para estabilidade a curto prazo. Cada ponto representa o valor médio da fração de massa de 6 frascos analisados em triplicata.

Análise R-ANOVA e o Teste de Wilcoxon / Kruskal-Wallis foram utilizados para avaliar a diferença significativa ($p < 0,05$). As frações de massa dos elementos foram estáveis em condições extremas de +40 °C e 100 % de umidade. No entanto, o conteúdo de umidade residual no material candidato foi incrementando com o tempo de exposição do material, em condições iniciais, 1 mês e 2 meses de armazenamento, ou seja, 4, 6 e 9 %.

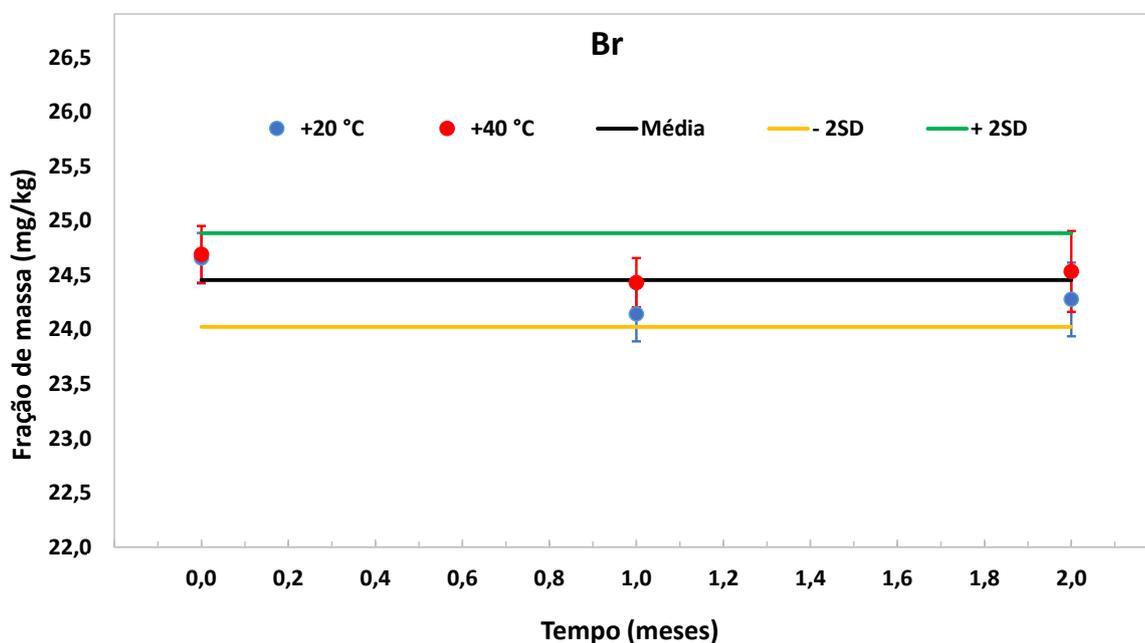


Figura 81. Br - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

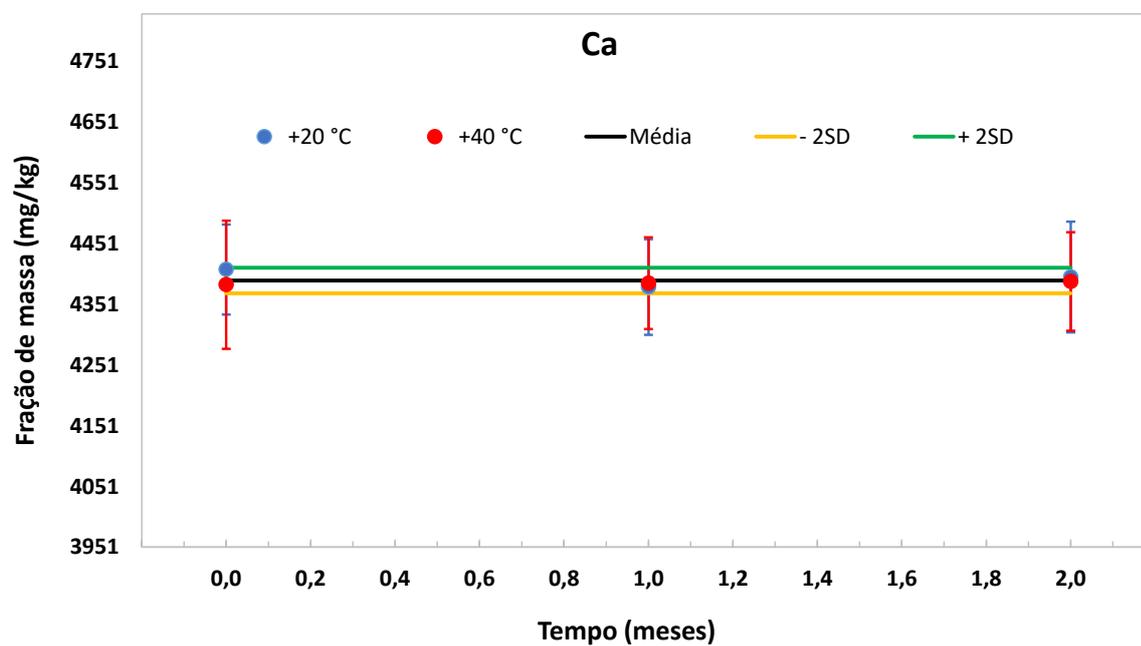


Figura 82. Ca - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

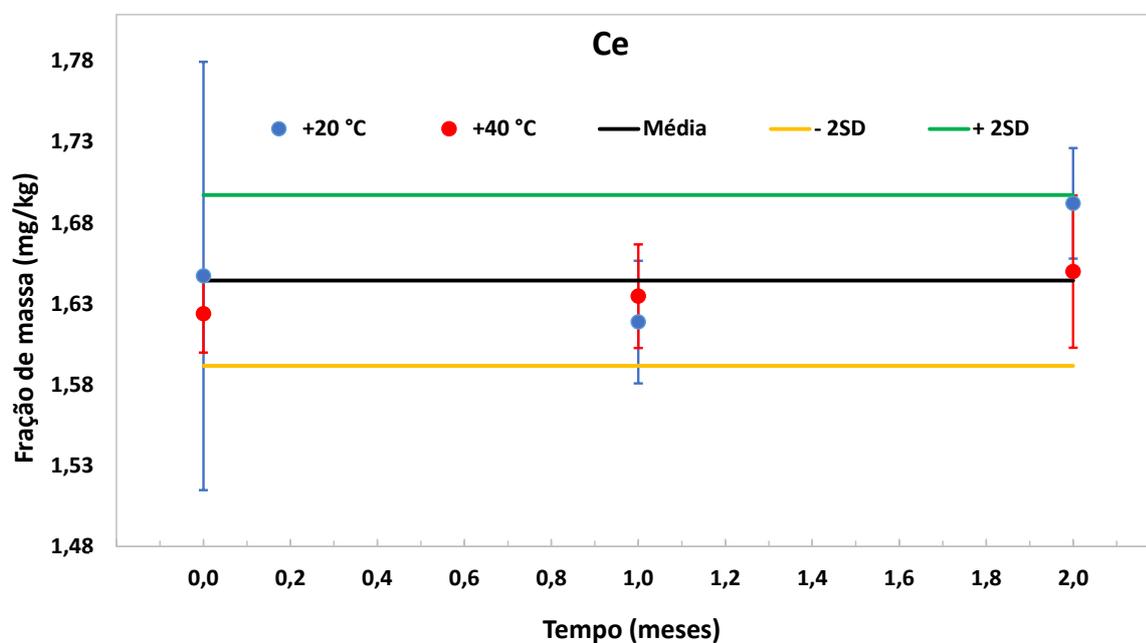


Figura 83. Ce - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

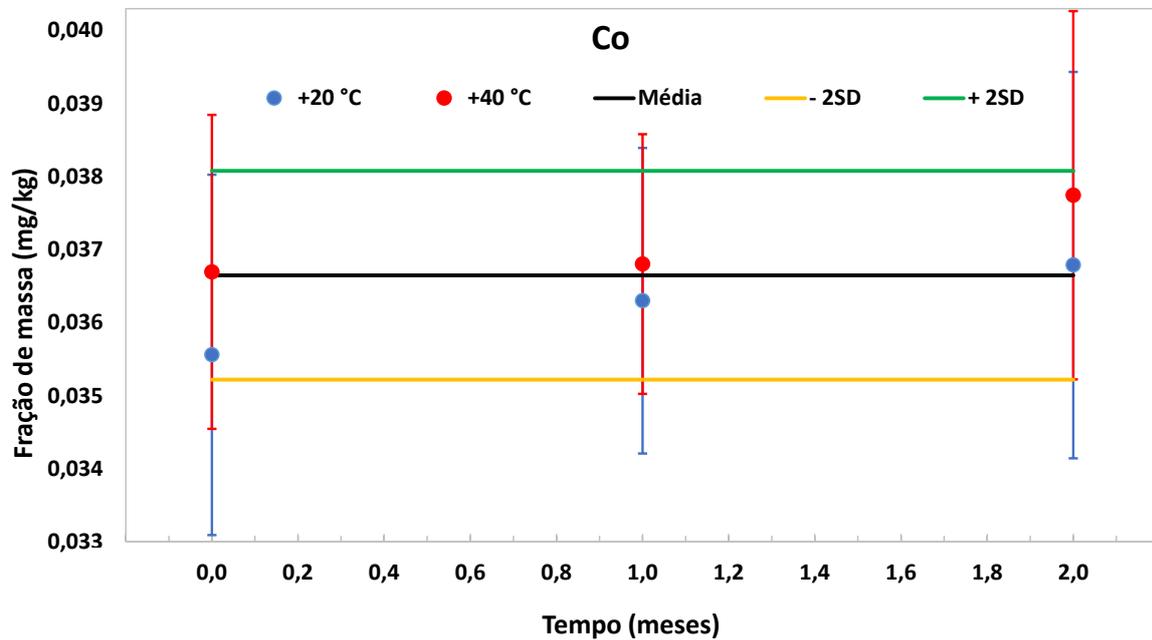


Figura 84. Co - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

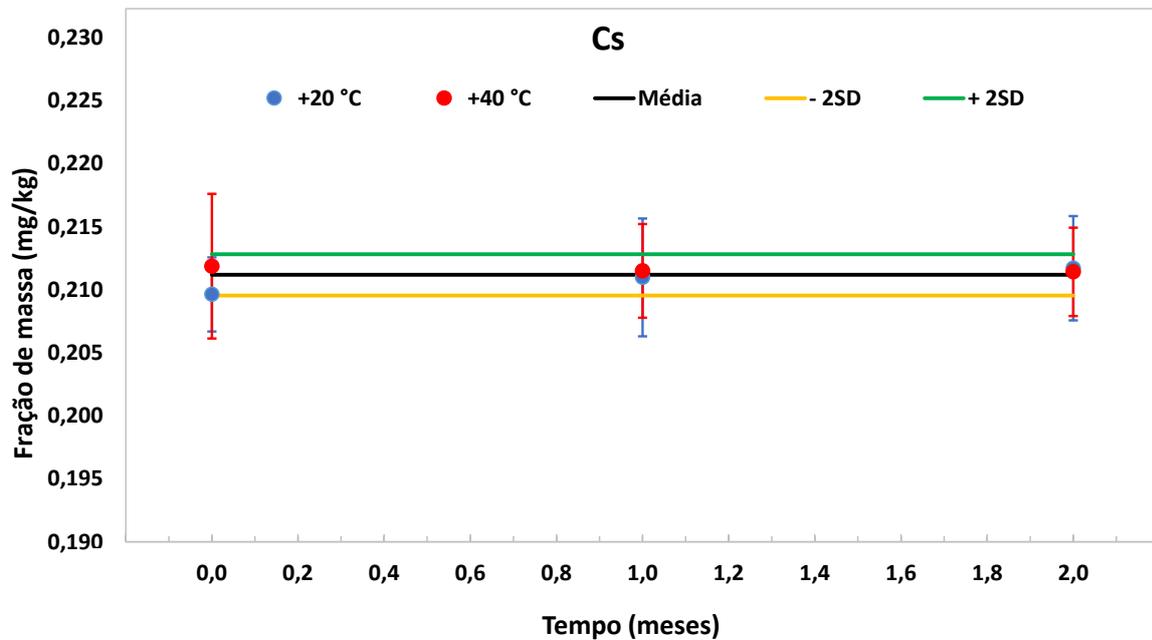


Figura 85. Cs - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1, 2 meses

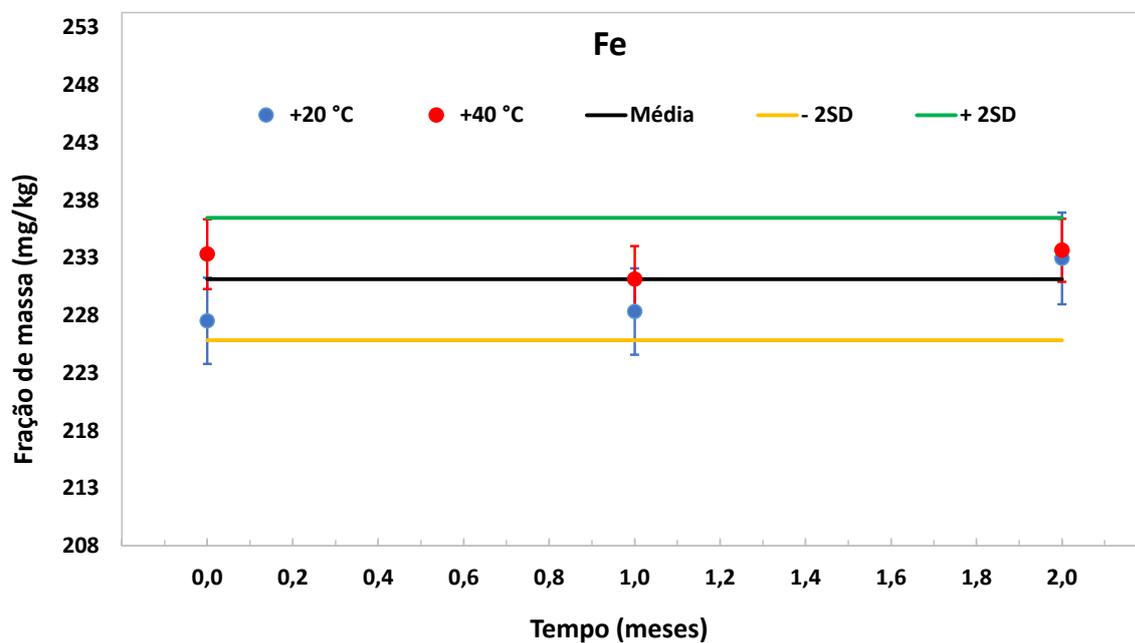


Figura 86. Fe - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

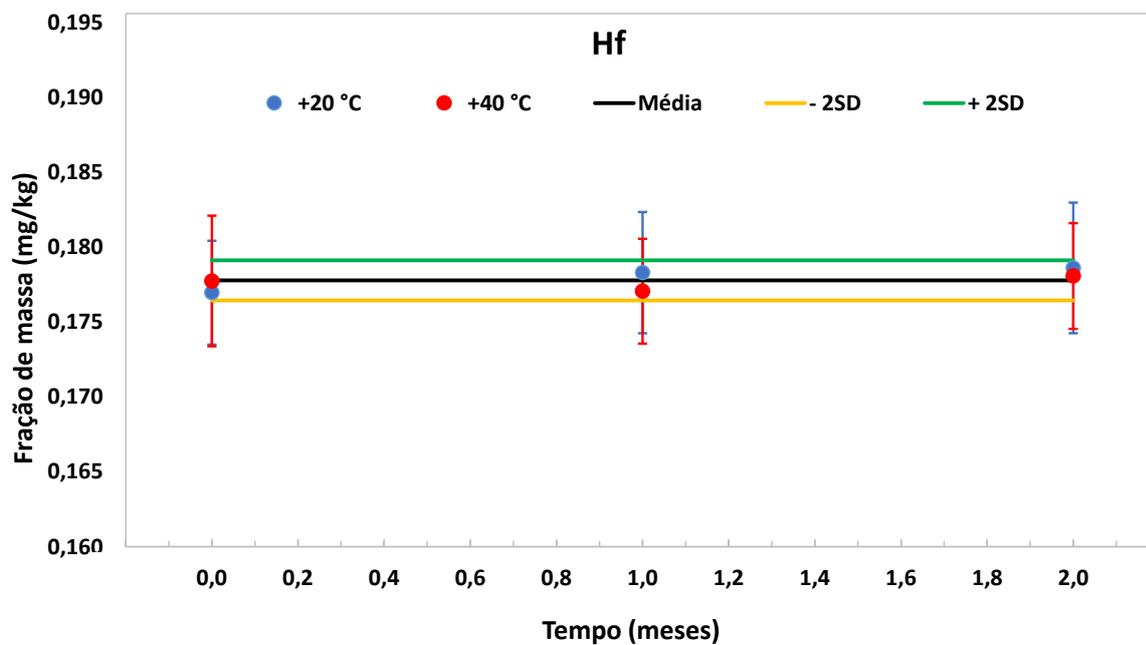


Figura 87. Hf - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

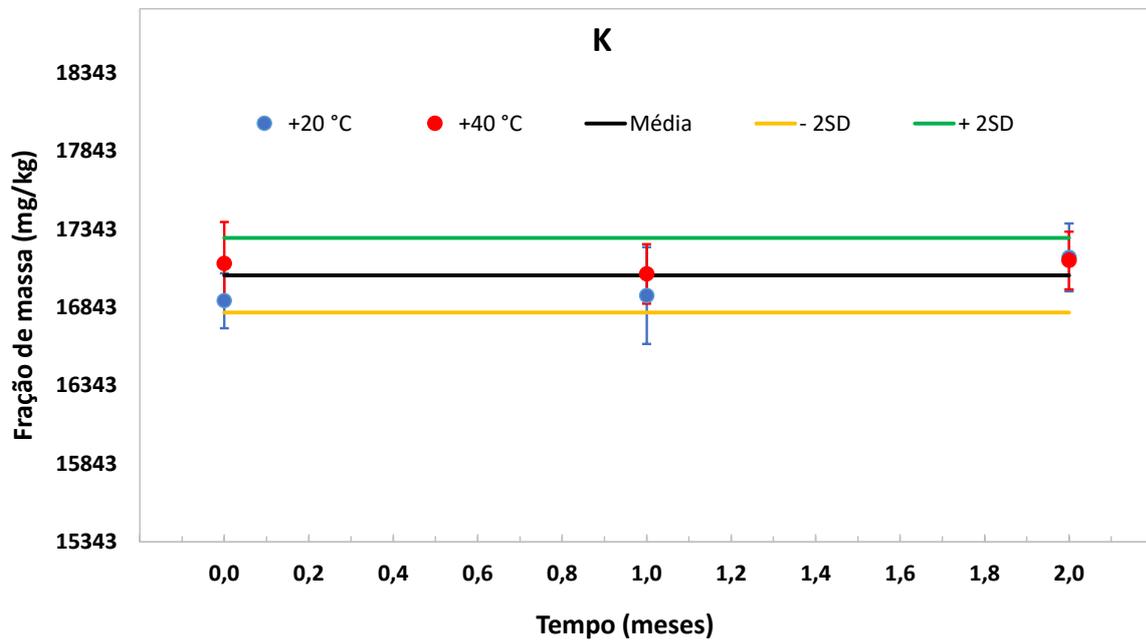


Figura 88. K - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

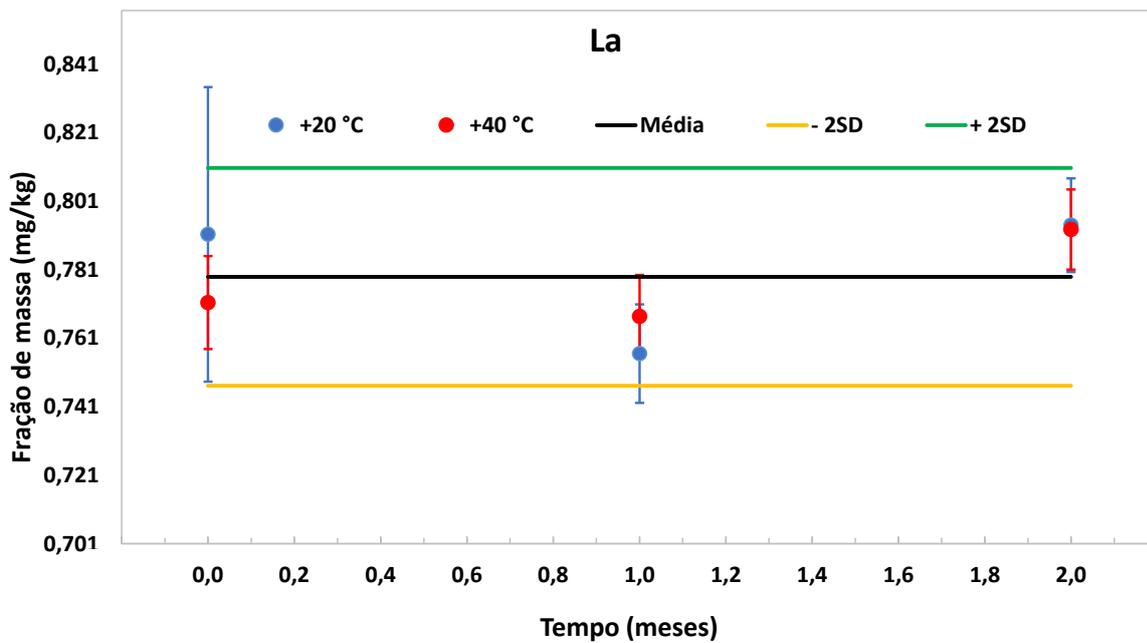


Figura 89. La - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

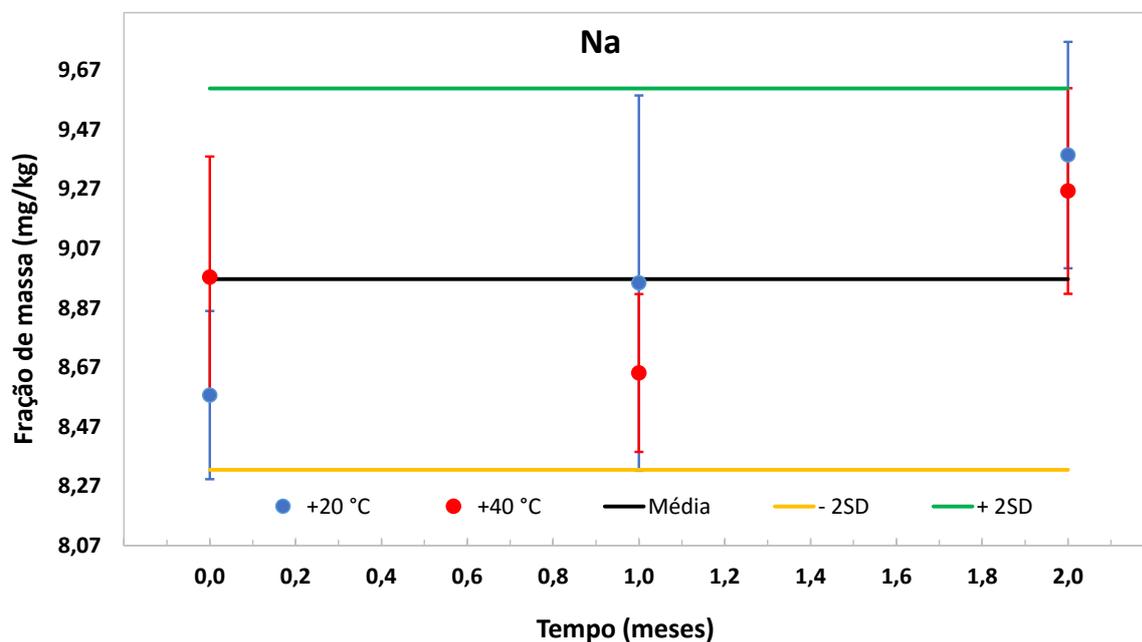


Figura 90. Na - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

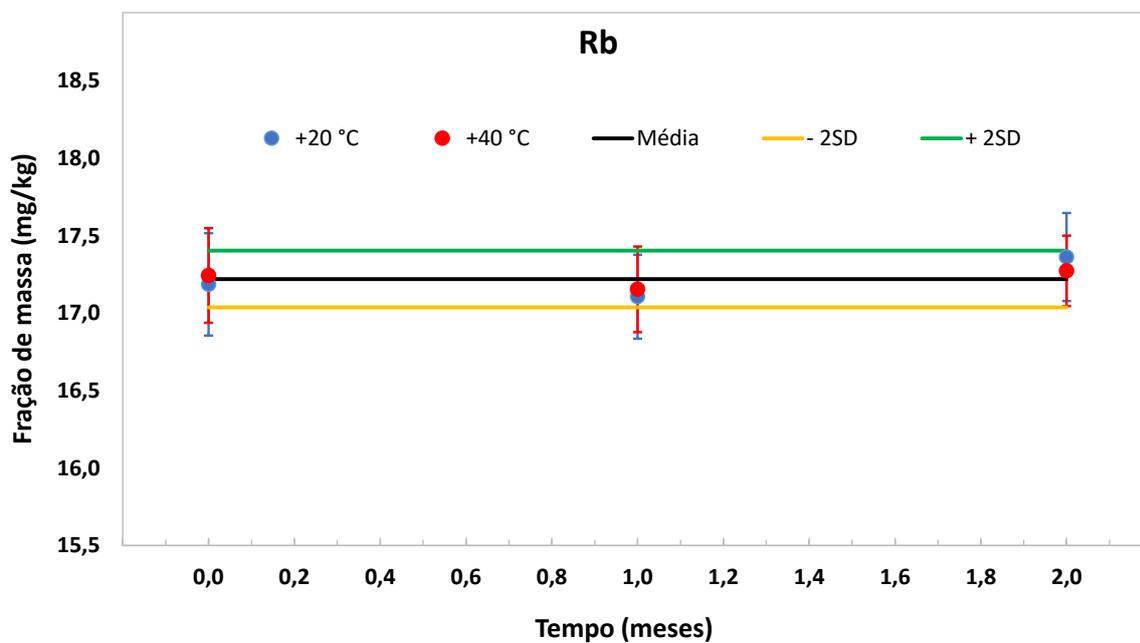


Figura 91. Rb - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

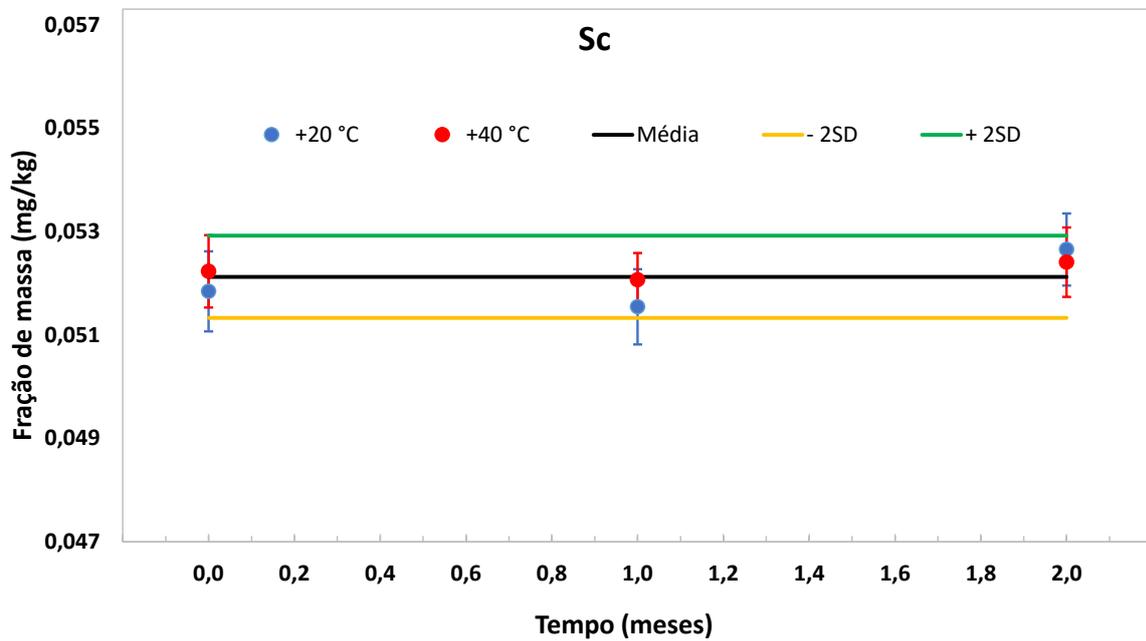


