

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

**ANDRESSA ADAME**

**Análise direta de folhas de soja por espectrometria de emissão óptica com  
plasma induzido por laser (LIBS) e por fluorescência de raios X  
dispersiva em energia (EDXRF)**

**Piracicaba**

**2018**



**ANDRESSA ADAME**

**Análise direta de folhas de soja por espectrometria de emissão óptica com  
plasma induzido por laser (LIBS) e por fluorescência de raios X  
dispersiva em energia (EDXRF)**

**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**

**Orientador: Prof. Dr. Francisco José Krug  
Co-orientador: Prof. Dr. José Lavres Junior**

**Piracicaba**

**2018**

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**

Adame, Andressa

Análise direta de folhas de soja por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) e por fluorescência de raios X dispersiva em energia (EDXRF) / Andressa Adame; orientador Francisco José Krug; co-orientador José Lavres Junior. - - Piracicaba, 2018.

143 p. : il.

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

1. Análise espectroscópica 2. Diagnose foliar 3. Espectrometria 4. Espectroscopia atômica 5. Espectroscopia de raio X 6. Nutrição vegetal 7. Nutrientes 8. Química analítica I. Título

CDU 543.421/427 : 631.811

**Elaborada por:**

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

*À Deus, que me concedeu essa vitória.*

*Aos meus pais, Edna e Adimilson, por todo amor e carinho e pelo apoio e incentivo de sempre. Essa conquista também é de vocês.*

*Dedico!*



## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por estar sempre comigo, guiando meus passos.

Aos meus amados pais, Edna e Adimilson, por acreditarem nos meus sonhos e sempre me apoiarem. Agradeço por todo amor, pelo incentivo e pelo cuidado de sempre comigo, principalmente, nos momentos difíceis.

Ao meu esposo, Alex, por estar ao meu lado, pelo amor, carinho, companheirismo, atenção e cuidado em todos os momentos.

Ao Professor Francisco José Krug, pela oportunidade de fazer o doutorado sob sua orientação, pelas conversas, discussões científicas e ensinamentos que levarei para a vida. Agradeço também pela paciência, pelo incentivo e pela amizade.

Ao Professor José Lavres Júnior, pela co-orientação e discussões científicas.

Ao Dr. Marcelo Braga Bueno Guerra, pelas colaborações, discussões científicas, conversas e revisão desta tese. Agradeço também pela paciência e amizade.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e à Universidade de São Paulo, pela infraestrutura e apoio institucional oferecidos, para o desenvolvimento das atividades de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos auxílios e bolsas (Processos CNPq 141034/2016-5, 165397/2018-7 e CAPES-PROEX 1491993).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo 2014/50951-4, e ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) pelos auxílios.

Aos colegas de laboratório e departamento pela amizade e agradável convivência.

Aos professores do Laboratório de Química Analítica "Henrique Bergamin Filho", por compartilhar suas experiências e conhecimentos, pela amizade e discussões científicas.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Química Analítica, em especial à Aparecida de Fátima Patreze, pela atenção e auxílios prestados diariamente e pela amizade. Agradeço também à Sheila Wenzel, à Liz Mary Bueno e à Cláudia Correa, pelos auxílios, conversas e também pela amizade.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação e da Biblioteca do CENA, Gilson, Cleide, Marcos, Magali e Marília, pela atenção, presteza e apoio.

Ao Laboratório de Instrumentação Nuclear do CENA, pela infraestrutura e apoio oferecidos. Ao Professor Hudson de Carvalho e ao Dr. Eduardo de Almeida, pela orientação e apoio nos experimentos realizados com o  $\mu$ -EDXRF (FAPESP EMU 2015/19121-8) e com o equipamento portátil de EDXRF (FINEP 01.12.0535.00).

Ao Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas de CENA, pela infraestrutura e apoio oferecidos. À Cleusa e aos alunos, Elcio e Nicolas, pelo apoio com os experimentos realizados em casa de vegetação.

Ao Grupo de Extensão Pró-Hort da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), pelas amostras cedidas.

Ao colega MSc. Marcos Brasil, por toda ajuda com os porta-amostras.

Aos novos amigos e aqueles de longa data que estiveram presentes, ou mesmo distantes, acompanharam todos os momentos (Ana Carolina, Maria Fernanda, Bruna, Beto, Ticiane, Renata, Kizzy, Gabriella, Alex, Diogo, Carina), agradeço pela amizade, compreensão, paciência e apoio.

E à todas as pessoas que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização e na conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

*“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”*

*Simone de Beauvoir*



## RESUMO

ADAME, A. **Análise direta de folhas de soja por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) e por fluorescência de raios X dispersiva em energia (EDXRF)**. 2018. 143 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

A determinação de macro- (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Zn, B, Mo, Cl e Ni) em folhas de plantas é recomendada para avaliar o estado nutricional das culturas de interesse econômico. A análise convencional envolve a decomposição ácida do material vegetal, geralmente assistida por radiação micro-ondas, seguida da determinação dos elementos por ICP OES. Nesta tese, duas técnicas multielementares foram avaliadas para acessar o status nutricional da cultura da soja rapidamente: a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) e a espectrometria de fluorescência de raios X dispersiva em energia (EXDRF). Mapas microquímicos foram construídos empregando-se um sistema LIBS constituído por um laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 360 mJ, 10 Hz) e um espectrômetro com óptica *Echelle* e detector ICCD, e um equipamento de bancada de micro-fluorescência de raios X dispersiva em energia ( $\mu$ -EDXRF Orbis PC, EDAX) com tubo de Rh (50 kV, 50 W) e SDD. As distribuições elementares de Mg, Ca, P, S e K foram avaliadas, a fim de orientar e definir uma estratégia de amostragem para análise foliar direta da soja. Os mapas indicaram que a micro-heterogeneidade intrínseca dos elementos avaliados na amostra é significativa e há variações da composição foliar, tanto entre plantas de um mesmo tratamento, quanto entre folíolos de uma mesma planta. Esses fatores foram considerados críticos na definição de uma estratégia de amostragem única que pudesse abarcar e contornar os possíveis efeitos causados por esses fatores. Assim, definiu-se amostrar a maior área possível, sem privilegiar qualquer região específica da folha. Uma prova de conceito foi realizada, empregando-se LIBS para diagnose foliar de soja. Como as folhas secas de soja apresentaram baixa resistência mecânica, 30 folhas frescas de soja foram analisadas por LIBS, sendo acumulados 25 pulsos de laser por linha no modo de varredura, 12 linhas por folíolo e 3 folíolos por planta. Os resultados obtidos foram promissores em termos de comprovar a viabilidade técnica e prática do emprego de LIBS para análise direta de folhas frescas de soja. Análises de folhas frescas de soja também foram realizadas empregando-se um espectrômetro portátil de fluorescência de raios X dispersiva em energia (Tracer III-SD, Bruker) equipado com tubo de Rh (4W, 50 kV, 4,5 mm de diâmetro de feixe de raios X) e SDD. O status nutricional de plantas cultivadas sob condições controladas, com fornecimento adequado de nutrientes (tratamento controle) e com deficiência induzida de fósforo foi avaliado. Boas correlações foram obtidas para P ( $r = 0,838$ ) e Zn ( $r = 0,888$ ), que permitem inferir que a EDXRF pode ser recomendada para a quantificação desses nutrientes no campo. Os sinais detectados de Ca, Cu, Fe, K, Mn, P, S, Si, Zn e Rh (espalhamento Compton) permitiram a classificação das amostras em grupos utilizando análise de componentes principais (PCA). Os gráficos de *scores* e *loadings* da PCA mostraram: i) a separação entre os dois grupos de amostras (controle e deficientes em P), e ii) quais elementos foram responsáveis por esta separação. Dessa forma, a PCA constitui uma alternativa à análise quantitativa e pode ser utilizada em conjunto com EDXRF para identificar e classificar as amostras de soja como

saudáveis ou deficientes em P. Assim, a partir dos resultados obtidos nesta tese, pode-se concluir que ambas as técnicas, LIBS e EDXRF, têm potencial para avaliar o estado nutricional da soja em tempo real, *in situ* e com mínimo tratamento de amostras. No entanto, para alcançar resultados quantitativos, diferentes estratégias de amostragem e calibração devem ser avaliadas criteriosamente a fim de superar os desafios aqui apresentados e criar condições de contorno para os inconvenientes que as folhas de soja apresentam como, por exemplo, a distribuição não-homogênea dos elementos e a baixa resistência mecânica quando secas.