Figura 92. Sc - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

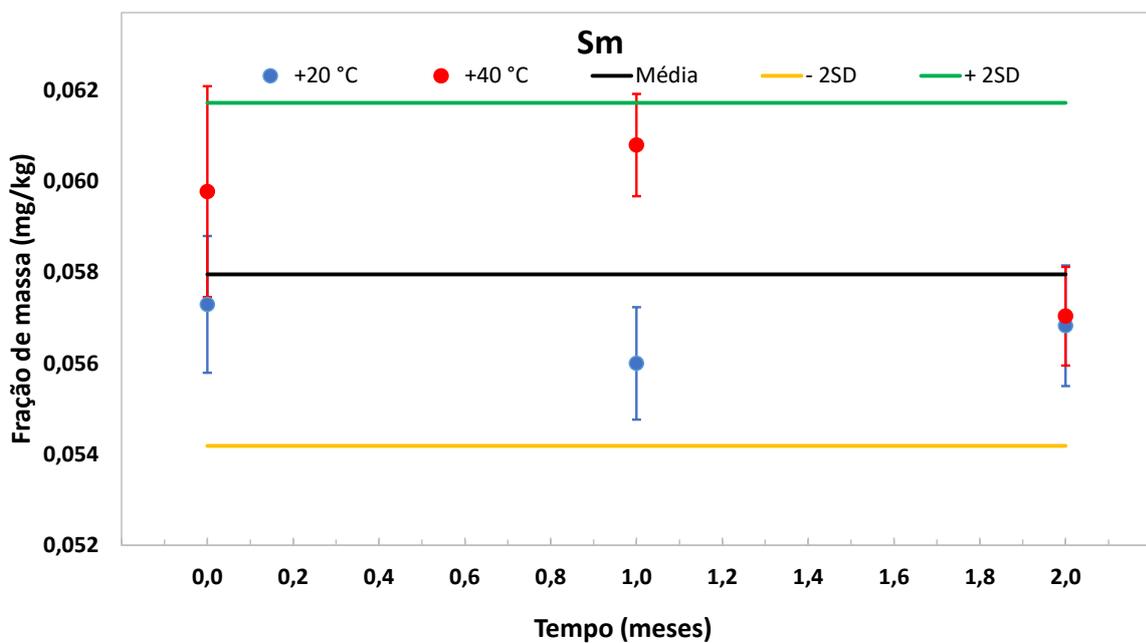


Figura 93. Sm - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

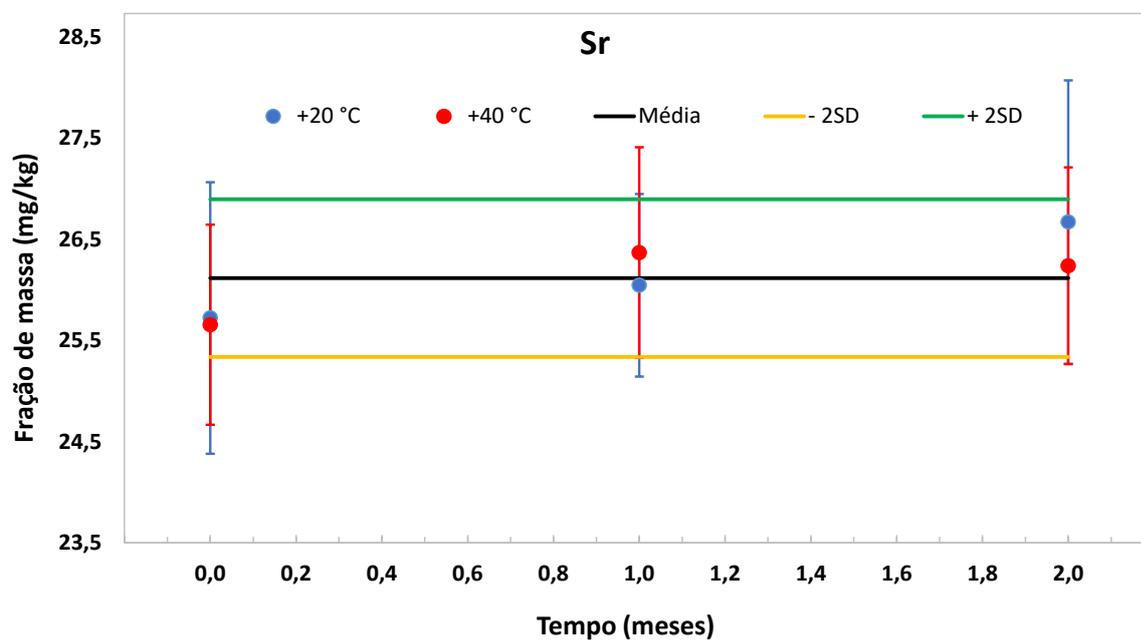


Figura 94. Sr - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

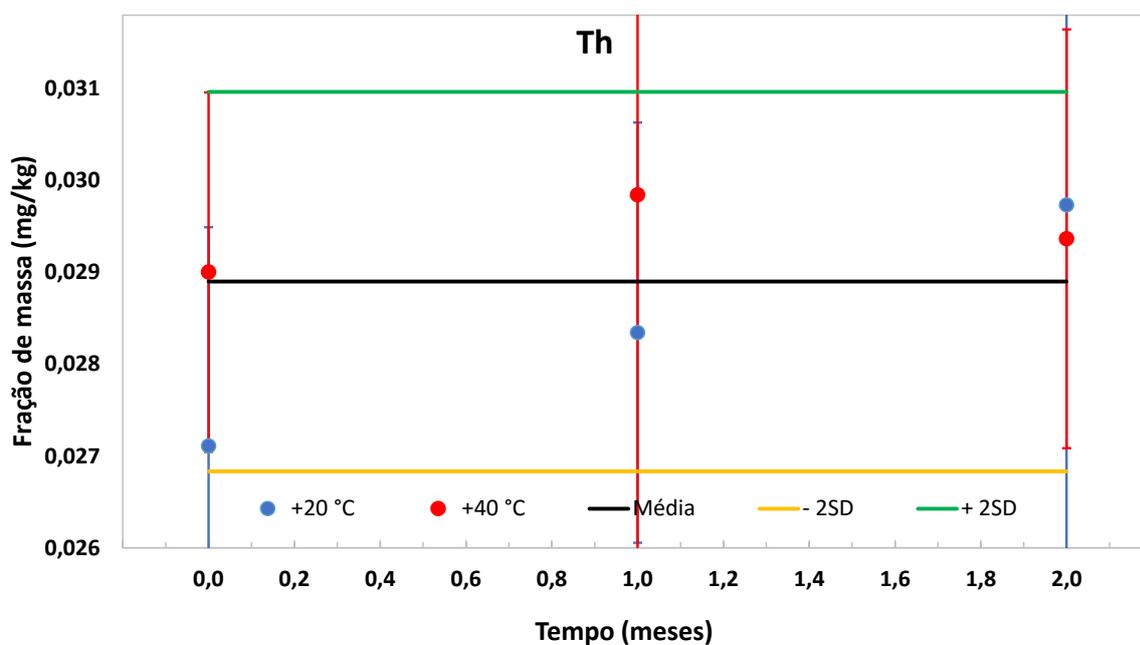


Figura 95. Th - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

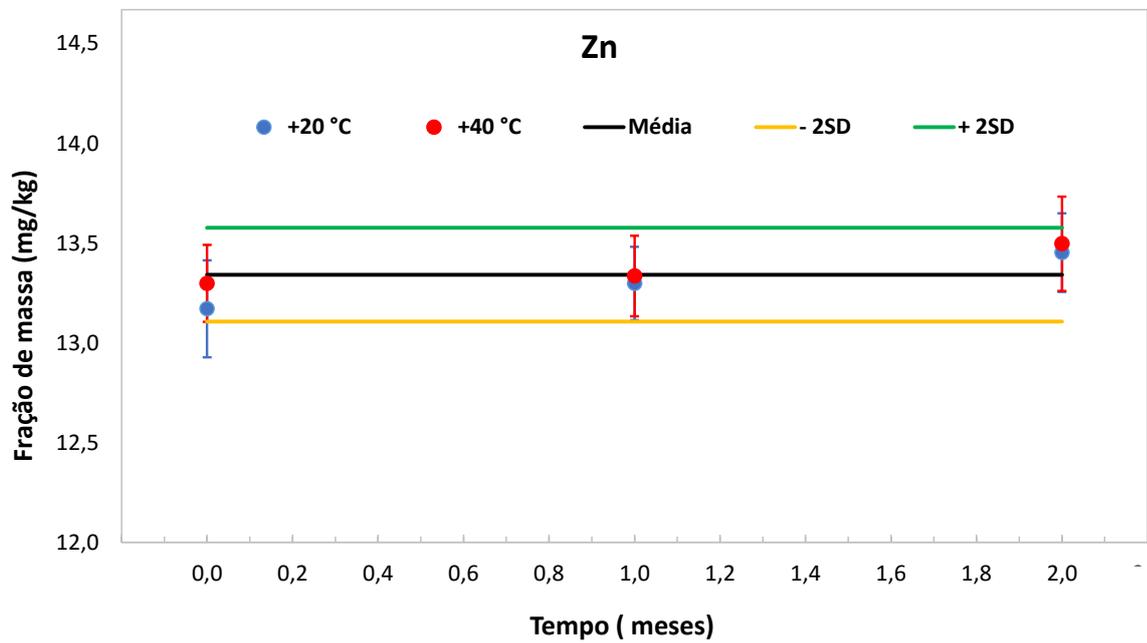


Figura 96. Zn - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

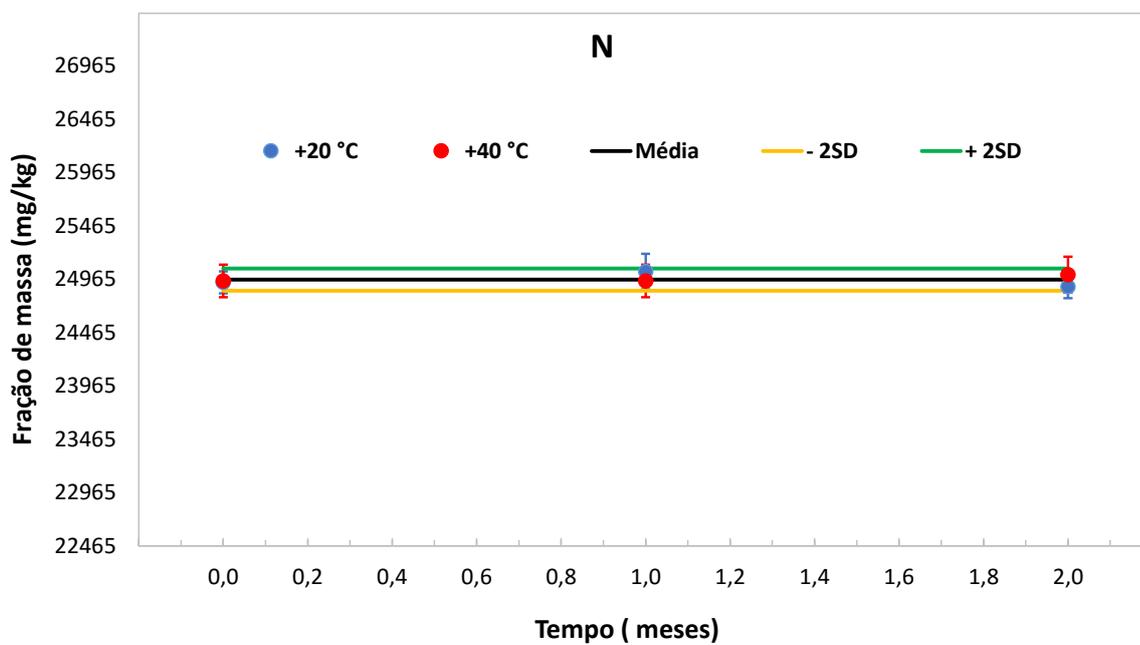


Figura 97. N - Estabilidade a curto prazo a +20 °C e +40 °C, amostragem 0, 1 e 2 meses

Após 2 meses de exposição a + 40 °C, os frascos do material candidato apresentam mudanças físicas tais como cor e foi observado a segregação do material. Contudo as mudanças físicas não alteraram as propriedades químicas do material, tal como é observado nos gráficos de controle. Os coeficientes de variação observados (RSD) foram de 0,21 % (Br) e 3,59 % (Na e Th)

4.3.3.2. Estabilidade a longo prazo

A estabilidade a longo prazo foi avaliada utilizando duas condições de armazenamento com tempos de amostragem de 1, 3, 6 e 9 meses. Os frascos 29, 101, 200, 246, 311 e 394 foram armazenados a +20 °C, enquanto os frascos 1, 95, 188, 280, 343 e 410 a -20° C. Os frascos a +20 °C foram considerados como referência devido às condições controladas para esta temperatura. Para avaliar a estabilidade do material ao longo do tempo, foram construídos gráficos de controle de Shewart, utilizando dois desvios-padrão como limites superior e inferior em um intervalo de confiança de 95 %. A média foi calculada a partir das frações de massa calculadas para os doze frascos avaliados.

As Figuras 98 a 114 apresentam os resultados obtidos para os 16 elementos determinados por INAA e N determinado por Kjeldahl.

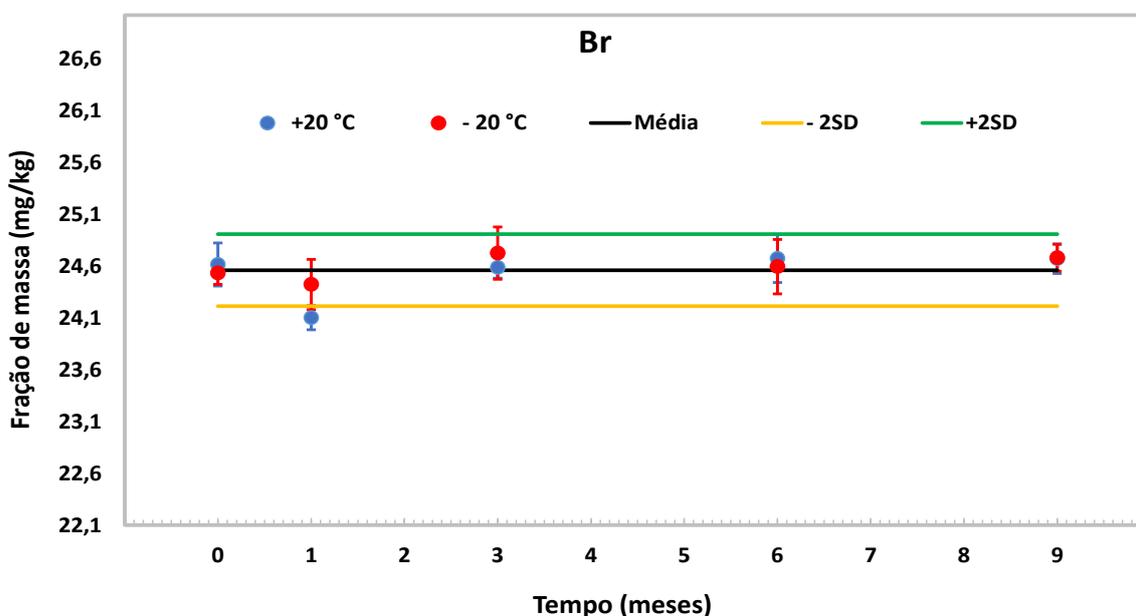


Figura 98. Br - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

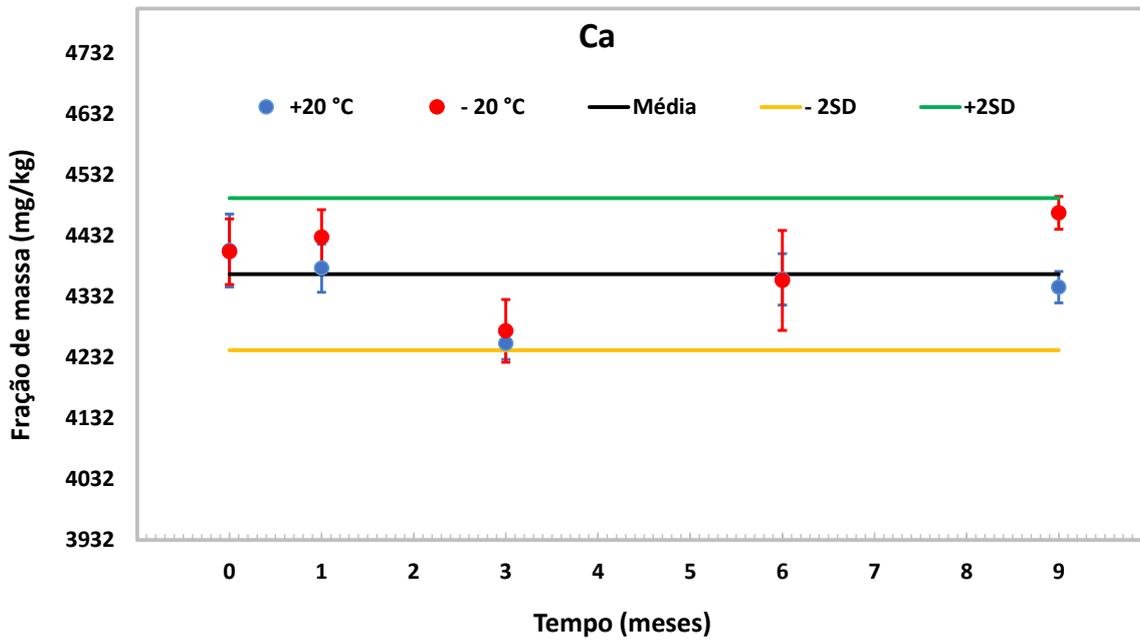


Figura 99. Ca - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

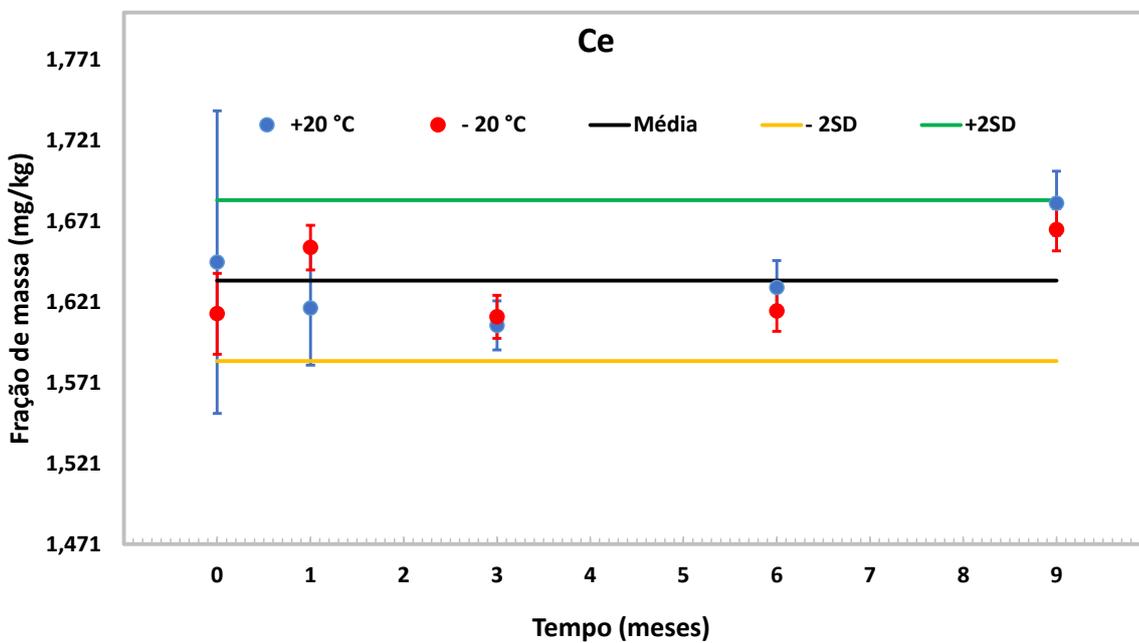


Figura 100. Ce - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

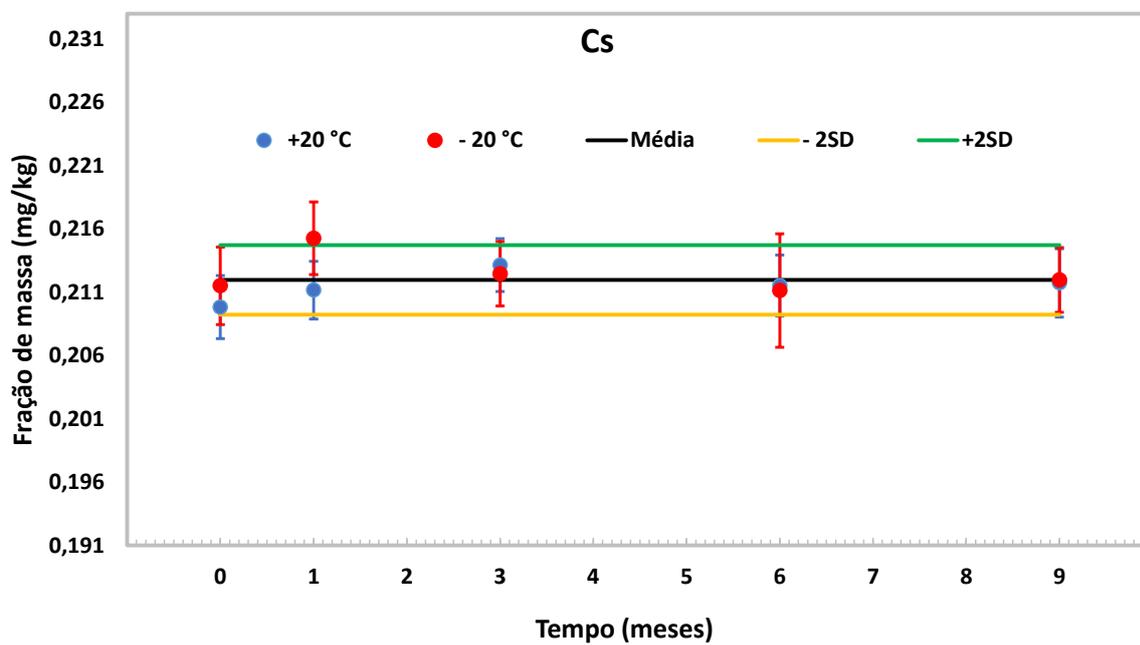


Figura 101. Cs - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

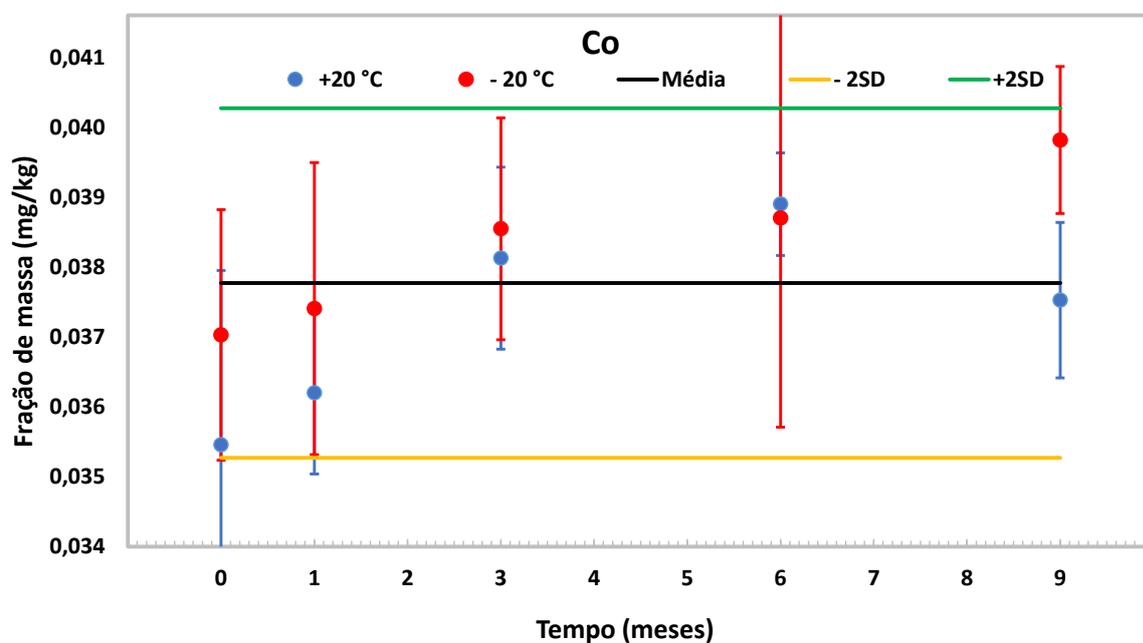


Figura 102. Co - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

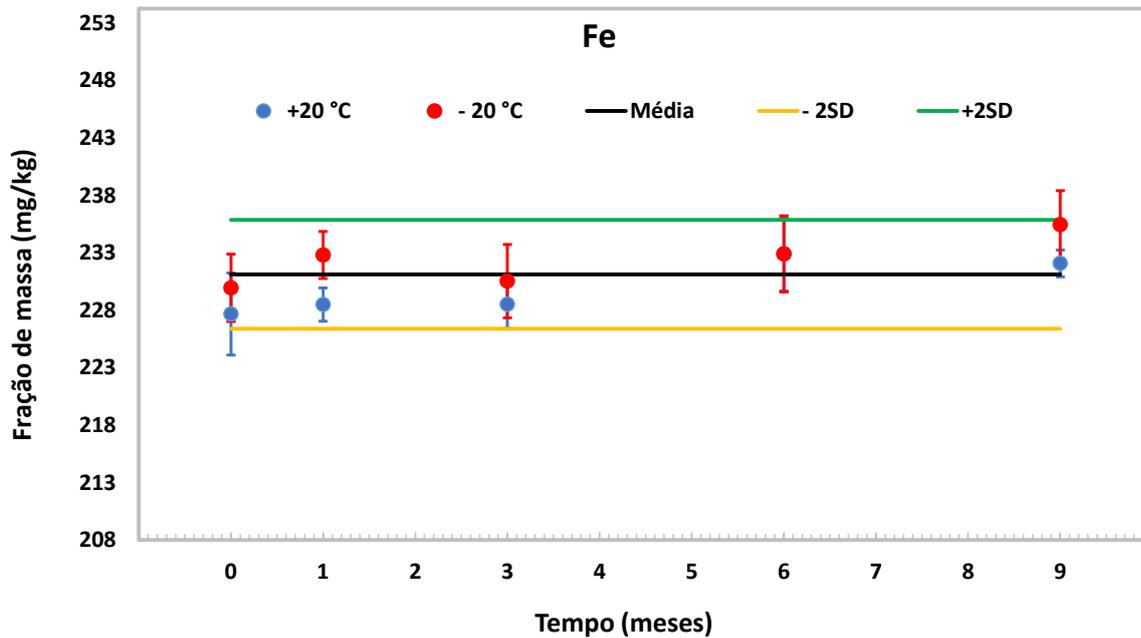


Figura 103. Fe - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

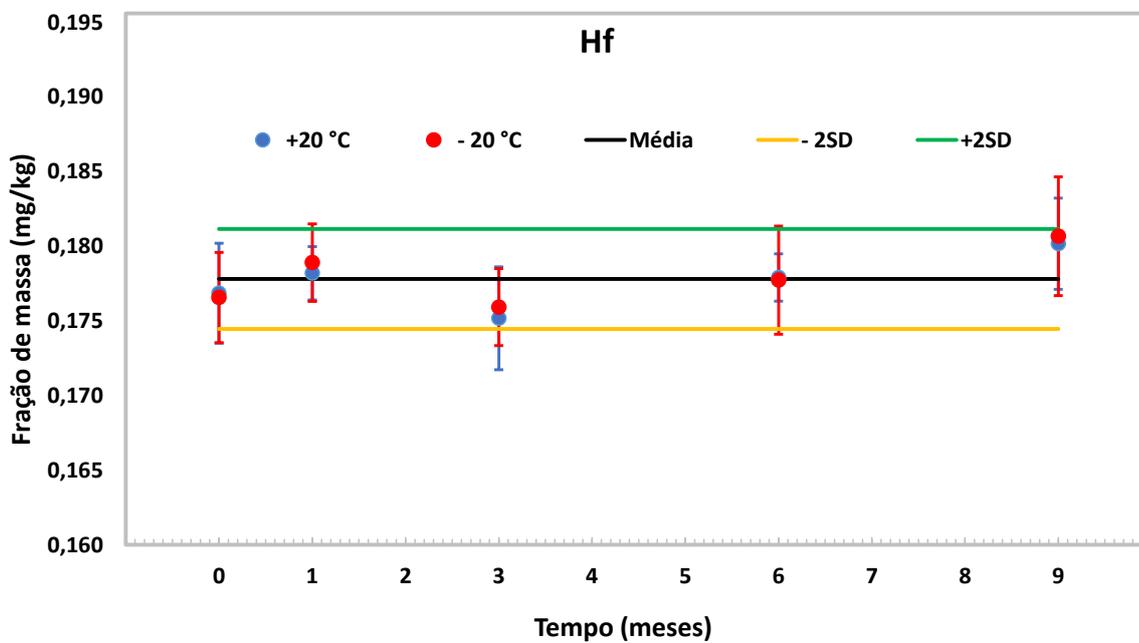


Figura 104. Hf - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

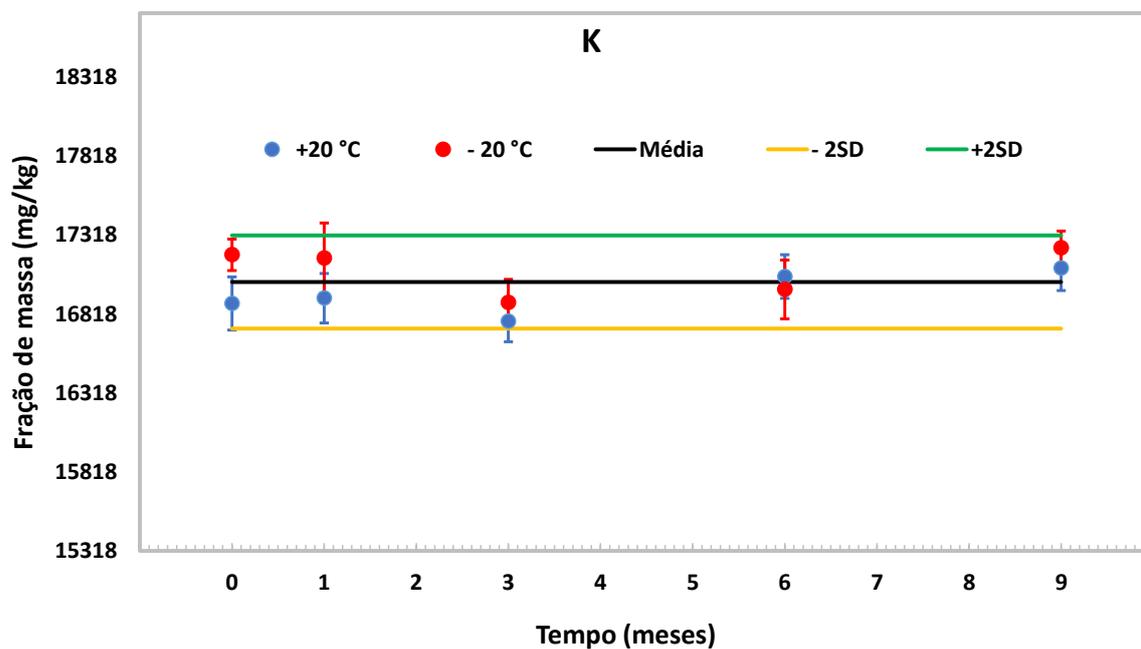


Figura 105. K - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

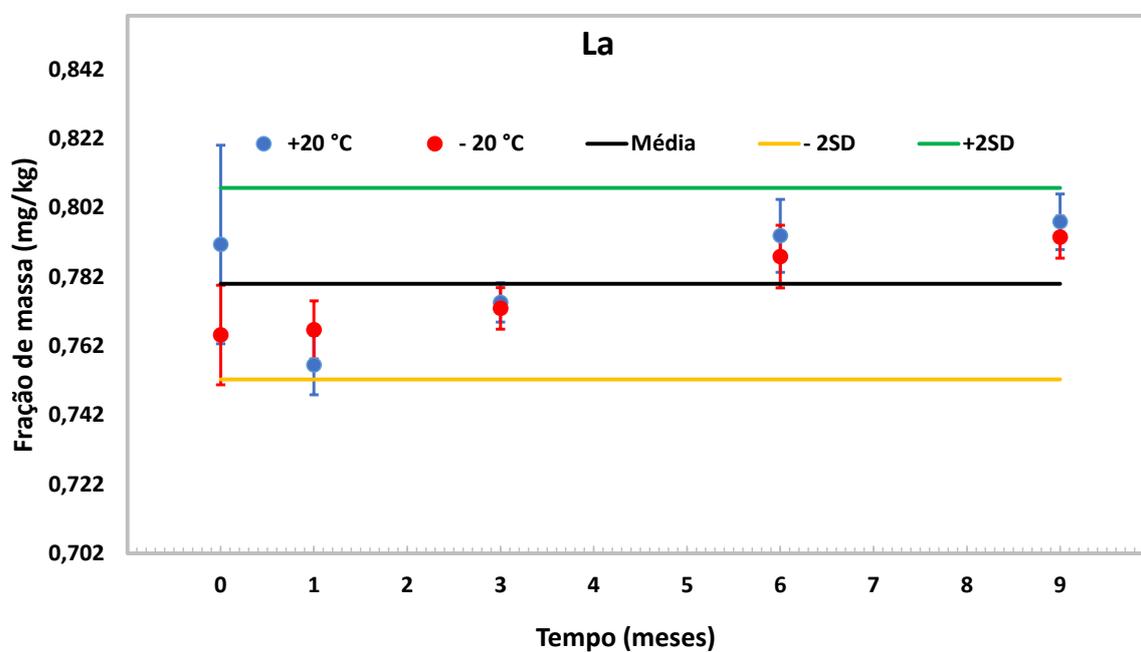


Figura 106. La - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

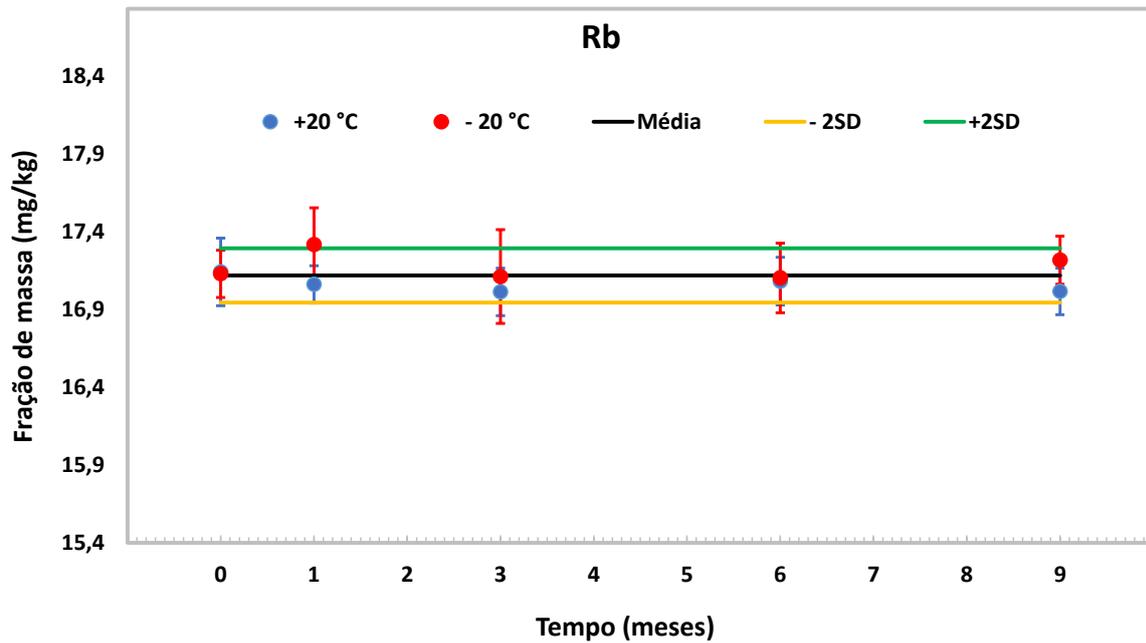


Figura 107. Rb - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

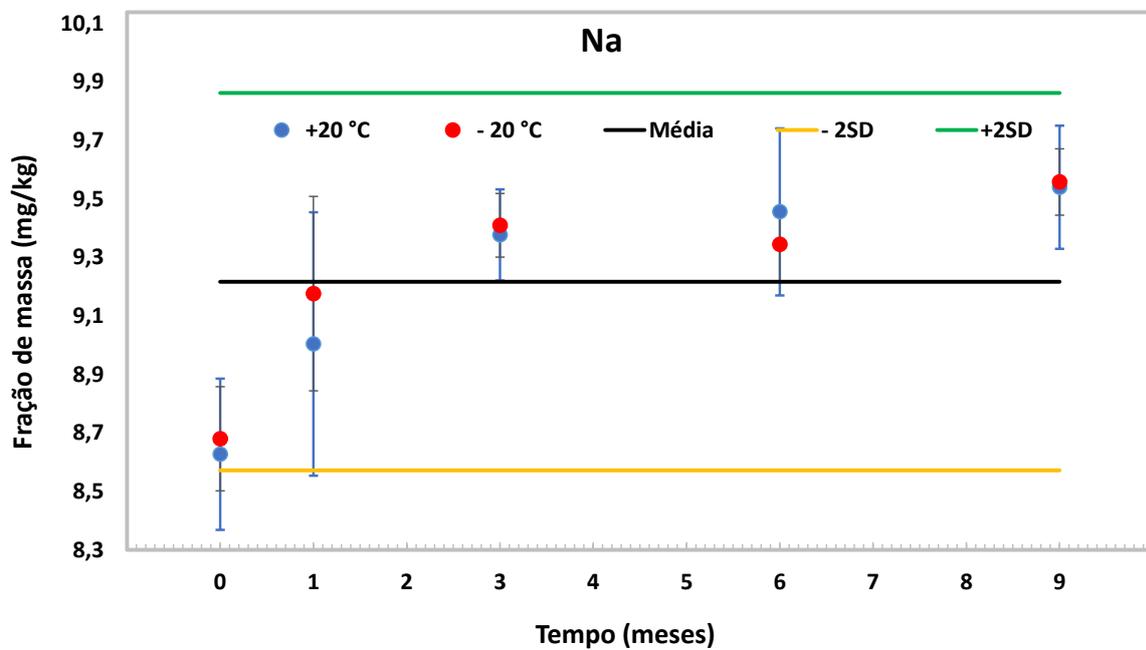


Figura 108. Na - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

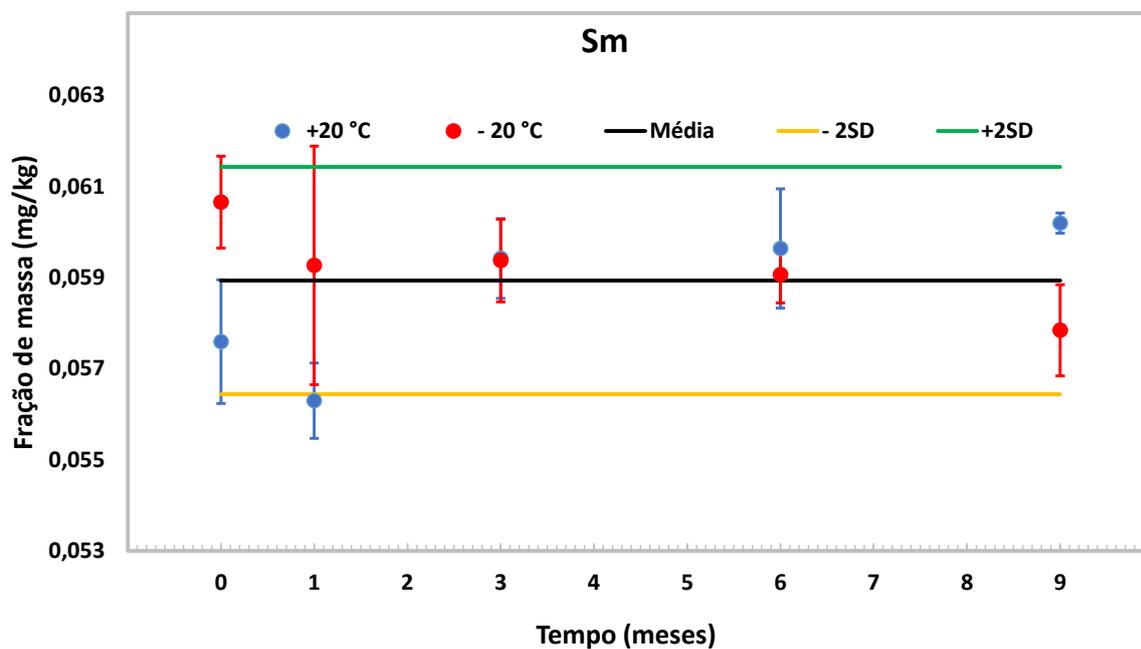


Figura 109. Sm - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

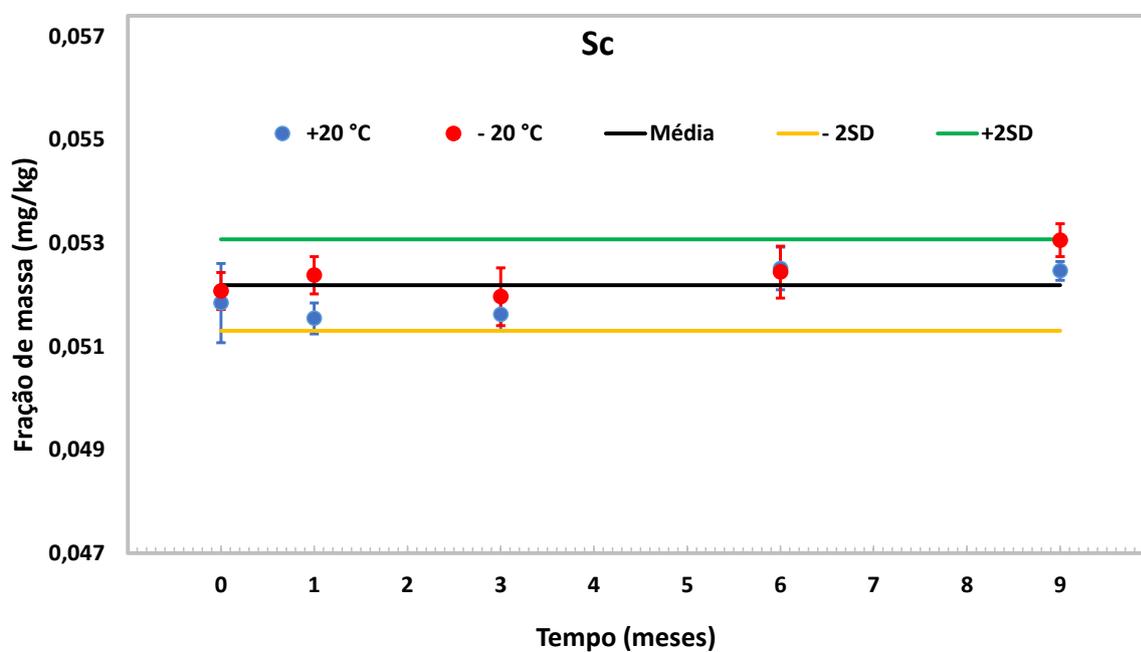


Figura 110. Sc - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

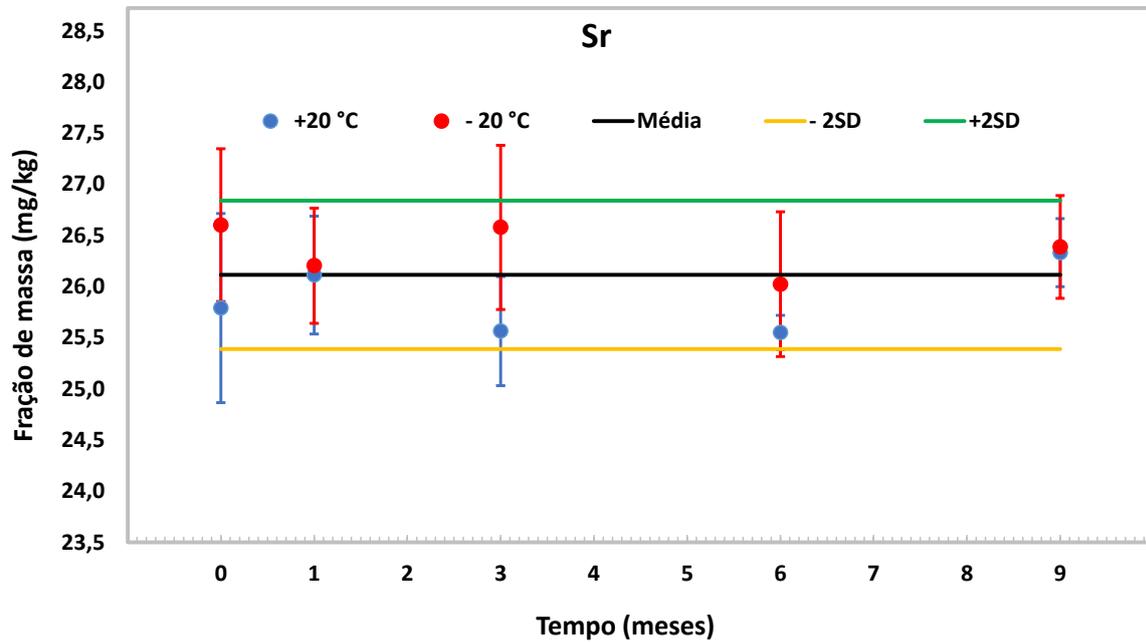


Figura 112. Sr - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

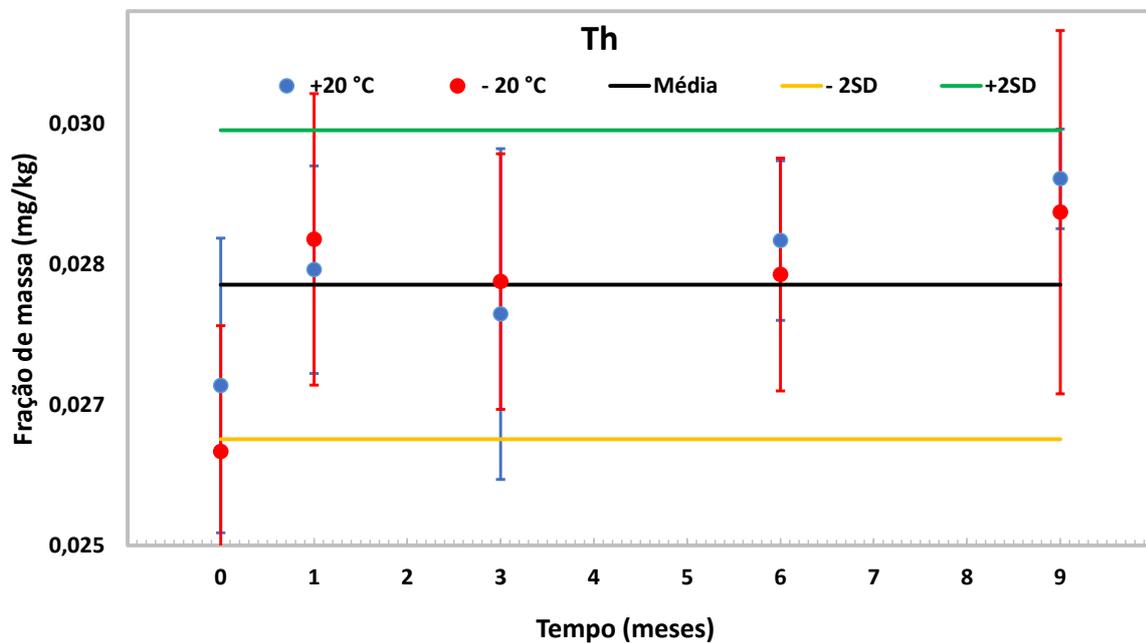


Figura 111. Th - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

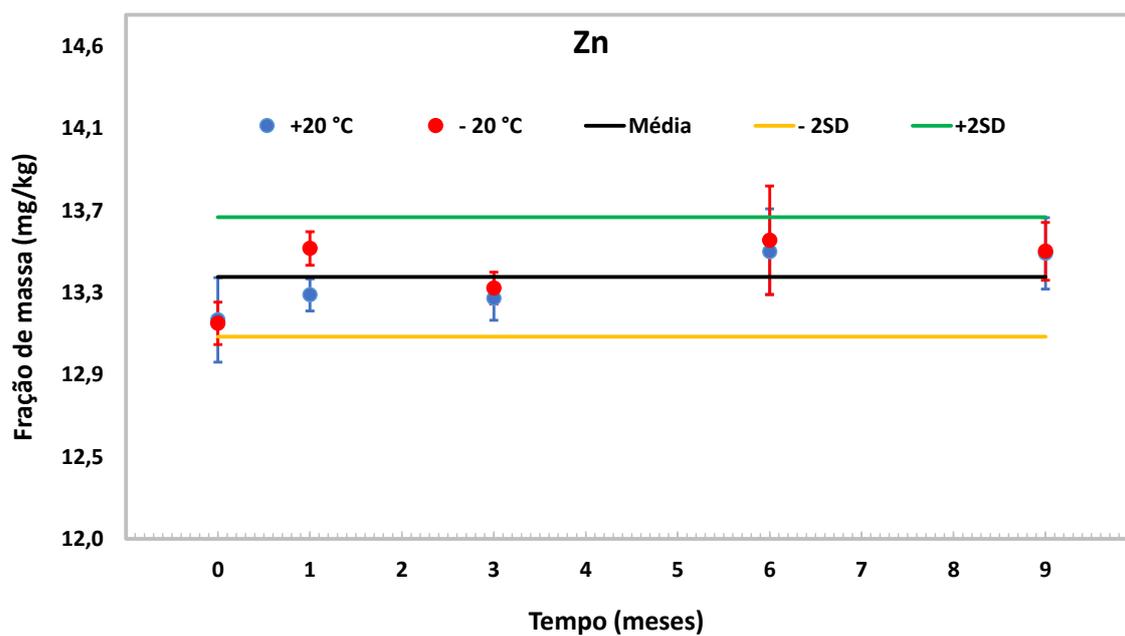


Figura 113. Zn - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3, 6 e 9 meses

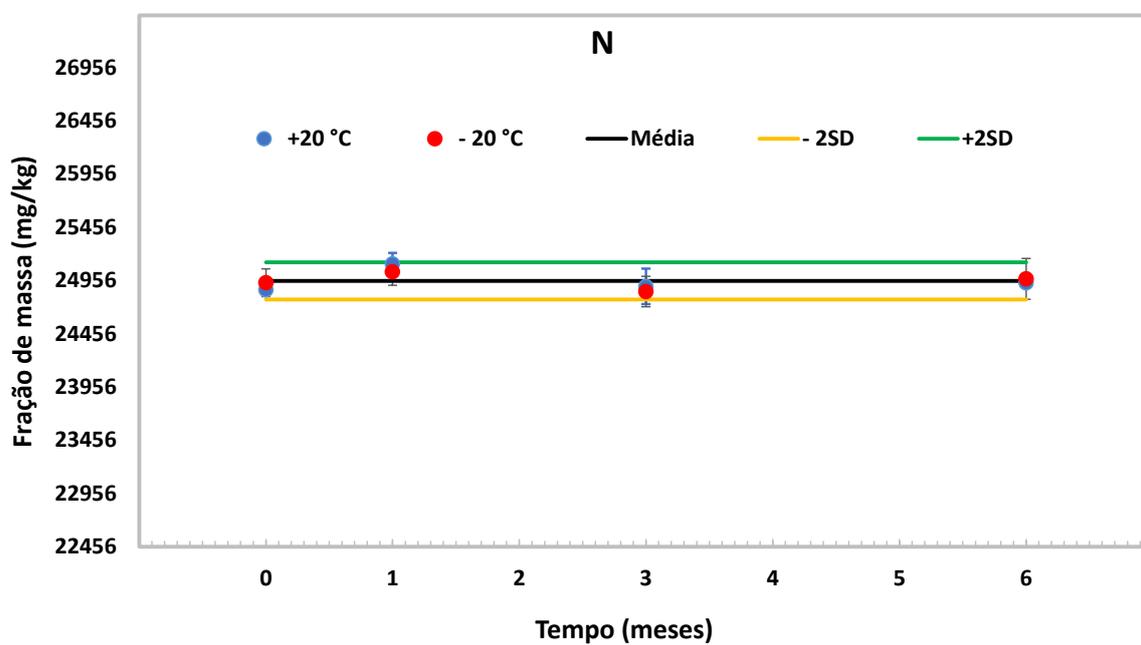


Figura 114. N - Estabilidade a longo prazo para +20°C e -20°C, amostragem 0, 1, 3 e 6 meses