**Palavras-chave:** LIBS. EDXRF. Diagnose foliar. Mapeamento microquímico. Macronutrientes. Micronutrientes.

## ABSTRACT

ADAME, A. **Direct analysis of soybean leaves by laser-induced breakdown spectroscopy and energy dispersive X-ray fluorescence.** 2018. 143 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

The determination of macro- (N, P, K, Ca, Mg and S) and micronutrients (Fe, Cu, Mn, Zn, B, Mo, Cl and Ni) in plant leaves is recommended to evaluate the nutritional status of crops of economic interest. Traditional analysis involves microwave-assisted acidic digestion the plant material, followed by determination of the elements by ICP OES. In this thesis, two multielemental techniques were evaluated to access the nutritional status of the soybean crop quickly: laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF). Microchemical maps were built using a LIBS system constituted by a Q-switched Nd:YAG laser (1064 nm, 5 ns, 360 mJ, 10 Hz) and a spectrometer with Echelle optics and ICCD detector, and a benchtop micro-energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer ( $\mu$ -EDXRF Orbis PC, EDAX) with Rh X-ray tube (50 kV, 50 W) and SDD. The elemental distributions of Mg, Ca, P, S and K were evaluated in order to guide and define a sampling strategy for direct analysis of soybean leaves. Maps indicated that intrinsic micro-heterogeneity of the elements evaluated in the sample is significant and there are variations in the leaf composition, between plants of the same treatment and between leaflets of the same plant. These factors were considered critical in defining a single sampling strategy that could encompass and circumvent the possible effects caused by them. Thus, it was decided to sample the largest possible area, without privileging any specific region of the leaf. A proof of concept was carried out using LIBS for foliar diagnosis of soybean. As the dry leaves of soybean presented low mechanical resistance, 30 fresh leaves of soybean were analyzed by LIBS, employing 25 laser pulses per line in the rastering mode, 12 lines per leaflet and 3 leaflets per plant. The obtained results were promising in order to prove technical and practical feasibility in using LIBS for direct analysis of fresh leaves of soybean. Analyses of fresh leaves were also performed using a portable energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer (Tracer III-SD, Bruker) equipped with Rh X-ray tube (4W, 50 kV, 4.5 mm diameter of X-ray beam) and SDD. The nutritional status of plants grown under controlled conditions, with good supply of nutrients (control treatment) and with phosphorus-induced deficiency were evaluated. Good correlations were obtained for P ( $r = 0.838$ ) and Zn ( $r = 0.888$ ), which allow to infer that EDXRF can be recommended for the quantification of these nutrients in the field. The detected signals of Ca, Cu, Fe, K, Mn, P, S, Si, Zn and Rh (Compton scattering) allowed the classification of samples into groups using Principal Component Analysis (PCA). The PCA scores and loadings graphs showed: i) the separation into two sample groups (control and P deficient), and ii) which elements were responsible for this separation. So, PCA constitutes an alternative method to quantitative analysis and it can be used with EDXRF in order to identify and classify soybean samples as healthy or P deficient. Thus, from the results obtained in this thesis, it can be concluded that both techniques, LIBS and EDXRF, have the potential to evaluate the nutritional status of soybean in real time, in situ and with minimal sample treatment. However, in order to achieve quantitative results, different sampling and calibration strategies should be carefully evaluated

aiming to overcome the challenges presented here and circumvent the drawbacks of soybean leaves, such as the nonhomogeneous distribution of the elements and the low mechanical resistance when leaves are dried.

**Keywords:** LIBS. EDXRF. Foliar diagnosis. Microchemical mapping. Macronutrients. Micronutrients.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de um sistema LIBS simples, adaptada de Cremers e Radziemski <sup>16</sup> .....	27
Figura 2 – Representação da evolução temporal de um plasma gerado por um laser pulsado em regime de nanossegundos; $t_d$ : tempo de atraso e $t_b$ : tempo de integração. (Figura adaptada de Cremers e Radziemski <sup>16</sup> e Miziolek <sup>18</sup> ) .....	29
Figura 3 – Número de publicações sobre espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser entre 1972 e 2018.....	30
Figura 4 – Representação de um espectrômetro de fluorescência de raios X: em (A) as partes que compõem o espectrômetro, e em (B) as transições eletrônicas em que há emissão de fótons de raios X .....	33
Figura 5 – Série histórica (1961 -2018) da produção de soja pelos maiores países produtores: Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, Paraguai e Índia. (Fonte: Food Security Portal e USDA – Ago/2018) .....	35
Figura 6 – Diagrama de fluxo esquemático ilustrando o passo-a-passo das análises multielementares de tecido vegetal por ICP-MS/OES. Parte direita inferior: distribuição elementar relativa de fósforo em um grão de arroz analisado por LA-ICP-MS. (Figura adaptada de Hansen et al. <sup>65</sup> ).....	46
Figura 7 – Fotos ilustrativas do cultivo da soja em sistema hidropônico, RK7214 IPRO e M6210 IPRO: em (A) a semeadura em vermiculita; em (B) a transferência para a solução de adaptação; em (C) a transferência para os vasos plásticos de 2,5 L, contendo as soluções nutritivas adequadas para cada tratamento; e em (D), as plantas já desenvolvidas, antes da coleta das folhas-diagnóstico para análise.....	53
Figura 8 – Foto ilustrativa do cultivo da soja RK7214 IPRO em solo, em condições de casa de vegetação, no período de dezembro de 2017 a fevereiro de 2018.....	54
Figura 9 – Fotos das cultivares de soja BMX GARRA RR 2/STS e BMX POTÊNCIA RR cultivadas no campo experimental do Grupo de Extensão Pró-Hort do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ, no período de novembro de 2017 a janeiro de 2018.....	55
Figura 10 – Representação esquemática do arranjo experimental do sistema LIBS empregado nas análises .....	56
Figura 11 – Detalhe da amostra fixada no porta-amostras automático com estágios translacionais x-y .....	57
Figura 12 – Espectrômetro de micro-fluorescência de raios X (Orbis PC, EDAX) e, no detalhe, a amostra suspensa em filme Kapton <sup>®</sup> fixado ao porta-amostras .....	58
Figura 13 – Moinho criogênico e conjuntos de moagem utilizados na cominuição das amostras de folhas de soja.....	60

Figura 14 – Representação do ciclo vegetativo contendo fases mais importantes das plantas de soja e, no detalhe, as folhas-diagnóstico. (Figuras adaptadas de Embrapa Soja. Documentos 305 <sup>130</sup> , <a href="http://www.agrolink.com.br/culturas/soja/características">http://www.agrolink.com.br/culturas/soja/características</a> ) .....	61
Figura 15 – Representação da construção de um mapa microquímico de cálcio para um folíolo de soja. Condições experimentais: 1 pulso, 50 J cm <sup>-2</sup> , 750 µm de diâmetro, 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração .....	63
Figura 16 – Fragmento do espectro de emissão mostrando a linha iônica do Mg II 279,553 nm. As linhas vermelhas ilustram a intensidade máxima de emissão e as regiões adjacentes do pico, BG <sub>1</sub> e BG <sub>2</sub> , que foram subtraídas. Condições experimentais: 1 pulso, 50 J cm <sup>-2</sup> , 2,0 µs de atraso e 5,0 µs de integração .....	64
Figura 17 – Exemplo de determinação da área mapeada e da matriz de mapeamento para uma amostra de folha seca de soja. Em (A) imagem capturada pela câmera CCD do equipamento e em (B) representação da matriz de mapeamento 32 x 25 pontos, empregada nos experimentos .....	65
Figura 18 – Representação da construção do mapa microquímico de K, a partir dos espectros obtidos em cada ponto da matriz de mapeamento 32 x 25 pontos de um folíolo de soja submetido à análise por µ-EDXRF .....	66
Figura 19 – Representação das análises realizadas empregando o equipamento de EDXRF portátil: em (A) o equipamento posicionado no suporte sobre a bancada; em (B) o folíolo a ser analisado é destacado do trifólio e posicionado sobre a abertura em que os raios X serão incididos; em (C) é feito o fechamento da tampa de proteção e, em (D) a análise é iniciada .....	67
Figura 20 – Análise de folhas frescas de soja por LIBS: (A) amostragem no modo varredura com 25 pulsos de laser em 4 linhas paralelas à nervura central e (B) representação gráfica do sinal analítico <i>versus</i> a fração de massa obtida para o cálcio. Condições experimentais: laser de Nd:YAG @1064 nm, 5 ns, 5 Hz, 50 J cm <sup>-2</sup> , 750 µm de diâmetro, 2 µs de atraso e 5 µs de integração .....	72
Figura 21 – Foto ilustrativa da baixa resistência mecânica da folha seca de soja. Nesta imagem é possível visualizar a folha seca fixada em folha de alumínio coberta com filme Kapton®. O detalhe mostra a fragmentação da amostra com 20 J cm <sup>-2</sup> . Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 10 Hz), 15 a 50 J cm <sup>-2</sup> , 750 µm de diâmetro, 2 µs de atraso e 5 µs de integração.....	73
Figura 22 – Representação do mapeamento de folhas de soja empregando LIBS. Em (A) são mostradas as crateras geradas pela incidência dos pulsos de laser sobre a amostra e em (B) um mapa microquímico de magnésio de um folíolo de soja. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 10 Hz), 1 pulso de 50 J cm <sup>-2</sup> por ponto, 750 µm de diâmetro, 2 µs de atraso e 5 µs de integração .....	74
Figura 23 – Fragmentos dos espectros obtidos no modo mapeamento incidindo-se um pulso de laser sobre a amostra e sobre a folha de alumínio. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 10 Hz), 1 pulso de 50 J cm <sup>-2</sup> , 750 µm de diâmetro, 2 µs de atraso e 5 µs de integração .....	75

Figura 24 – Fragmentos de espectros de emissão de folha de soja obtidos por LIBS: com 1 pulso de laser por ponto, no modo mapeamento, e 25 pulsos acumulados por linha no modo varredura. Linhas de emissão selecionadas: Ca II 393,366 nm, Ca II 315,887 nm, Mg II 279,553 nm e Mg I 285,213 nm. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns), 50 J cm <sup>-2</sup> , 750 μm de diâmetro, 2 μs de atraso, 5 μs de integração, taxas de repetição de 10 Hz no modo mapeamento e 5 Hz no modo varredura .....	77
Figura 25 – Efeito da fluência na intensidade das linhas de emissão de Ca II 315,887 nm, Mg I 285,213 nm, P I 213,618 nm, Fe II 261,187 nm, Mn II 257,610 nm, Cu I 327,396 nm, Si I 212,412 nm e C I 247,856 nm. Espectros médios (n = 3) obtidos de folhas de soja coletadas em campo experimental da ESALQ. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 5 Hz), 750 μm de diâmetro, 2 μs de atraso e 5 μs de integração .....	80
Figura 26 – Fragmentos dos espectros médios das 30 folhas de soja amostradas em campo experimental e em casa de vegetação. Linhas de emissão: Ca II 315,887 nm, Mg I 285,213 nm, P I 213,618 nm, Mn II 257, 610 nm, Fe II 259,940 nm, Zn II 206,200 nm, Si I 212,412 nm e C I 247,856 nm. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 5 Hz), 50 J cm <sup>-2</sup> , 750 μm de diâmetro, 2 μs de atraso, 5 μs de integração, 25 pulsos acumulados por linha, 36 linhas por folha	82
Figura 27 – Espectros obtidos por μ-EDXRF sob pressão atmosférica e com vácuo (< 0,55 Torr) aplicado na câmara de amostragem do equipamento. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm, 5 s de irradiação por ponto, 40 kV e 300 μA de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh .....	85
Figura 28 – Comparação de fragmentos dos (A) espectros médios (n = 5) do filme Kapton® e da amostra, e (B) espectros médios (n = 15) de uma amostra controle e de uma amostra com deficiência induzida de P. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm, 5 s de irradiação por ponto, 40 kV e 300 μA de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh.....	86
Figure 29 – Mapas microquímicos de um folíolo de soja obtidos por μ-EDXRF: (A) mapa de K construído pelo equipamento; (B) mapa do espalhamento Compton e (C) mapa de K construído após a normalização (K/Rh). Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30 μA de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh.....	87
Figura 30 – Folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS 183 analisadas por μ-EDXRF. ....	88
Figura 31 – Mapas de distribuição espacial d e P em folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS 183, obtidos por μ-EDXRF. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30 μA de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh.....	89
Figura 32 – Mapas de distribuição espacial de S em folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS 183, obtidos por μ-EDXRF. Condições experimentais: feixe de	

raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30 $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh.....	90
Figura 33 – Mapas de distribuição espacial de K em folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS 183, obtidos por $\mu$ -EDXRF. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30 $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh.....	91
Figura 34 – Mapas de distribuição espacial de Ca em folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS 183, obtidos por $\mu$ -EDXRF. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30 $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh.....	92
Figura 35 – Folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS Tianá analisadas por $\mu$ -EDXRF.....	93
Figura 36 – Mapas de distribuição espacial de P em folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS Tianá, obtidos por $\mu$ -EDXRF. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30 $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh.....	94
Figura 37 – Mapas de distribuição espacial de S em folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS Tianá, obtidos por $\mu$ -EDXRF. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30 $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh.....	95
Figura 38 – Mapas de distribuição espacial de K e m folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS Tianá, obtidos por $\mu$ -EDXRF. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30 $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh.....	96
Figura 39 – Mapas de distribuição espacial de Ca em folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS Tianá, obtidos por $\mu$ -EDX RF. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30 $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh.....	97
Figura 40 – Espectros médios (n = 3) de emissão de raios X de um ponto aleatório da face adaxial da amostra e do mesmo ponto na face abaxial. Condições experimentais: feixe de raios X de 4,5 mm de diâmetro, 60 s de irradiação, 45 kV e 30 $\mu$ A de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh.....	99
Figura 41 – Efeito do uso de filtros nas análises por EDXRF: (A) espectros médios (n = 3) irradiando-se um ponto aleatório da amostra na ausência e na presença dos filtros; (B) intensidade dos sinais dos elementos de interesse. Condições experimentais: feixe de raios X de 4,5 mm de diâmetro, 60 s de irradiação, 45 kV e 30 $\mu$ A de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh.....	101
Figura 42 – Efeito da atmosfera de análise sobre o sinal analítico: (A) espectros médios (n = 3) irradiando-se um ponto aleatório da amostra sob vácuo e pressão atmosférica; (B) ganho de sinal para	