Os gráficos apresentam flutuações na determinação das frações de massa, isto pode ser associado à mudança de condições de amostragem ao longo do tempo e a umidade residual de cada frasco avaliado. Contudo, as frações de massa obtidas para os doze frascos foram encontradas dentro dos limites de controle para quase todos os elementos. Não obstante, algumas exceções foram observadas para estabilidade com 1 mês de amostragem e as duas condições de armazenamento. As frações de massa de Br e Sm a 20°C estiveram no limite de controle inferior (-2SD), enquanto de Cs e Rb a -20°C foram estabelecidas no limite de controle superior (+2SD). No caso do Sm, é devido à baixa estatística de contagem e pequena área de fopicos. O comportamento dos 4 elementos foi avaliado para os períodos de amostragem de 3, 6 e 9 meses, sendo observadas frações de massa dentro dos limites de controle estabelecido ($\pm 2SD$) a um intervalo de confiança de 95%. Com isso, os resultados observados no gráfico de controle não representam a instabilidade do material, estes podem ser associado ao sistema de medição da amostra.

Os valores de desvio padrão relativo (RSD) estabelecidos para os elementos determinados foram de 0,35 % (N) a 3,52 % (Na).

4.3.4. Determinação de cinzas

A Figura 115 apresenta os resultados da determinação do material candidato.

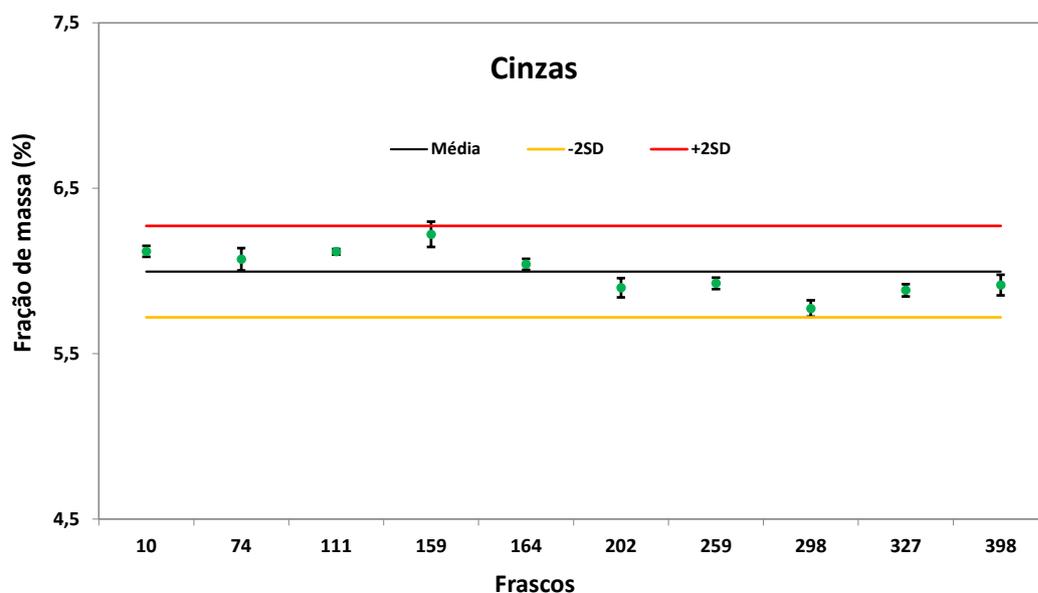


Figura 115. Cinzas do material de referência de folhas de cana-de-açúcar, em intervalos de confiança de 95%, LCL ($\mu - 2SD$) e ULC ($\mu + 2SD$).

O teor de cinza obtido dos 10 frascos foi de 6,0 % com uma variabilidade de medição (RSD) entre os frascos de 2,3 %. A incerteza combinada (u_c) foi de 0,14 %. O teor de cinza foi de 2,48% com CV de 0,3%. Os resultados obtidos não mostram variações grandes na fração de massa de N, estudos com um maior tempo de exposição precisam ser realizados para avaliar o efeito das condições de armazenamento na composição química do material de referência candidato