os elementos de interesse. Condições experimentais: feixe de raios X de 4,5 mm de diâmetro, 60 s de irradiação, 45 kV e 30 $\mu$ A de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh .....	102
Figura 43 – Avaliação do tempo de irradiação por ponto analisado: (A) espectros médios (n = 5) irradiando-se um ponto aleatório da amostra por 30, 40, 50, 60, 90, 120 e 180 s, respectivamente e (B) coeficientes de variação das medidas de intensidade de emissão dos elementos de interesse, exceto para o Zn. Condições experimentais: feixe de raios X de 4,5 mm de diâmetro, 45 kV e 30 $\mu$ A de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh.....	104
Figura 44 – Gráficos de regressão entre as frações de massa obtidas pelo método de referência e as previstas por PXRF, para Ca, K, P e Zn nas amostras de folhas frescas de soja. Condições experimentais: feixe de raios X de 4,5 mm de diâmetro, 40 s de irradiação, 45 kV e 30 $\mu$ A de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh.....	106
Figura 45 – Fragmentos dos espectros médios (n = 36) de folhas frescas de soja obtidos por PXRF. São apresentadas as intensidades dos sinais de P para as duas amostras com menores frações de massa deste elemento e duas amostras do tratamento controle para fins de comparação. Condições experimentais: feixe de raios X de 4,5 mm de diâmetro, 40 s de irradiação, 45 kV e 30 $\mu$ A de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh.....	108
Figura 46 – Gráficos de <i>scores</i> (A) e <i>loadings</i> (B) para a primeira e segunda componentes principais da PCA .....	111
Figura 47 – Gráfico de SIMCA para duas classes.....	112
Figura 48 – Dados meteorológicos do período de plantio e coleta das folhas de soja cultivadas em (A) casa de vegetação em sistema de hidroponia, no período de novembro de 2016 a fevereiro de 2017, e em (B) casa de vegetação com solo e no campo experimental do Grupo de Extensão Pró-Hort da ESALQ, no período de novembro de 2017 a janeiro de 2018.....	138
Figura 49 – Representação gráfica dos sinais analíticos <i>versus</i> frações de massa obtidas por ICP OES, para os elementos: Mg, P, Zn, B e Cu. Condições experimentais: laser de Nd:YAG @1064 nm, 5 ns, 10 Hz, 50 J cm <sup>-2</sup> , 750 $\mu$ m de diâmetro, 2 $\mu$ s de atraso e 5 $\mu$ s de integração. ....	139
Figura 50 – Mapas de distribuição elementar de Ca e Mg dos folíolos direito, do meio e esquerdo do tratamento controle (esquerda) e dos folíolos do tratamento com deficiência induzida de P (direita) de folhas frescas de soja da cultivar RK7214 IPRO, construídos por LIBS. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 10 Hz), 1 pulso de 50 J cm <sup>-2</sup> por ponto, 750 $\mu$ m de diâmetro, 2 $\mu$ s de atraso e 5 $\mu$ s de integração. ....	140
Figura 51 – Mapas de distribuição elementar de Ca e Mg dos folíolos direito, do meio e esquerdo do tratamento controle (esquerda) e dos folíolos do tratamento com deficiência induzida de P (direita) de folhas frescas de soja da cultivar M6210 IPRO, construídos por LIBS. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 10 Hz), 1 pulso de 50 J cm <sup>-2</sup> por ponto, 750 $\mu$ m de diâmetro, 2 $\mu$ s de atraso e 5 $\mu$ s de integração. ....	141

Figura 52 – Mapas de distribuição elementar de Al dos folíolos direito, do meio e esquerdo do tratamento controle (esquerda) e dos folíolos do tratamento com deficiência induzida de P (direita) de folhas frescas de soja, das cultivares RK7214 IPRO e M6210 IPRO, construídos por LIBS. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 10 Hz), 1 pulso de 50 J cm <sup>-2</sup> por ponto, 750 μm de diâmetro, 2 μs de atraso e 5 μs de integração.....	142
Figura 53 – Gráficos de regressão entre as frações de massa obtidas pelo método de referência e as previstas por PXRF, para S, Fe, Mn e Cu nas amostras de folhas frescas de soja. Condições experimentais: feixe de raios X de 4,5 mm de diâmetro, 40 s de irradiação, 45 kV e 30 μA de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh.....	143

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teores de macro- e micronutrientes essenciais em tecidos foliares de soja em bom estado nutricional (suficientes) e em níveis considerados deficientes, e principais funções bioquímicas de cada nutriente .....	37
Tabela 2 – Mapeamento microquímico de amostras foliares empregando a espectrometria de $\mu$ -EDXRF com fonte de radiação síncrotron .....	48
Tabela 3 – Volumes das soluções-estoque de macro- e micronutrientes empregados para o preparo das soluções nutritivas completa e com ausência de P .....	52
Tabela 4 – Programa de aquecimento para decomposição de amostras de tecido vegetal assistida por radiação micro-ondas .....	69
Tabela 5 – Parâmetros operacionais utilizados no espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente Thermo iCAP 7400 Duo .....	70
Tabela 6 – Frações de massa dos macro- e micronutrientes determinados pelo método de referência em amostras do campo experimental, da casa de vegetação e do CRM <i>NIST 1570a</i> .....	81
Tabela 7 – Frações de massa dos macro- e micronutrientes certificadas e determinadas pelo método de referência para o CRM <i>NIST 1570a</i> .....	105
Tabela 8 – Coeficientes de correlação linear ( $r$ ) e raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP) estimados para as regressões com e sem correção de espessura da amostra .....	107
Tabela 9 – Área foliar média das amostras analisadas por PXRF .....	109
Tabela 10 – Resultados das análises dos solos utilizados nos experimentos em casa de vegetação e no campo experimental .....	134
Tabela 11 – Composição dos insumos comerciais aplicados às sementes utilizadas nos experimentos .....	136



## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

CRM	Material de referência certificado
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CV	Coefficiente de variação
EDXRF	Espectrometria de fluorescência de raios X dispersiva em energia
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
fs-LIBS	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser em regime temporal de femtossegundos
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite
ICCD	<i>Intensified charge-coupled device</i>
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
ICP MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente
LA-ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente empregando ablação a laser
LA-ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente empregando ablação a laser
LIBS	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser
LOD	Limite de detecção
LTSD	Distância entre a lente de focalização do laser e a amostra
ns-LIBS	LIBS em regime temporal de nanossegundos
OES	Espectrometria de emissão óptica
PCA	Análise de componentes principais
SIMCA	<i>Soft Independent Modeling by Class Analogy</i> (Modelagem Independente por Analogia de Classes)



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	25
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1.	LIBS – Fundamentos e aplicações .....	27
2.2.	EDXRF – Fundamentos e aplicações.....	31
2.3.	Soja – Importância da cultura.....	34
2.4.	Avaliação do estado nutricional das plantas.....	36
2.5.	Análise direta de plantas por LIBS e EDXRF.....	39
2.6.	Mapeamento microquímico empregando LIBS e EDXRF .....	45
2.7.	Outros métodos de análise direta <i>in situ</i> e <i>in vivo</i> .....	49
3.	OBJETIVOS .....	50
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	51
4.1.	Descrição das amostras .....	51
4.1.1.	Coleta de amostras de experimentos em casa de vegetação.....	51
4.1.2.	Cultivo de soja em casa de vegetação .....	51
4.1.2.1.	Hidroponia.....	51
4.1.2.2.	Solo.....	53
4.1.3.	Coleta de amostras em campos experimentais da ESALQ .....	54
4.2.	Instrumentação .....	55
4.2.1.	LIBS .....	55
4.2.2.	$\mu$ -EDXRF .....	57
4.2.3.	EDXRF portátil .....	58
4.2.4.	ICP OES .....	59
4.2.5.	Moagem criogênica.....	59
4.3.	Reagentes e soluções.....	60
4.4.	Métodos.....	60
4.4.1.	Coleta e preparo das amostras .....	60
4.4.2.	LIBS .....	61
4.4.2.1.	Estudos iniciais – análise de folhas frescas .....	61
4.4.2.2.	Mapeamento de folhas de soja .....	61
4.4.2.3.	Análise direta de folhas frescas de soja.....	62
4.4.2.4.	Tratamento dos dados obtidos.....	64
4.4.3.	Micro-EDXRF.....	64
4.4.3.1.	Mapeamento de folhas secas de soja.....	64
4.4.3.2.	Tratamento dos dados.....	66

4.4.4.	EDXRF - sistema portátil .....	66
4.4.4.1.	Análise direta de folhas frescas de soja .....	66
4.4.4.2.	Tratamento dos dados obtidos .....	67
4.4.5.	Método de referência .....	69
4.4.5.1.	Preparo das amostras - cominuição .....	69
4.4.5.2.	Decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas.....	69
4.4.5.3.	Determinação dos elementos por ICP OES .....	70
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
5.1.	Estudos iniciais – análise de folhas de soja por LIBS .....	71
5.2.	Mapeamento de folhas de soja por LIBS.....	73
5.3.	Análise direta de folhas frescas de soja por LIBS .....	78
5.4.	Mapeamento de folhas de soja por $\mu$ -EDXRF.....	84
5.5.	Análise direta de folhas frescas de soja por EDXRF portátil .....	98
6.	CONCLUSÕES .....	113
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	115
	REFERÊNCIAS .....	119
	APÊNDICE A .....	131
	APÊNDICE B.....	139
	APÊNDICE C.....	140
	APÊNDICE D .....	143

## 1. INTRODUÇÃO

A determinação de macro- (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Zn, B, Mo, Cl e Ni) em folhas de plantas é recomendada para avaliar o estado nutricional das culturas de interesse econômico<sup>1</sup>. Nesse tipo de avaliação, as folhas diagnósticas são submetidas às etapas de lavagem, secagem e moagem. O procedimento para análise, normalmente, envolve a digestão das amostras por via úmida seguida da determinação quantitativa dos elementos por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)<sup>2,3</sup>.

A análise direta de sólidos tem despertado grande interesse da comunidade científica e tem sido considerada uma alternativa atraente frente aos procedimentos convencionais. Entre as vantagens podem-se destacar a maior frequência analítica, devido à redução no tempo das etapas de pré-tratamento da amostra; minimização do risco de contaminação, devido ao uso de menores quantidades de reagentes, menor manipulação e exposição da amostra; minimização das perdas do analito por volatilização; menor exposição do analista aos reagentes tóxicos ou corrosivos e a menor geração de resíduos e efluentes<sup>4,5</sup>.

Neste sentido, o uso de técnicas que empregam a ablação com laser, como a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente empregando ablação a laser (LA-ICP-MS), a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente empregando ablação a laser (LA-ICP OES) e a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS), têm sido foco de estudos a nível mundial para a análise direta de sólidos em diferentes grupos de pesquisa<sup>6,7,8,9,10</sup>.

Outra técnica que permite a análise direta de materiais sólidos é a espectrometria de fluorescência de raios X dispersiva em energia (EDXRF), que apresenta como características a capacidade de análise multielementar e simultânea, ampla faixa linear de calibração e baixo custo por determinação, além de ser uma técnica não-destrutiva<sup>11</sup>. O fato de a amostra poder ser analisada sem ou com mínimo pré-tratamento faz com que essas técnicas sejam atraentes principalmente para amostras sólidas.

Dentre as culturas de interesse econômico no mercado mundial, destaca-se a soja (*Glycine max L.*) que é a principal oleaginosa cultivada no mundo. Atualmente, a soja corresponde a 57 % da área plantada para a produção de grãos do país, sendo a cultura que mais cresceu no Brasil nos últimos 30 anos<sup>12; 13</sup>.

Na safra 2017/2018, foram exportados 80 milhões de toneladas, sendo 68,1 milhões de toneladas de soja em grãos, 14,2 milhões de toneladas de farelo proteico e 1,3 milhões de toneladas de óleo comestível. O total arrecadado com as exportações atingiu US\$ 31,7 bilhões. O processamento da soja para a fabricação de biodiesel também vem aumentando, sendo uma forma de agregar ainda mais valor ao complexo sojícola<sup>14</sup>.

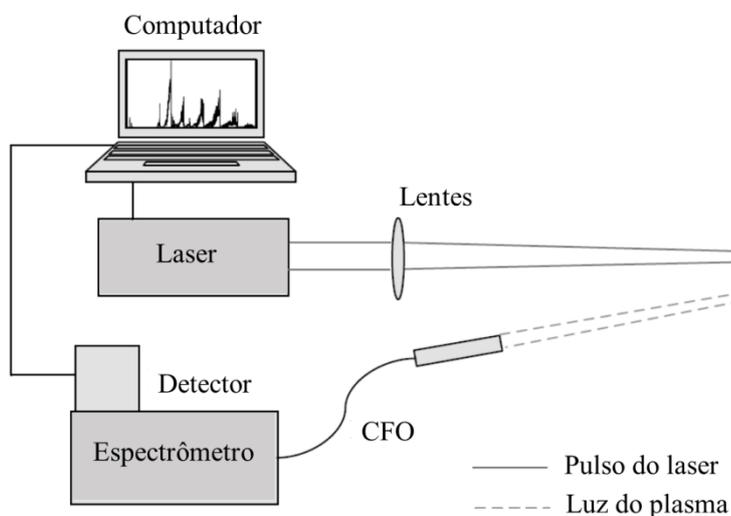
Uma vez que a produção de soja está entre as atividades econômicas de grande importância no cenário do agronegócio, a análise direta das folhas visando à determinação de macro- e micronutrientes para a avaliação do estado nutricional, tem importância analítica, econômica e ambiental.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. LIBS – Fundamentos e aplicações

A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser, conhecida pelo acrônimo LIBS (termo do inglês, “*Laser Induced Breakdown Spectroscopy*”), também chamada de laser-induced plasma spectroscopy (LIPS), é um método da espectroscopia de emissão atômica/óptica (AES/OES) que emprega um laser pulsado de baixa energia, de dezenas a centenas de milijoules por pulso, e lentes para focalizar e gerar um plasma, que vaporiza uma pequena quantidade de amostra<sup>13</sup>. Na representação mostrada na Figura 1, uma porção da luz emitida pelo plasma é coletada por um cabo de fibras ópticas (CFO) que transporta a radiação para um espectrômetro que dispersa a luz emitida por átomos e espécies iônicas excitadas no plasma. Um detector recebe os sinais de emissão e dispositivos eletrônicos digitalizam e mostram os resultados. O laser pulsado quando focalizado na amostra, que pode ser sólida, líquida, gasosa ou um aerossol, gera um microplasma no processo de microamostragem. No microplasma gerado, átomos, íons e fragmentos moleculares vaporizados da amostra são excitados e coexistem com fótons e elétrons<sup>15; 16</sup>. O espectro de emissão do plasma é obtido e as análises quali- e quantitativas são realizadas pelo monitoramento do comprimento de onda e da intensidade das linhas de emissão dos elementos presentes na amostra. O comprimento de onda identifica o elemento e, quando há uma calibração apropriada, a intensidade da linha permite a quantificação<sup>13;14</sup>.