4.3.5. Caracterização química final do material candidato

Os resultados da caracterização final do material candidato são apresentados nas Tabelas 28 a 32. Os elementos associados com suas incertezas incluem Al, Br, Ca, Ce, Cl, Co, Cr, Cs, Fe, K, La, Mg, Mn, Na, Rb, Sc, Sm, Th, V and Zn. Para a atribuição do valor cada fonte de incerteza foi avaliada e os valores relacionados para cada componente. A incerteza padrão combinada e expandida ($k=2$) foram calculadas de acordo com o documento técnico do NIST 1297. Não obstante, Cr e V foram excluídos devido a não homogeneidade do branco no saquinho de polietileno.

Os elementos determinados podem ser utilizados para a avaliação de homogeneidade. A fração de massa destes elementos variou de 1,8 % a 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O Cu e Mo incluídos na determinação por INAA, foram encontrados abaixo do limite (Cu < 6 mg / kg, Mo < 1,4 mg / kg) para a detecção de quase todas as amostras.

Os procedimentos de INAA forneceram resultados para um número significativo de elementos com repetição de medição abaixo do nível de 1%. Nesse sentido, a avaliação final da homogeneidade do material foi satisfatória dentro do lote de amostra. O tamanho de amostra analítica de 200 mg pode ser recomendado para medições reproduzíveis. As componentes de incerteza significativa para a determinação de Al, Br, Ca, Ce, Cl, Co, Cs, Fe, K, La, Mg, Mn, Na, Rb, Sc, Sm, Th, e Zn no material candidato foram avaliadas e estão incluídas nos valores de incerteza combinada e expandida apresentadas nas Tabelas 28 a 32. Estas medidas devem ser consideradas rastreadas pelo SI e adequados para o valor atribuído ao material de referência candidato de folhas de cana-de-açúcar. A Tabela 33 sumariza os elementos com valores certificados e as respectivas incertezas expandidas, a um nível de confiança de 95%, e valores indicativos para Hf, N, P, Sb, Sr e V.