Figura 1 – Representação esquemática de um sistema LIBS simples, adaptada de Cremers e Radziemski<sup>16</sup>



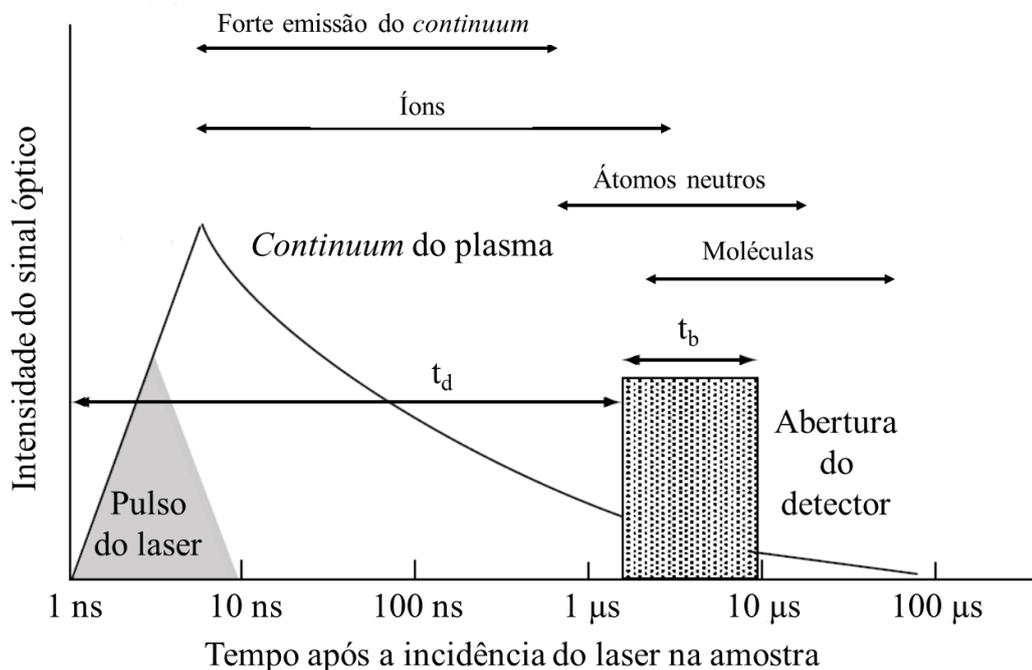
Normalmente, um sistema LIBS é constituído por um laser pulsado em regime de nanossegundos, com taxa de repetição entre 1 e 20 Hz e energia entre 10 e 350 mJ por pulso para criar o microplasma na superfície. Lasers pulsados que operam em regime de femtosegundos e picossegundos também podem ser empregados. O sistema óptico é composto de lentes para focalizar o laser na superfície da amostra e, geralmente, um telescópio é empregado para coletar a radiação emitida pelo plasma. A coleta e o transporte até o espectrômetro de parte da radiação emitida pelo plasma são realizados através de fibras ópticas. O espectrômetro pode ser equipado com detector CCD ou ICCD, cujo papel é dispersar a luz emitida pelos átomos e espécies iônicas excitadas provenientes da amostra. O registro do sinal é realizado por uma unidade de detecção e um computador é utilizado para o controle do laser e o processamento dos dados.

Peng et al.<sup>17</sup> apresentaram uma lista de sistemas LIBS de bancada comerciais e sistemas modulares (self-assembled), portáteis e para análise remota (stand-off), com as características do laser, do espectrômetro e do detector empregados, além das amostras avaliadas em trabalhos publicados recentemente aplicados à agricultura. É possível observar a predominância de lasers de Nd:YAG @1064 nm e espectrômetros com montagem óptica do tipo *Czerny-Turner*, ou com óptica *Echelle*, equipados com detector *ICCD*.

Embora o aparato instrumental seja bastante simples, os processos físicos e químicos básicos envolvidos na iniciação, formação e decaimento do plasma são complexos. As características do plasma são dependentes da composição da amostra, das condições da sua superfície, de suas propriedades térmicas e ópticas, além dos parâmetros do laser. Um plasma é composto por átomos, íons e elétrons livres e se apresenta, de forma global, eletricamente neutro pois as espécies carregadas agem coletivamente. Plasmas são caracterizados por uma variedade de parâmetros, sendo que o mais básico é o grau de ionização. Os plasmas gerados por LIBS são tipicamente, fracamente ionizados, o que significa que a razão de elétrons para outras espécies é menor que 10 %. A evolução temporal de plasma gerado por LIBS iniciado por um único pulso é apresentado na Figura 2. Logo após a incidência do pulso do laser, a ionização é alta, há recombinações elétron-íon e são formados átomos neutros e moléculas. Durante esse processo há valores elevados do *background continuum* (radiação de fundo), que decai com o tempo mais rapidamente que as linhas espectrais. O *continuum* é a luz branca do plasma que contém pouca informação espectroscópica, pois há pequenas variações de intensidade em função do comprimento de onda, e íons resultantes do processo de ejeção dos elétrons de átomos neutros. Quando o plasma decai, um espectro de átomos neutros e, eventualmente, moléculas simples formadas pela recombinação de átomos, é obtido.

Durante o decaimento, observa-se a diminuição da intensidade de emissão da radiação de fundo. Essa evolução temporal do plasma permite que a região onde o sinal de interesse predomina seja selecionada. O símbolo  $t_d$  (tempo de atraso) representa o tempo que deve ser esperado, a partir da incidência do laser, para que a janela do detector seja aberta e o sinal seja coletado;  $t_b$  (tempo de integração) representa o tamanho da janela<sup>15; 16; 18</sup>.

Figura 2 – Representação da evolução temporal de um plasma gerado por um laser pulsado em regime de nanossegundos;  $t_d$ : tempo de atraso e  $t_b$ : tempo de integração. (Figura adaptada de Cremers e Radziemski<sup>16</sup> e Miziolek<sup>18</sup>)