Tabela 28. Frações de massa dos elementos químicos determinados por INAA no material candidato com incertezas associadas

Frascos	Al (mg/kg)	Br (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Ce (mg/kg)
14_SC01	1935	21,85	4472	1,640
14_SC02	1912	21,56	4319	1,618
45_SC03	1886	21,55	4450	1,578
45_SC04	1919	21,74	4323	1,661
89_SC05	1902	21,63	4299	1,655
89_SC06	1869	21,86	4248	1,661
120_SC07	1900	21,82	4487	1,680
120_SC08	1898	21,67	4201	1,648
161_SC09	1891	21,93	4204	1,639
161_SC10	1939	21,77	4391	1,647
212_SC11	1877	22,05	4327	1,678
212_SC12	1903	21,94	4207	1,625
217_SC13	1910	22,12	4436	1,644
217_SC14	1891	21,92	4327	1,727
264_SC15	1927	21,95	4461	1,683
264_SC16	1902	21,87	4421	1,689
316_SC17	1910	21,82	4257	1,706
316_SC18	1903	21,98	4348	1,701
346_SC19	1913	21,89	4235	1,582
346_SC20	1890	22,00	4355	1,680
373_SC21	1911	21,94	4332	1,652
373_SC22	1931	22,03	4234	1,706
402_SC23	1910	21,88	4408	1,677
402_SC24	1904	21,64	4377	1,614
Média	1906	21,85	4338	1,658
SD	17,20	0,154	89,94	0,038
RSD (%)	0,90	0,70	2,07	2,26
Média de incerteza contagem (%)	0,35	1,21	1,59	1,81
Incertezas relativas (%)				
Replicatas (amostra)	0,18	0,14	0,42	0,46
Replicatas (padrão)	0,2	1,19	0,75	0,67
Auto-absorção de nêutrons	0,01	0,01	0,01	0,01
Atenuação de raios gama	0,04	0,04	0,04	0,08
Geometria de irradiação	0,2	0,2	0,2	0,2
Geometria de contagem	0,5	0,5	0,5	0,9
Efeito de cronômetro	0,01	0,01	0,01	0,001
Pureza de padrão	0,02	0,02	0,02	0,02
Preparo de padrão	0,3	0,3	0,3	0,3
Determinação de massa (amostra)	0,003	0,003	0,003	0,003
Incerteza combinada u_c (%)	0,840	1,438	1,172	1,554
Fator de cobertura (k)	2	2	2	2
Incerteza expandida U (%)	1,68	2,88	2,34	3,11
Valor final: média (U)	1906 (32)	21,85 (0,63)	4338 (102)	1,658 (0,052)

Tabela 29. Frações de massa dos elementos químicos determinados por INAA no material candidato com incertezas associadas (continuação)

Frascos	Cl (mg/kg)	Co (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Cs (mg/kg)
14_SC01	3640	0,0356	0,7561	0,2144
14_SC02	3614	0,0539	0,7524	0,1985
45_SC03	3594	0,0373	0,7924	0,2152
45_SC04	3601	0,0379	0,7213	0,2077
89_SC05	3610	0,0405	0,7815	0,2063
89_SC06	3555	0,0378	0,6736	0,2127
120_SC07	3649	0,0346	0,8102	0,2182
120_SC08	3626	0,0371	0,6965	0,2075
161_SC09	3602	0,0383	0,8968	0,2163
161_SC10	3626	0,0355	0,8903	0,2112
212_SC11	3597	0,0353	0,5533	0,2131
212_SC12	3606	0,0441	0,6876	0,2049
217_SC13	3632	0,0443	0,7606	0,2184
217_SC14	3620	0,0361	0,7556	0,2217
264_SC15	3663	0,0373	0,8015	0,2146
264_SC16	3674	0,0363	0,7809	0,2158
316_SC17	3638	0,0480	(2,0236)	0,2233
316_SC18	3602	0,0462	0,7411	0,2161
346_SC19	3598	0,0368	0,8039	0,2046
346_SC20	3591	0,0373	0,8606	0,2110
373_SC21	3640	0,0425	0,7570	0,2117
373_SC22	3670	0,0414	0,6977	0,2114
402_SC23	3631	0,0430	0,7406	0,2130
402_SC24	3622	0,0392	0,8044	0,2152
Média	3621	0,0398	0,7616	0,213
SD	27,66	0,005	0,0743	0,006
RSD (%)	0,76	11,94	9,76	2,66
Média de incerteza contagem (%)	0,70	4,69	3,73	2,43
Incertezas relativas (%):				
Replicatas (amostra)	0,16	2,44		0,54
Replicatas (padrão)	0,56	0,36		0,38
Auto-absorção de nêutrons	0,01	0,01		0,01
Atenuação de raios gama	0,04	0,04		0,06
Geometria de irradiação	0,2	0,2		0,2
Geometria de contagem	0,5	0,9		0,9
Efeito de cronômetro	0,01	0,001		0,001
Pureza de padrão	0,02	0,02		0,02
Preparo de padrão	0,3	0,3		0,3
Determinação de massa (amostra)	0,003	0,003		0,003
Incerteza combinada u_c (%)	0,985	2,797		1,481
Fator de cobertura (k)	2	2		2
Incerteza expandida U (%)	1,97	5,59		2,96
Valor final: média (U)	3621 (71)	0,040 (0,002)		0,213 (0,006)

Tabela 30. Frações de massa dos elementos químicos determinados por INAA no material candidato com incertezas associadas (continuação)

Frascos	Fe (mg/kg)	K (mg/kg)	La (mg/kg)	Mg (mg/kg)
14_SC01	238,6	17847	0,7386	1607
14_SC02	230,1	18144	0,7338	1506
45_SC03	232,9	17700	0,7279	1626
45_SC04	237,7	18148	0,7387	1614
89_SC05	237,1	17662	0,7270	1548
89_SC06	232,6	18152	0,7250	1722
120_SC07	233,0	18085	0,7256	1624
120_SC08	230,4	17669	0,7245	1610
161_SC09	237,3	17939	0,7321	1682
161_SC10	232,4	18020	0,7229	1602
212_SC11	238,6	18428	0,7444	1719
212_SC12	234,6	18370	0,7380	1581
217_SC13	238,2	18586	0,7499	1667
217_SC14	236,1	18028	0,7323	1703
264_SC15	232,2	18218	0,7291	1684
264_SC16	234,9	17906	0,7295	1652
316_SC17	240,0	18092	0,7512	1562
316_SC18	235,3	18106	0,7398	1626
346_SC19	232,9	18276	0,7257	1652
346_SC20	233,9	18023	0,7396	1746
373_SC21	237,1	18047	0,7443	1622
373_SC22	238,2	18051	0,7434	1653
402_SC23	235,2	17960	0,7339	1622
402_SC24	232,2	17799	0,7296	1627
Média	235,1	18052	0,7344	1636
SD	2,81	229,6	0,008	56,75
RSD (%)	1,19	1,27	1,12	3,47
Média de incerteza contagem (%)	1,07	0,24	0,83	3,77
Incertezas relativas (%):				
Replicatas (amostra)	0,24	0,26	0,23	0,71
Replicatas (padrão)	0,36	0,2	0,64	0,38
Auto-absorção de nêutrons	0,01	0,01	0,01	0,01
Atenuação de raios gama	0,04	0,04	0,04	0,04
Geometria de irradiação	0,2	0,2	0,2	0,2
Geometria de contagem	0,9	0,5	0,5	0,5
Efeito de cronômetro	0,001	0,01	0,01	0,01
Pureza de padrão	0,02	0,02	0,02	0,02
Preparo de padrão	0,3	0,3	0,3	0,3
Determinação de massa (amostra)	0,003	0,003	0,003	0,003
Incerteza combinada u_c (%)	1,393	0,860	1,046	1,131
Fator de cobertura (k)	2	2	2	2
Incerteza expandida U (%)	2,79	1,72	2,09	2,26
Valor final: média (U)	235 (7)	18052 (310)	0,734 (0,015)	1636 (37)

Tabela 31. Frações de massa dos elementos químicos determinados por INAA no material candidato com incertezas associadas (continuação)

Frascos	Mn (mg/kg)	Na (mg/kg)	Rb (mg/kg)	Sc (mg/kg)
14_SC01	135,2	10,72	16,96	0,0498
14_SC02	134,2	10,28	16,36	0,0479
45_SC03	133,4	8,99	16,94	0,0496
45_SC04	132,9	10,75	16,89	0,0497
89_SC05	132,5	9,97	16,87	0,0490
89_SC06	132,2	9,44	16,92	0,0494
120_SC07	134,8	10,65	16,76	0,0493
120_SC08	133,1	9,21	16,94	0,0492
161_SC09	134,1	13,49	17,00	0,0495
161_SC10	137,5	9,67	16,86	0,0488
212_SC11	133,6	9,67	17,18	0,0505
212_SC12	134,8	9,80	16,68	0,0492
217_SC13	134,5	9,83	16,99	0,0502
217_SC14	133,3	11,10	17,05	0,0502
264_SC15	137,4	10,14	16,96	0,0495
264_SC16	135,6	10,37	16,99	0,0496
316_SC17	135,5	9,75	16,83	0,0495
316_SC18	133,2	9,26	16,74	0,0499
346_SC19	133,3	8,94	17,05	0,0492
346_SC20	133,8	10,86	17,40	0,0503
373_SC21	135,6	9,16	17,27	0,0512
373_SC22	137,4	9,38	17,22	0,0502
402_SC23	135,9	9,42	17,00	0,0500
402_SC24	133,9	9,97	16,58	0,0491
Média	134,5	10,03	16,93	0,0496
SD	1,53	0,96	0,22	0,001
RSD (%)	1,14	9,59	1,30	1,35
Média de incerteza contagem (%)	0,80	5,54	1,00	0,94
Incertezas relativas (%):				
Replicatas (amostra)	0,23	1,96	0,27	0,27
Replicatas (padrão)	0,61	0,5	0,34	0,64
Auto-absorção de nêutrons	0,01	0,01	0,01	0,01
Atenuação de raios gama	0,06	0,04	0,04	0,04
Geometria de irradiação	0,2	0,2	0,2	0,2
Geometria de contagem	0,5	0,5	0,9	0,9
Efeito de cronômetro	0,01	0,01	0,001	0,001
Pureza de padrão	0,02	0,02	0,02	0,02
Preparo de padrão	0,3	0,3	0,3	0,3
Determinação de massa (amostra)	0,003	0,003	0,003	0,003
Incerteza combinada u_c (%)	1,029	2,172	1,392	1,496
Fator de cobertura (k)	2	2	2	2
Incerteza expandida U (%)	2,06	4,34	2,78	2,99
Valor final: média (U)	135 (3)	10,03 (0,44)	16,93 (0,47)	0,050 (0,001)

Tabela 32. Frações de massa dos elementos químicos determinados por INAA no material candidato com incertezas associadas (continuação)

Frascos	Sm (mg/kg)	Th (mg/kg)	V (mg/kg)	Zn (mg/kg)
14_SC01	0,0524	0,0328	0,6879	13,68
14_SC02	0,0499	0,0303	0,5133	13,29
45_SC03	0,0511	0,0297	0,2619	13,36
45_SC04	0,0499	0,0287	0,3771	13,38
89_SC05	0,0533	0,0251	0,5233	13,43
89_SC06	0,0494	0,0297	0,2253	13,59
120_SC07	0,0505	0,0307	0,4796	14,69
120_SC08	0,0494	0,0297	0,6182	13,61
161_SC09	0,0500	0,0281	0,4451	13,97
161_SC10	0,0529	0,0285	0,4506	13,25
212_SC11	0,0540	0,0302	0,4881	13,83
212_SC12	0,0521	0,0266	0,3938	13,10
217_SC13	0,0530	0,0268	0,3861	14,08
217_SC14	0,0477	0,0300	0,3803	13,19
264_SC15	0,0498	0,0264	0,2994	13,52
264_SC16	0,0502	0,0244	0,5510	13,65
316_SC17	0,0517	0,0297	0,1182	13,74
316_SC18	0,0514	0,0264	0,5501	13,62
346_SC19	0,0510	0,0331	0,6111	13,53
346_SC20	0,0522	0,0300	0,5261	13,83
373_SC21	0,0502	0,0349	0,7890	13,19
373_SC22	0,0512	0,0281	0,1395	13,31
402_SC23	0,0507	0,0292	0,3906	13,44
402_SC24	0,0504	0,0283	0,1333	13,17
Média	0,051	0,0291	0,431	13,56
SD	0,001	0,002	0,173	0,354
RSD (%)	2,88	8,43	40,23	2,61
Media de incerteza contagem (%)	2,64	9,46	14,43	0,93
Incertezas relativas (%):				
Replicatas (amostra)	0,59	1,72		0,53
Replicatas (padrão)	0,78	0,44		0,13
Auto-absorção de nêutrons	0,01	0,01		0,01
Atenuação de raios gama	0,08	0,06		0,04
Geometria de irradiação	0,2	0,2		0,2
Geometria de contagem	0,5	0,9		0,9
Efeito de cronômetro	0,01	0,001		0,001
Pureza de padrão	0,02	0,02		0,02
Preparo de padrão	0,3	0,3		0,3
Determinação de massa (amostra)	0,003	0,003		0,003
Incerteza combinada u_c (%)	1,260	2,215		1,433
Fator de cobertura (k)	2	2		2
Incerteza expandida U (%)	2,52	4,43		2,87
Valor final: média (U)	0,051(0,001)	0,029 (0,001)		13,56 (0,39)

Tabela 33. Frações de massa dos elementos químicos no material de referência candidato. Resultados médios e incertezas expandidas expressos em mg/kg de massa seca

Elemento	Fração de massa mg/kg
Al	1906 ± 32
Br	21,85 ± 0,63
Ca	4338 ± 102
Ce	1,658 ± 0,052
Cl	3621 ± 71
Co	0,040 ± 0,002
Cs	0,213 ± 0,006
Fe	235 ± 7
Hf	0,1780
K	18052 ± 310
La	0,734 ± 0,015
Mg	1636 ± 37
Mn	135 ± 3,3
N	24970 ± 506
Na	10,03 ± 0,44
P	2104
Rb	16,93 ± 0,47
Sb	0,013
Sc	0,050 ± 0,001
Sm	0,051 ± 0,001
Sr	26,09
Th	0,029 ± 0,001
V	0,431
Zn	13,6 ± 0,4

*valores indicativos

4.4. Controle da qualidade analítica

No controle da qualidade do estudo de variedades e produção do material de referência candidato, foram utilizados SRM1515, SRM 1570a e INCT-OBTL-5 para determinação elementar por INAA e SRM1515, SRM1570a e SRM1573a para determinação de N por Kjeldahl. Foram irradiados um total de 19 lotes, contendo os três CRMs, enquanto por Kjeldahl foram realizadas 18 determinações para cada CRM. A Tabela 34 apresenta o valor médio e o intervalo de confiança (IC) a 95% para cada elemento de interesse por INAA.

Tabela 34. Comparação dos resultados obtidos para SRM 1515, SRM, 1570a e INCT-OBTL- 5 com os respectivos valores certificados

Elemento	Valor (n=19)	SRM1515		SRM 1570		INCT-OBTL-5	
		mg/kg	IC/U	mg/kg	IC/U	mg/kg	IC/U
Br	Laboratório	1,90	0,03	37,5	0,5	92,6	1,9
	Certificado	(1,8)				87,4	5,4
Ca	Laboratório	15060	256	13865	375	38613	651
	Certificado	15260	150	15270	410	39960	1420
Ce	Laboratório	3,44	0,16	0,36	0,02	3,09	0,07
	Certificado	(3)	-			2,99	0,18
Cs	Laboratório	-	-	0,025	0,002	0,298	0,005
	Certificado	-	-			0,288	0,020
Co	Laboratório	0,090	0,002	0,356	0,002	0,966	0,013
	Certificado	(0,09)		0,390	0,050	0,981	0,067
Fe	Laboratório	73,2	1,1	257,6	2,3	1678	29
	Certificado	83	5				
K	Laboratório	15591	267	27649	516	22261	436
	Certificado	16100	200	29030	520	22710	760
La	Laboratório	21,3	0,2	0,133	0,008	1,69	0,03
	Certificado	(20)				1,69	0,09
Sm	Laboratório	3,17	0,06	0,029	0,003	0,293	0,006
	Certificado	(3)				0,264	0,013
Na	Laboratório	36,8	1,6	18344	174	740	11
	Certificado	24,4	1,2	18180	430		
Sc	Laboratório	0,028	0,001	0,056	0,001	0,643	0,011
	Certificado	(0,030)		(0,055)		0,640	0,027
Rb	Laboratório	10,0	0,1	13,0	0,2	20,0	0,4
	Certificado	10,2	1,5	(13)		19,1	1,0
Zn	Laboratório	12,5	0,2	79,7	0,8	53,5	1,0
	Certificado	12,5	0,3	82	3	52,4	1,8

Para o SRM 1515, foi observado uma porcentagem de recuperação menor para o Fe (88 %), no entanto o valor obtido foi reprodutível ao longo dos experimentos realizados. O RSD

de Fe foi 3%. No caso do Na, foi observado 150 % de recuperação, isto pode ser ocasionado por problemas de contaminação do CRM. A fração de massa média de Na foi de 36,8 mg/kg, enquanto o valor certificado é de 24,4 mg/kg. A recuperação dos outros elementos variou entre 97 % a 100 % para os elementos certificados. Para o SRM 1570a, foram observados valores de RSD entre 1% (Co) a 6% (Ca). Valores indicativos apresentaram maior coeficiente de variação de 10 % (Ce) a 17% (Sm). A recuperação dos elementos com valores certificados foi de 95 % a 102 %. Não obstante, o Ca apresentou recuperação de 91 %. Já para o INCT-OBTL-5, foi observada porcentagem de recuperação de 97% (Ca) a 111 % (Sm).