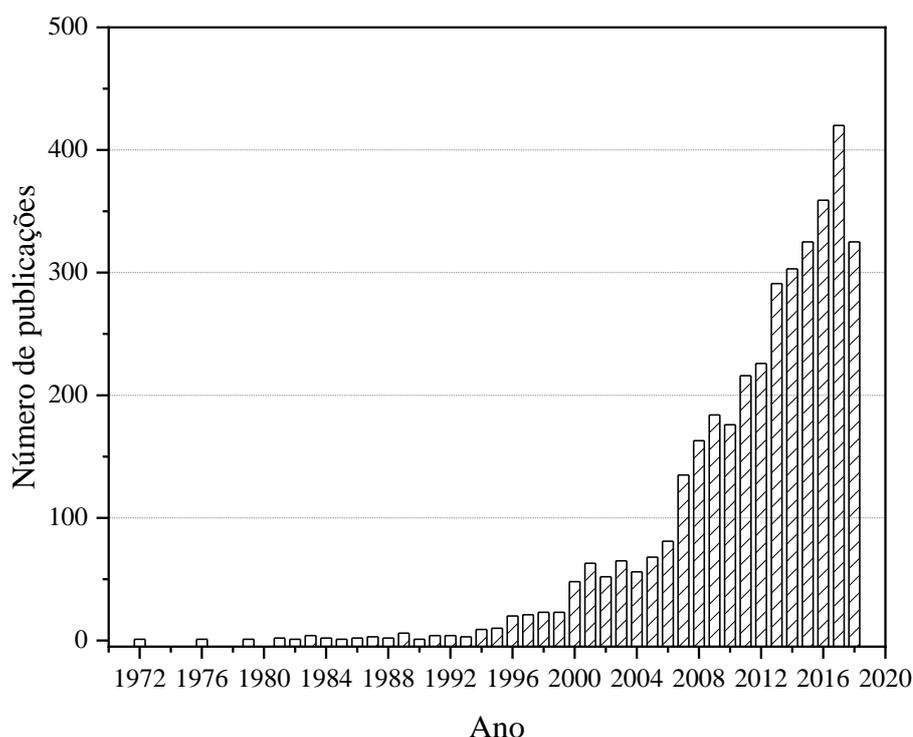


Além das características complexas intrínsecas do plasma gerado por LIBS, as configurações do laser (*e.g.* comprimento de onda, duração do pulso, taxa de repetição, arranjo óptico), assim como as propriedades da amostra (*e.g.* resistência mecânica, densidade, porosidade e distribuição de tamanho de partículas, no caso de análise de pastilhas de material cominuído) e as condições de medição óptica (*e.g.* seleção das linhas atômicas ou iônicas, tempo de atraso e tempo de integração das medidas) podem afetar as determinações por LIBS<sup>19; 20</sup>. Desse modo, para cada aplicação, as condições experimentais devem ser cuidadosamente avaliadas e selecionadas de forma a alcançar sensibilidade, limites de detecção e precisão adequados.

Mesmo com essa alta complexidade e com os diversos parâmetros a serem ajustados a fim de melhorar os resultados analíticos obtidos, LIBS tem várias características atraentes para a resolução de problemas analíticos complexos: i) permite a análise direta de sólidos, líquidos e gases sem ou com o mínimo pré-tratamento da amostra; ii) é uma técnica versátil, rápida e capaz de fornecer informações analíticas qualitativas e quantitativas; iii) possibilita análises *in situ* e em tempo real, com tempo de aquisição do espectro em poucos segundos; iv) apresenta uma instrumentação relativamente simples, robusta e compacta; v) permite análise remota.

Por esse motivo, nos últimos anos, LIBS vem se destacando como técnica analítica e alternativa viável aos métodos clássicos de espectrometria atômica. O número de publicações tem aumentado ano após ano e a técnica vem ocupando lugar de destaque nos periódicos especializados. Em consulta realizada no banco de dados SCOPUS (<https://www.scopus.com/>), buscando o termo "*laser-induced breakdown spectroscopy*", foram encontrados 3700 artigos publicados entre 1972 e agosto de 2018. A Figura 3 mostra o número de publicações sobre LIBS por ano e, a partir dela, é possível observar um crescimento significativo no número de publicações nas últimas duas décadas.

Figura 3 – Número de publicações sobre espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser entre 1972 e 2018



Dessas publicações, 141 são artigos de revisão dos mais diferentes campos de aplicação: fundamentos de LIBS<sup>21; 22</sup>; análise de alimentos<sup>23; 24</sup>; uso de ferramentas quimiométricas com LIBS<sup>25</sup>; agricultura<sup>17; 26; 27</sup>; carvão mineral<sup>28</sup>; análise de dispositivos de fusão nuclear<sup>29</sup>; entre outros.

Recentemente, Bauer e Buckley<sup>30</sup> fizeram uma revisão sobre novas aplicações de LIBS e listaram 14 artigos de revisão publicados entre 2010 e 2015, sobre diferentes tópicos: fundamentos de LIBS<sup>21</sup>; métodos de análise para solo e análises ecológicas<sup>31</sup>; análises ambientais, geoquímicas, de patrimônio cultural e aplicações espaciais<sup>32; 33</sup>; LIBS pulso único<sup>34</sup> e *calibration free*<sup>35</sup>; aplicações biológicas<sup>26</sup>, biomédicas<sup>36</sup> e arqueométricas<sup>37</sup>; abordagens instrumentais e metodológicas<sup>38</sup>; análise de material vegetal<sup>27</sup>; boas práticas em LIBS<sup>39</sup>; desenvolvimento de equipamentos portáteis<sup>40</sup> e uma revisão crítica dos recentes progressos em LIBS<sup>41</sup>. Isso mostra como o campo de aplicações é bastante amplo e como LIBS vem avançando em diversas áreas, até então pouco exploradas por esta técnica.

## 2.2. EDXRF – Fundamentos e aplicações

A espectrometria de fluorescência de raios X (XRF) é uma técnica analítica bem consolidada, que permite análises multielementares quantitativamente (especialmente para determinação de elementos com  $Z > 13$ ), de forma simultânea e não-destrutiva<sup>42</sup>.

Em XRF, a amostra é irradiada com um feixe de raios X (primários), que apresentam energia suficiente para promover a ejeção de um elétron de uma camada interna do átomo, criando uma vacância. Este vazio é preenchido por um elétron de maior energia e, no processo, há liberação de energia, ou geração de radiação secundária (fluorescência), desprendida na forma de um fóton de raios X.

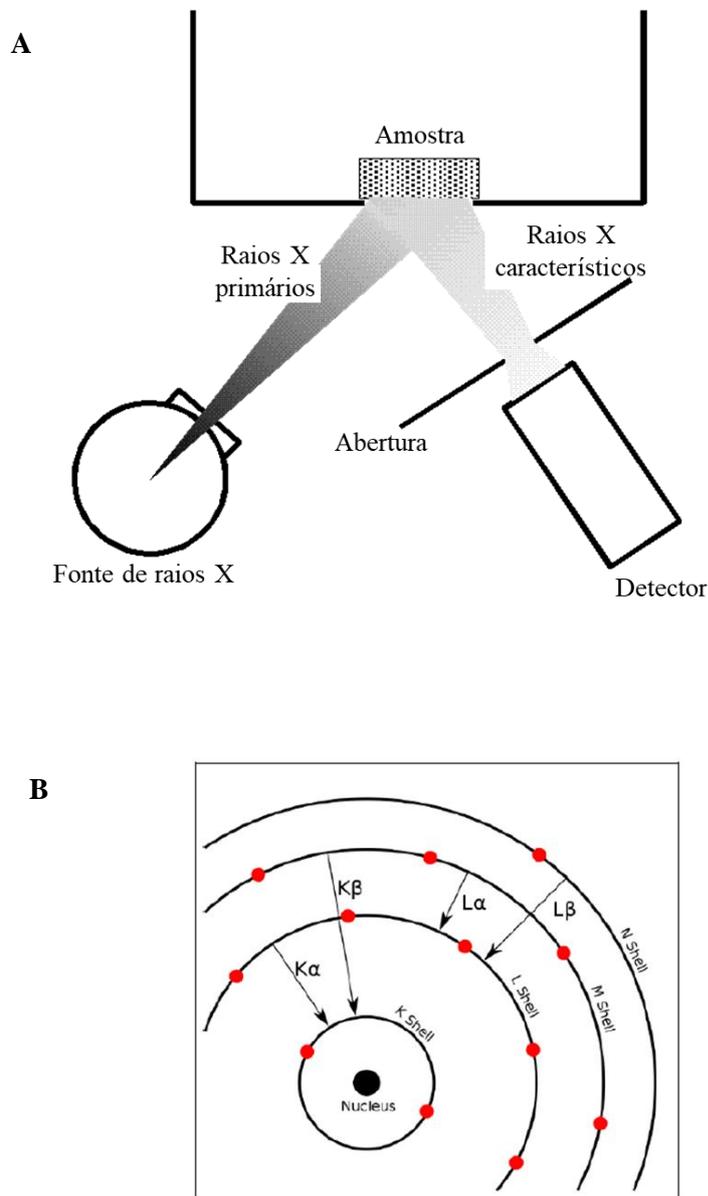
A produção de raios X característicos envolve transições de elétrons entre orbitais atômicos, ou estados de energia, associadas à ionização da camada mais interna. Quando um elétron é ejetado da camada K pelo bombardeio de elétrons ou pela absorção de um fóton, o átomo fica ionizado e o íon gerado fica em um estado de alta energia. O excesso de energia que o íon tem em relação ao estado fundamental é igual à energia (energia de ligação) necessária para remover o elétron da camada K para um estado de repouso fora do átomo. Se esta vacância eletrônica for preenchida por um elétron vindo de um nível L, a transição é acompanhada pela emissão de uma linha de raios X, conhecida como  $K_{\alpha}$ . Por outro lado, se o átomo contém elétrons suficientes, a vacância da camada K pode ser preenchida por um elétron proveniente de um nível M que é acompanhado pela emissão da linha  $K_{\beta}$ <sup>43</sup>.