Os SRMs 1515, 1570a e 1573a utilizados no controle da qualidade da determinação de N pelo método de Kjeldahl apresentaram valores de recuperação de 97 % a 99 %. A Tabela 35 sumariza os valores médios obtidos (n=18) desses CRMs com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Tabela 35. Comparação dos resultados obtidos para SRM 1515, SRM, 1570a e SRM1573a com os respectivos valores certificados

Elemento	Valor (n=18)	SRM1515		SRM 1570		SRM1573	
		mg/kg	IC/U	mg/kg	IC/U	mg/kg	IC/U
N	Laboratório	22356	200	57300	949	29684	231
	Certificado	22500	190	59000	250	30300	900

Por outro lado, foram utilizados três CRMs como controle da qualidade dos procedimentos realizados durante a caracterização do material candidato. Os CRMs utilizados foram SRM 1515, SRM 1572 e SRM 1570. Estes CRMs foram selecionados pelo histórico e rastreabilidade em diferentes tipos de análises realizadas no NIST. Além disso, apresentam valores certificados para a maioria dos elementos de interesse e composição química mais próxima.

As Figuras 116 a 118 apresentam os valores obtidos por INAA comparados com o valor certificado ou valores de consenso. Todos os valores foram normalizados ao respectivo valor certificado ou valor de literatura.

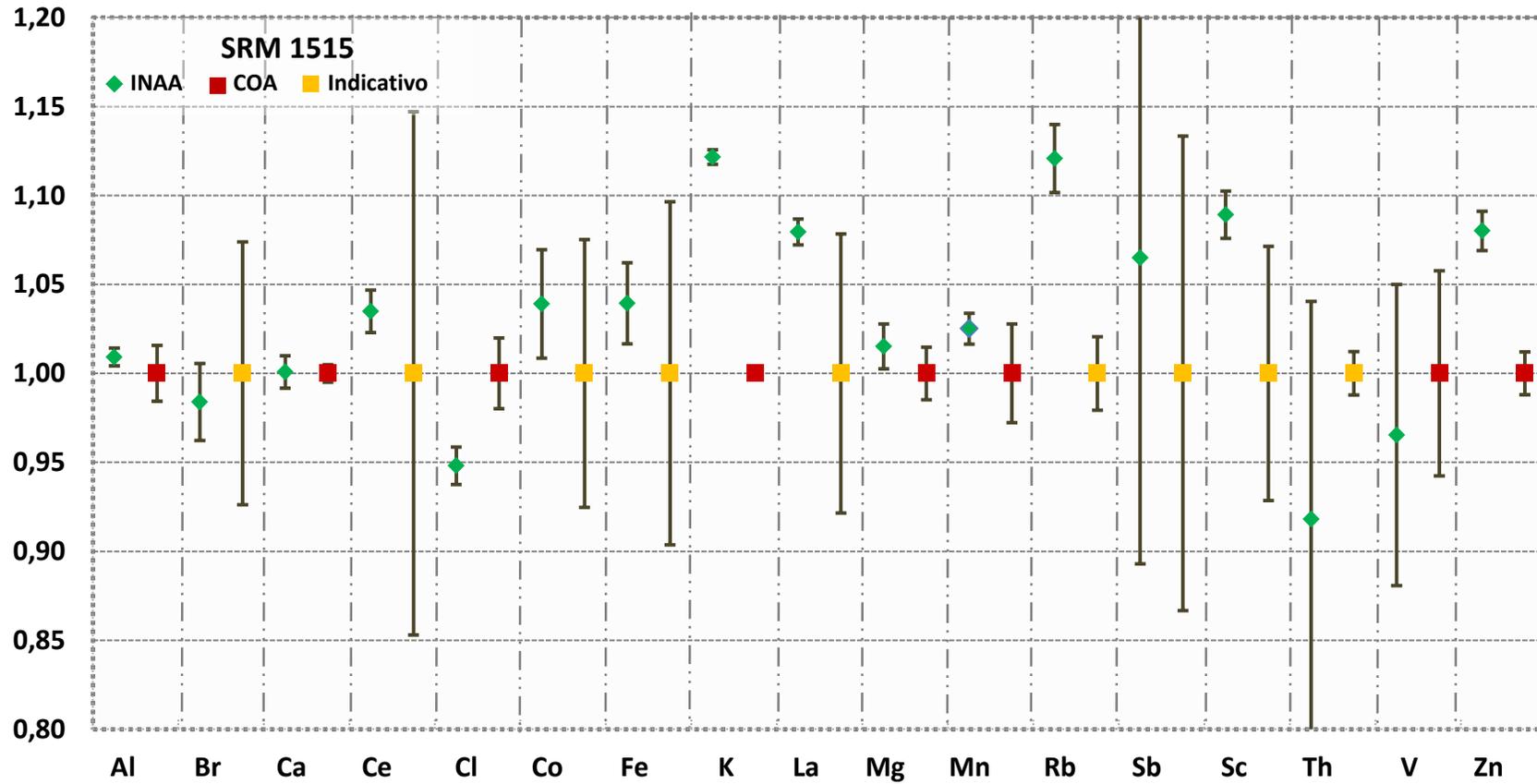


Figura 116. Comparação dos resultados de INAA com o valor certificado (COA) ou valores de literatura

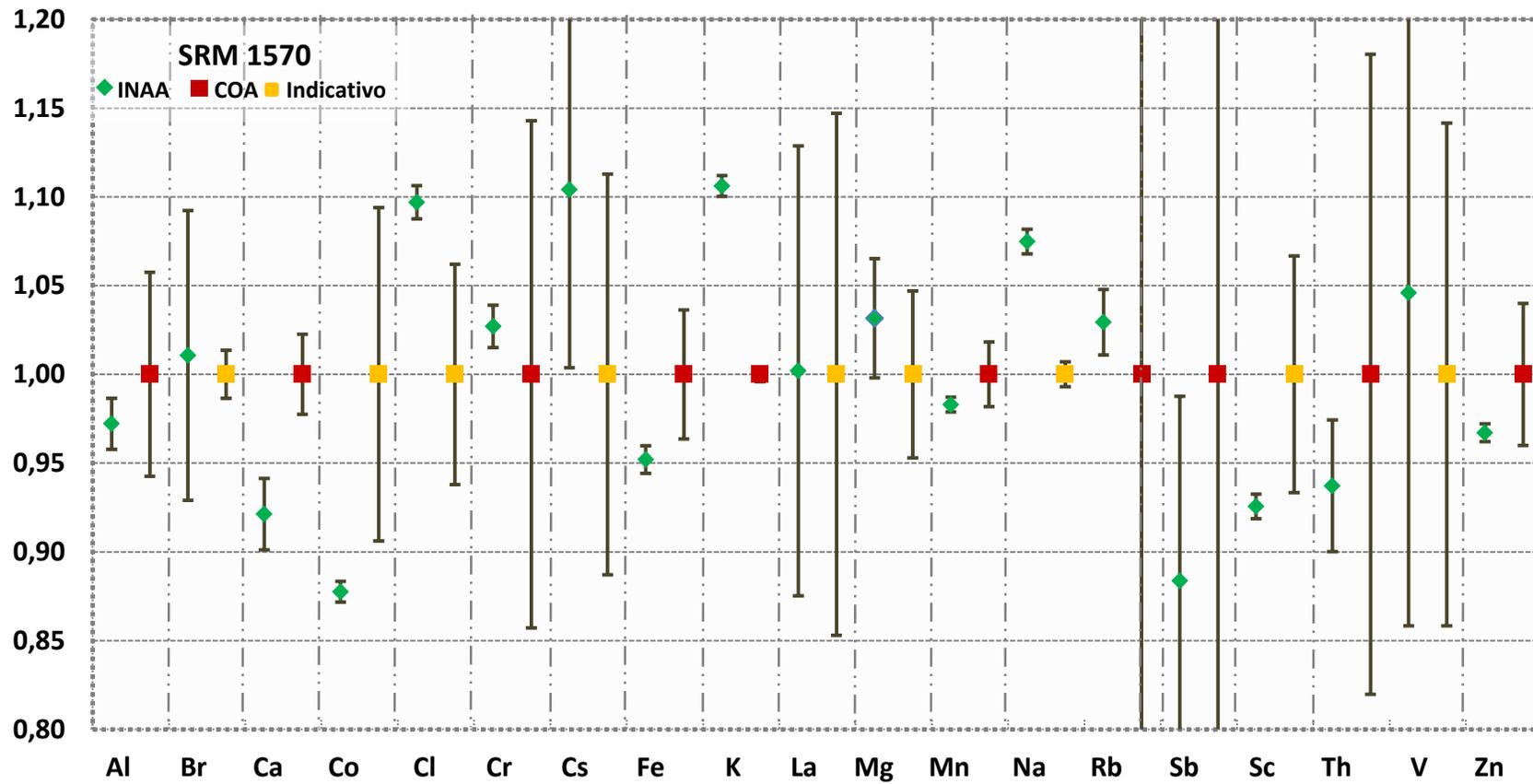


Figura 117. Comparação dos resultados de INAA com o valor certificado (COA) ou valores de literatura

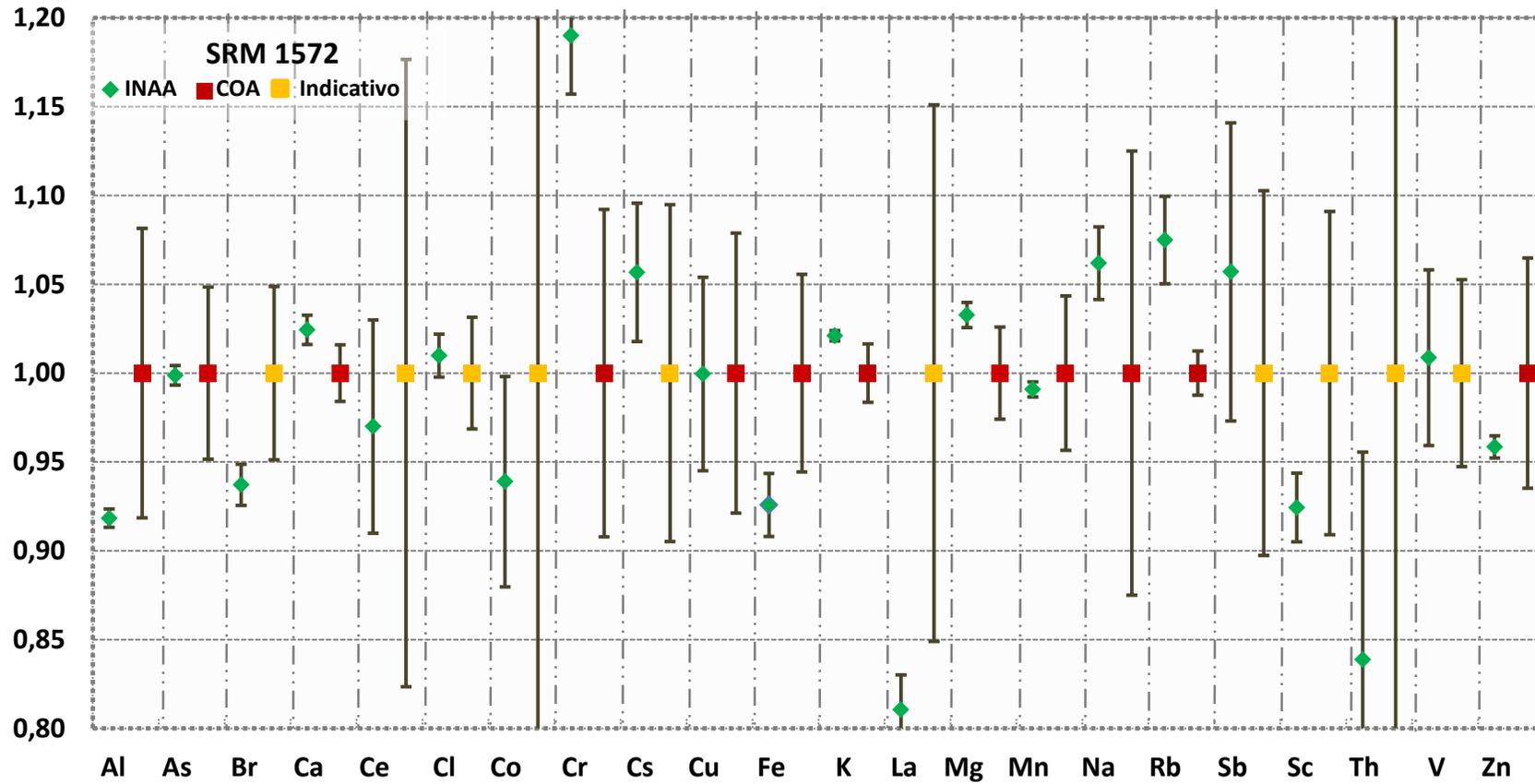


Figura 118. Comparação dos resultados de INAA com o valor certificado (COA) ou valores de literatura

5. CONCLUSÕES

A elaboração do material de referência candidato envolveu as seguintes etapas: a) estudo de variedades de cana-de-açúcar; b) seleção da variedade; c) preparo do material de referência candidato; d) caracterização física e química inicial; e) estudo de estabilidade e f) caracterização química final. O desenvolvimento dessas etapas permitiu as seguintes conclusões:

- O emprego de INAA (Br, Ca, Co, Cr, Cs, Fe, K, La, Na, P, Rb, Sc e Zn), ICP OES (Ca, P, Mg, K, Fe, Cu e Zn) e método de Kjeldahl (N) permitiu ampla caracterização nutricional das doze variedades de cana-de-açúcar estudadas, além da determinação de elementos químicos sem função nutricional conhecida. Os macronutrientes mostraram-se em níveis considerados adequados, à exceção das variedades IACSP 955000 e RB 966928 que apresentaram níveis críticos de P. No caso de micronutrientes, foram observadas frações de massa de Cu no nível crítico (6 mg/kg), enquanto Fe, Mn e Zn foram adequados em todas as variedades. A dispersão dos dados obtidos para os micronutrientes foi maior que para os macronutrientes, observando-se RSD de 30% até 113%, sendo considerados estatisticamente aceitáveis valores menores que 30% para amostragem de campo.
- A variedade RB966928 foi selecionada para a produção do material candidato, tendo como um dos critérios o desvio padrão relativo obtido para cada elemento ($RSD < 30\%$). O RSD é importante fator, já que uma variação maior pode afetar a homogeneidade do material. Testes estatísticos de análise de discriminante linear demonstraram que essa variedade era representativa em macronutrientes e apresentou níveis adequados de micronutrientes e baixa umidade residual.
- Os testes realizados mostraram que a técnica de secagem ideal para a produção do material candidato foi liofilização, evitando perdas e contaminações em relação aos elementos de interesse. Quanto à moagem, as diversas tentativas evidenciaram que a utilização sequencial de dois tipos de moinho (moinho de facas e moinho de bolas) permitiu obter a melhor distribuição do tamanho de partículas, de modo a favorecer a homogeneidade do material.
- A massa mínima do material candidato a ser utilizada mostrou-se variável em função do elemento de interesse. Massas de 10 mg apresentaram maior variabilidade entre as medições que as massas de 50 mg a 200 mg, sendo recomendado o uso do material a partir de porções analíticas de, no mínimo, 100 mg.
- A homogeneidade dentro de frascos usando massas de 200 mg foi estabelecida para Br, Ca, Ce, Co, Cs, Fe, Hf, K, La, Na, Rb, Sc, Sm, Sr, Th, Zn, P e N. O teste de Tukey demonstrou

que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as medições realizadas para todos esses elementos.

- O teste de homogeneidade entre frascos, realizado no NIST, foi estabelecido para Al, Ca, Cl, Mg, Mn, V, Br, K, La, Sm, Na, Co, Cs, Fe, Rb, Sb, Sc, Th e Zn, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores obtidos.
- Estudos de estabilidade a curto e a longo prazo usando massas de 180 mg a 200 mg demonstram que o material é estável nas três condições avaliadas (40°C com umidade relativa a 100%, 20°C e -20°C). A exposição do material a 40°C e umidade relativa a 100%, por um período de 2 meses, alterou as características físicas, sobretudo elevando a umidade do material, mas não afetou a composição química elementar.
- A caracterização final do material candidato, realizada no NIST, possibilitou a atribuição de valores e respectivas incertezas expandidas para Al, Br, Ca, Ce, Cl, Co, Cs, Fe, K, La, Mg, Mn, Na, Rb, Sc, Sm, Th, e Zn. Assim, o material de referência candidato pode ser utilizado para o controle da qualidade analítica na medição de 24 elementos, considerando também os valores estimativos de Hf, N, P, Sb, Sr e V.

REFERÊNCIAS

ANGLOV, T.; PETERSEN, I. M.; KRISTIANSEN, J. Uncertainty of nitrogen determination by the Kjeldahl method. **Accreditation and Quality Assurance**, Heidelberg, v. 4, n. 12, p. 504–510, 1999.

ARNIGO, J. M.; ARANA, G.; ETXEBARRIA, N.; FERNANDEZ, L. A. Emerging needs for sustained production of laboratory reference materials. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 80-85, 2004.

AUSTIN, J.; RODRIGUEZ, S.; SUNG, P.; HARRIS, M. Utilizing microwaves for the determination of moisture content independent of density. **Powder Technology**, Lausanne, v. 236, p. 17-23, 2013.

AWADALLAH, R. M.; ISMAIL, S. S.; MOHAMED, A. E. Application of multi-element clustering techniques of five Egyptian industrial sugar products. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 196, n. 2, p. 337-385, 1995.

BABU, C. N. Sugarcane. Bombay: Allied Publishers Private, 1990. 237p.

BACCHI, M. A.; FERNANDES, E. A. N. Quantu-design and development of a software package dedicated to k_0 -standardized INAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 257, n. 3, p. 577-582, 2003.

BAKKER, H. **Sugar cane cultivation and management**. New York: Kluwer Academic, 1999. 679 p.

BENTON, J. **Plant Nutrition Manual**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 153 p.

BIEVRE, P. On (Certified) reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, Heidelberg, v. 10, n. 9, p. 459-460, 2006.

BODE, P. Quality and project management scientific research in INAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 245, n. 1, p. 133-135, 2000.

BODE, P.; GREENBERG, R. R.; FERNANDES, E. A. N. Neutron activation analysis: A primary (ratio) method to determine SI-traceable values of element content in complex samples. **Chimia**, Berlin, v. 63, n. 10, p. 678-680, 2009.

BOONYAKONG, C.; SUDSIRI, N.; YAFA, C.; POOKROD, P.; WIANGNON, C.; CHERDCHU, P.; TOTARONG, P. Preparation and its use of sugar reference material for determination of dissolved solid in cane and sugar industries in Thailand. In: THE FUTURE OF REFERENCE MATERIALS - SCIENCE AND INNOVATION. INTERNATIONAL CONFERENCE, 2010, Geel, Belgium. **Abstracts: IRMM**, 2010. p. 50.

BOSS, C. B.; FREDEEN, K. J. **Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry**. 3. ed. Waltham: Perkin Elmer, 1997. 120 p.

BROUWER, P. **Theory of XRF getting acquainted with principles**. Almelo: PANalytical B.V., 2010. 62 p.

CALDAS, N. M.; RAPOSO JUNIOR, J. L.; GOMES, N. J. A.; FERNANDO JUNIOR, B. Effect of modifiers for As, Cu and Pb determinations in sugar-cane spirits by GF AAS. **Food Chemistry**, Barking, v.113, n. 4, p.1266–1271, 2009.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA – CTC. Cartas de solos e ambientes de produção. **Revista Coplana**, Guariba, p. 24-25, mar. 2008.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA - CTC. **Relatório de realizações 2005-2010**. Guariba, 2011. p. 17-26. Disponível em: <www.ctcanavieira.com.br>. Acesso em: 4 jun. 2011.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA - CTC. **Variedades CTC**. Guaíba, 2013. 34 p. Disponível em: <<http://www.ctcanavieira.com.br/downloads/variedades2013WEB3.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2013.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA - CTC. Safra 2013/14 Brasil. **Revista Censo CTC**, Piracicaba, p. 1-16, 2014. Disponível em: <<http://www.ctcanavieira.com.br/downloads/censo13-14.pdf>>. Acesso em: 4 jun. 2015.

CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL - CETEM. **Programa de materiais de referência certificados**. Rio de Janeiro, Disponível em: <<http://www.cetem.gov.br/mrc>>. Acesso 7 fev. 2016

COLLIN, B.; DOELSCH, E. Impact of high natural soilborne heavy metal concentrations on the mobility and phytoavailability of these elements for sugarcane. **Geoderma**, Amsterdam, v.159, n. 3-4, p. 452–458, 2010.

COMAR. **International database for certified reference materials**. Berlin, 2016. Disponível em: <<http://www.comar.bam.de/en/>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **GeoSafras - Geotecnologias aplicadas ao Monitoramento Agrícola**. Brasília, DF, 2012. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/saep/nit-conab>>. Acesso em: 05 dez. 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento de safra Brasileira da cana-de-açúcar, safra 2015/16**. Brasília, DF, 2015. v. 2, 67 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_02_23_17_34_53_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2016.

CUNHA, R. M. et al. Determination of Fe, Cu and Zn in sugarcane spirits commercialized in Southeastern Brazil by TXRF. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 260, n. 1, p. 3-7, 2004.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; MACHADO, V. A. C.; GUIMARÃES, M. **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, 2010. 882 p.

EMBRAPA. **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 334 p.

EMBRAPA. **Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. 9 p. (Circular Técnica, 63).

EMBRAPA. **Cana-de-açúcar**. Brasília, DF: Embrapa Informática Agropecuária, 2015. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_108_22122006154841.html>. Acesso em: 15 nov. 2015.

EURACHEM. **Quantifying uncertainty in analytical measurement**. 3. ed. Leoben: Eurachem, 2012. 141 p.

FAJGELJ, A.; ZEISLER, R. Particle size determination of some IAEA and NIST environmental and biological reference materials. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 360, p. 442-445, 1998.

FAO. **FAOSTAT database: sugarcane. production 2014**. Rome, 2014. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 17 dez. 2015.

FAO. **OECD-FAO agricultural outlook 2014-2023**. Disponível em: <http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Welternahrung/OECD-FAO-AgriculturalOutlook.pdf?__blob=publicationFile>. Acesso em: 23 maio 2015.

FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A.; SARRIES, G. A.; FERRAZ, E. S. B. Quality of sugarcane in productive process of ethanol evaluated by INAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 282, n. 1, p. 105-109, 2009.

FRANÇA, E. J.; FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A. Ni-Cr alloy as neutron flux monitor: composition and homogeneity assessment by NAA. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 257, n. 1, p. 113-115, 2003.

FRITSCH. **Variable-speed rotor mill pulverisette 14**. Oberstein, Germany, Disponível em: <<http://www.fritsch-milling.com/products/milling/rotor-beater-mills/pulverisette-14/description/>>. Acesso em: 7 maio 2014.

GALLO, R. J.; HIROCE, R. Levantamento do estado nutricional de canaviais de São Paulo, pelo análise foliar. **Boletim Científico do Instituto Agrônomo**, v. 27, n. 30, p. 365-382, 1968.

GIACOMINI, C. R.; CRUZ, J. A.; KILLER, I. N.; RIBEIRO, F. A. J. **Censo varietal 2012**. Araras: UFSCar, 2013. 55 p. Disponível em: <pmgca.dbv.cca.ufscar.br/dow/Revista%20Censo%20Varietal%202012.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2013.

GREENBERG, R. R.; BODE, P.; FERNANDES, E. A. D. Neutron activation analysis: a primary method of measurement. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, London, v. 66, n. 3-4, p. 193-241, 2011.

GUERRA, M. B. B.; ADAME, A.; ALMEIDA, E. DE; CARVALHO, G. G. A.; BRASIL, M. A. S.; SANTOS JUNIOR, D.; KRUG, F. J. Direct analysis of plant leaves by EDXRF and LIBS: microsampling strategies and cross-validation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 30, n. 7, p. 1646-1654, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAUDE - INCQS. **Microrganismos de referência**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=120&Itemid=100>. Acesso em: 17 fev. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA - INMETRO. **Metrologia científica**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/mat_ref_cert.asp>. Acesso 7 fev. 2016.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY - IAEA. **Development and use of reference materials and quality control materials**. Vienna, 2003. 113 p.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLOGICAS - IPT. **Material de referência**. São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://www.ipt.br/nmr.htm>>. Acesso em: 17 fev. 2016.

ISO. **ISO Guide 31** - Reference materials – Contents of certificates and labels. Geneva, 2000a. 6 p.

ISO. **ISO Guide 34** - General requirements for the competence of reference material producers. Geneva, 2000b. 22 p.

ISO. **ISO Guide 35** - Reference materials – General and statistical principles for certification. Geneva, 2006. 64 p.

ISO. **ISO Guide 30** - Reference materials – Selected terms and definitions. Geneva, 2015. 8 p.

KABATA, A. P. **Trace elements in soils and plants**. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2011. 467 p.

KALRA, Y. **Handbook of reference methods for plant analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 291 p.

KRASUCKA, D. M.; KOS, K.; CYBULSKI, W. A.; MITURA, A.; ŁYSIAK, E.; PIETROŃ, W. J. Karl Fisher determination of residual moisture in veterinary vaccines practical implementation in market monitoring. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, Warszawa, v. 69, n. 6, p. 1364-1367, 2012.

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, p. 1-3, 1995.

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras**. Piracicaba: CENA-USP, 2010. 341 p.

KURFUST, U.; PAUWELS, J.; GROBECKER, K. H.; STOEPLER, M.; MUNTAUN, H. Micro-heterogeneity of trace elements in reference materials - determination and statistical evaluation. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, Berlin, v. 345, p. 112-120, 1993.

KUSELMAN, I. Commutability of certified reference materials at nano-scale. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE INSTITUTE FOR REFERENCE MATERIALS AND MEASUREMENTS, 2010, Brussels. **Abstracts: IRMM**, 2010.

LABCONCO. **A guide to Kjeldahl nitrogen determination methods and apparatus.** Houston, 2014. 13 p.

LAMBERTY, A.; SCHIMMEL, H.; PAUWELS, J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, Berlin, v. 360, p. 359-361, 1998.

LEITE, U. T.; AQUINO, B. F.; ROCHA, R. N. C.; SILVA, J. Níveis críticos foliares de boro, cobre, manganês e zinco em milho. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.19, n.2, p.115-125, 2003.

LISINGER, T. P. J.; PAUWELS, A.; VAN DER VEEN, M. H.; LAMBERTY, H. S. A. Homogeneity and stability of reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, Heidelberg, v. 6, p. 20–25, 2001.

LINDSTROM, R. M. Prompt-gamma activation analysis. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**, Washington, DC, v. 98, p. 127-133, 1993.

LINDSTROM, R. M. Reference material certification by prompt-gamma activation analysis. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 360, p. 322–324, 1998.

MACKEY, E. A.; PAUL, R. L.; LINDSTROM, R. M.; ANDERSON, D. L.; GREENBERG, R. R. Sources of uncertainties in prompt gamma activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 265, n. 2, p. 273-281, 2005.

MCCRAY, J. M.; JI, S.; POWELL, G.; MONTES, G.; PERDOMO, R.; LUO, Y. Boundary lines used to determine sugarcane production limits at leaf nutrient concentrations less than optimum. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 41, p. 606-622, 2010.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas.** Piracicaba: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MIRANDA, K.; VIEIRA, A. L.; NETO, J. A. G. High-throughput sugarcane leaf analysis using a low cost closed-vessel conductively heated digestion system and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy. **Analytical Methods**, London, v. 6, p. 9503–9508, 2014.

MITRA, S. **Sample preparation techniques in analytical chemistry.** Hoboken: John Wiley, 2003. 436 p.

MOHAMED, A. E. Determination of trace elements in sugar cane refuse by instrumental neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 107, n. 2, p. 121-128, 1986.

MOLNÁR, G. L. **Handbook of prompt gamma activation analysis with neutron beams.** Berlin: Springer, 2004. 423 p.

MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. **Sugarcane: Physiology, Biochemistry and Functional Biology.** Hoboken: Wiley-Blackwell, 2014, 716 p.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST. **Analytical techniques**. Gaithersburg, 2002. Disponível em: <http://www.ncnr.nist.gov/div8395/analytical_tech.html>. Acesso em: 10 dez. 2014.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST. **Standard reference materials**. Gaithersburg, 2016. Disponível em: <<https://www-s.nist.gov/srmors/quickSearch.cfm>>. Acesso 9 jan. 2016.

NUNES, L. C.; BRAGA, J. W. B.; TREVIZAN, L. C.; SOUZA, P. F.; CARVALHO, G. G. A.; SANTOS JUNIOR, 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**, London, v. 25, n. 9, p. 1453–1460, 2010.

OLIVEIRA, S. R. **Avaliação da espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução no desenvolvimento de métodos analíticos para diagnóstico foliar de cana-de-açúcar e laranja**. 2010. 162 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2010.

OLIVEIRA, E. C. A. **Dinâmica de nutrientes na cana-de-açúcar em sistema irrigado de produção**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

OLIVEIRA, M. W.; MOREL, F. F.; RESENDE, M. G. A.; FERREIRA, J. J. Nutrição mineral e adubação da cana-de-açúcar. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 239, p. 30-43, 2007.

ORLANDO, F. J.; MACEDO, N.; TOKESHI, H. Seja o doutor de seu canavial. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 67, p. 1-6, 1994.

PAUWELS, J.; LAMBERTY, A.; SCHIMMEL, H. Homogeneity testing of reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, Heidelberg, v. 3, n. 2, p. 51-55, 1998.

PRADO, H. Ambientes de produção de cana-de-açúcar na região centro-sul do Brasil. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 110, p. 12-17, 2005.

PROCHNOW, L. I.; CASARIN, V.; STIPP, S. R. Boas práticas para o uso de fertilizantes-culturas. **International Plant Nutrition Institute**, Georgia, v.3, p.168-220, 2010.

QUEVAUVILLER, P. H.; MAIER, E. A. **Interlaboratory studies and certified reference materials for environmental analysis the BCR approach**. Amsterdam: Springer Science, 1999. 557 p.

RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. Campinas: FUNDAG, 1996. 285 p.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTICO - RIDESA. **Variedades RB de cana-de-açúcar**. 1. ed. Araras: CCA/UFSCar, 2008. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/VariedadesRB_2008+apostila_000fxga3a3302wyiv80soht9hctswek2.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2012.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTICO - RIDESA. **Censo varietal Brasil 2012**. Araras: CCA/UFSCar, 2013. Disponível em: <<http://ridesa.agro.ufg.br/pages/44741>>. Acesso em: 23 mar. 2013.

RETSCH. SOLUTIONS IN MILLING & SIEVING. **Fragmentação com moinhos de bolas planetários**. Haan, Germany, 2014. Disponível em: <<http://www.retsch.pt/pt/produtos/>>. Acesso em: 5 maio 2014.

SENAI. **Material de referência**. Porto Alegre, Disponível em: <<http://www.senairs.org.br/pt-br/tecnologia-e-inova%C3%A7%C3%A3o/material-de-refer%C3%Aancia>>. Acesso em: 13 fev. 2016

SINGH, A.; GUPTA, A. K.; SRIVASTAVA, R. N.; LAL, K.; SINGH, S. B. Response of zinc and manganese to sugarcane. **Sugar Tech**. New Delhi, v. 4, p.74 – 76, 2002

SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS ALCOOLEIROS DO BRASIL - STAB. ENCONTRO DE USUÁRIOS DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR “FREDERICO DE MENEZES VEIGA”, 2, 2012, Ribeirão Preto. Disponível em: <http://www.stab.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=51&Itemid=65>. Acesso em: 20 mar. 2012.

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. 87 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

STOEPPLER, M.; WOLF, W. R.; JENKS, P. J. **Reference materials for chemical analysis certification** - availability and proper usage. New York: John Wiley, 2001. 297 p.

SHIMADZU. **Energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer, EDX series**. Tokyo, 2013. 16 p.

ULBERTH, F. Reference measurement systems for food analysis: CCQM focus group meeting. **Accreditation and Quality Assurance**. Heidelberg, v. 10, n. 8, p. 455-457, 2005.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA. **Produtor mundial de cana-de-açúcar**. São Paulo, 2016. Disponível em <<http://www.unica.com.br/faq/>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

VESPER, H. W.; MILLER, W. G.; MYERS, G. L. Reference materials and commutability. **Clinical Biochemistry Reviews**, New York, v. 28, n. 4, p. 139-147, 2007.

VIM - INTERNATIONAL VOCABULARY OF METROLOGY. Basic and general concepts and associated terms. France, 3rd edition, 2012, 91p.

VITTI, G. C.; MAZZA, J. A. Planejamento de estratégias e manejo de nutrição da cana-de-açúcar. **Informações Agrônomicas**, Piracicaba, v. 97, p. 1-16, 2002.

WAHEED, S.; RAHMAN, S.; GILL, K. P. INAA and AAS of different products from sugar cane industry in Pakistan: toxic trace elements for nutritional safety. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 279, n. 3, p. 725–731, 2009.

WALKER, R.; LUMLEY, I. Pitfalls in terminology and use of reference materials. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 18, n. 9-10, p. 594-616, 1999.

WIEDENFELD, R. P. Water stress during different sugarcane growth periods on yield and response to N fertilization. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 173-182, 2000.

YANG, J. B.; YANG, Y. G.; LI, Y. J.; TUO, X. G.; LI, Z.; CHENG, Z.; MOU, Y. F.; HUANG, W. Q. Prompt gamma neutron activation analysis for multi-element measurement with series samples. **Laser Physical Letter**, Bristol, v. 10, p. 1-5, 2013.

ZEISLER, R. Reference materials for small-samples analysis. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, Berlin, v. 360, p. 376-379, 1998.

ZEISLER, R. INAA studies of sampling properties of some natural matrix materials for the development of small sample reference materials. In: IAEA. **Reference materials for microanalytical nuclear techniques**. Final report of a co-ordinated research project - 1994–1999. Vienna, 2002. p. 71-76. (IAEA-TECDOC, 1295).

ZEISLER, R.; VAJDA, N.; KENNEDY, G.; LAMAZE, G.; MOLNÁR, G. L. **Handbook of nuclear chemistry**. Amsterdam: Kluwer Academic, 2003. p. 303-362.

ZHENG, Y.; LAI, X.; BRUUN, S. W.; IPSEN, H.; LARSEN, J. N.; LOWENSTEIN, H.; SONDERGAARD, I.; JACOBSEN, S. Determination of moisture content of lyophilized allergen vaccines by NIR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 592–596, 2008.

ZSCHUNKE, A. **Reference materials in analytical chemistry: a guide for selection and use**. Berlin: Springer, 2000. 222 p.