A espectrometria de fluorescência de raios X permite análises qualitativas, através das medidas do comprimento de onda ou da energia de emissão dos raios X característicos. Neste caso, como as transições eletrônicas surgem dos orbitais mais internos, o efeito de ligações químicas ou estado de oxidação são quase insignificantes. Além disso, esta técnica permite análises quantitativas, medindo-se primeiro a intensidade de emissão da linha característica do elemento e, em seguida, relaciona-se essa intensidade com a concentração<sup>42</sup>.

Um espectrômetro de fluorescência de raios X é constituído basicamente de três partes principais: a fonte de excitação, elementos ópticos para focalizar o feixe e um sistema de detecção<sup>44</sup>. Dependendo do tipo de detector, da fonte de excitação, dos elementos ópticos empregados e do ângulo entre eles, surgem diferentes variantes da técnica. A Figura 4 mostra o arranjo experimental de um espectrômetro de fluorescência de raios X simples e as transições eletrônicas em que há emissão de fótons de raios X.

Em geral, a instrumentação da XRF pode ser dividida em dois grupos em relação ao sistema de detecção: modo dispersivo em comprimento de onda (WDXRF, do inglês *Wavelength Dispersive X ray Fluorescence*) e modo dispersivo em energia (EDXRF, do inglês *Energy Dispersive X ray Fluorescence*). WDXRF emprega um cristal analisador, que seleciona os comprimentos de onda dos fótons de raios X. Isto faz com que WDXRF apresente alta resolução, em termos de diferenciar a forma e a posição dos picos de transição, maior sensibilidade, precisão e exatidão. Por outro lado, EDXRF emprega detectores capazes de discriminar a energia dos raios X que atingem o detector. Neste modo, o espectro todo pode ser adquirido de uma só vez, o que torna EDXRF ideal para análises exploratórias (*screening*) e para análise de amostras que sofrem danos pela incidência de radiação<sup>45</sup>.

Figura 4 – Representação de um espectrômetro de fluorescência de raios X: em (A) as partes que compõem o espectrômetro, e em (B) as transições eletrônicas em que há emissão de fótons de raios X



A espectrometria de fluorescência de raios X dispersiva em energia (EDXRF) apresenta um espectrômetro com funções semelhantes a um sistema de contador proporcional, exceto por apresentar melhor resolução de energia. Os espectrômetros por energia dispersiva se tornaram disponíveis no início da década de 1970, nos quais um detector semicondutor de Si(Li) é usado para permitir a distribuição das amplitudes dos pulsos de tensão proporcionais à distribuição de energia dos fótons<sup>42</sup>. Essa técnica vem sendo utilizada para a determinação elementar em diversas matrizes, incluindo materiais vegetais<sup>11</sup>, tais como café<sup>46</sup>,

cana de açúcar<sup>47; 48; 49</sup>, arroz<sup>50</sup>, plantas medicinais<sup>51</sup>, além de frutas<sup>52</sup>, alimentos<sup>50; 53</sup>, artefatos cerâmicos<sup>54</sup> e culturais<sup>55</sup>, relíquias culturais e achados arqueológicos<sup>56</sup>, pigmentos históricos<sup>57</sup>, entre outros.

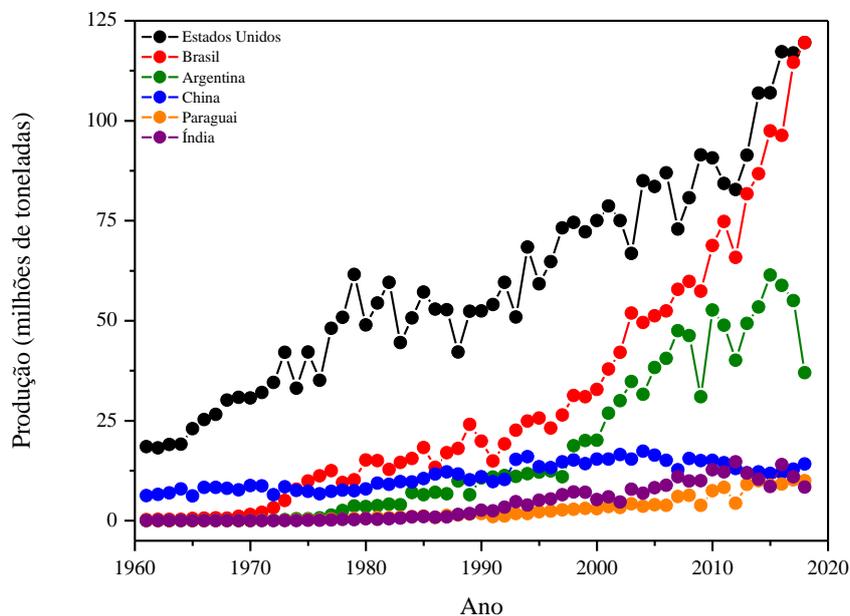
### **2.3. Soja – Importância da cultura**

A produção mundial de soja atingiu 336,70 milhões de toneladas na safra de 2017/2018. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja com uma produção de 119,50 milhões de toneladas na safra 2017/2018, com uma área plantada de 33,90 milhões de hectares, atingiu uma produtividade de 3,40 ton ha<sup>-1</sup>. Atrás apenas dos Estados Unidos, maior produtor mundial do grão, cuja produção atingiu 119,52 milhões de toneladas do grão nessa mesma safra, o Brasil tem papel de destaque por atingir a maior produtividade<sup>58</sup>. Logo atrás do Brasil e dos Estados Unidos, que produziram cerca de 35% cada da safra 2017/2018, estão Argentina, China, Paraguai e Índia, com produções equivalentes à 11%, 4%, 2,9% e 2,4% da produção mundial, respectivamente.

Nas últimas 12 safras, o Brasil teve um incremento de 14,5 milhões de hectares novos de soja, tornando a cultura a protagonista no aumento da área de cultivo no país. Atualmente, corresponde à cerca de 57 % da área total semeada com grãos no país. Esse incremento refletiu diretamente no aumento da produção brasileira. A Figura 5 mostra a série histórica (1961 a 2018) de produção em milhões de toneladas dos maiores países produtores. Nesta figura é possível visualizar o incremento da produção brasileira nos últimos 12 anos.

Grande parte da soja destina-se à produção de óleo comestível e farelo proteico, o que contribui para a competitividade nacional com respeito à produção de carnes, ovos e leite. Dos 93,7 milhões de toneladas produzidas em 2015, 39,1 milhões foram destinadas à produção de óleo comestível e farelo proteico (*ca.* 7,55 e 29,8 milhões de toneladas)<sup>14</sup>. Além disso, o alto teor de proteína e o elevado padrão de qualidade da soja e do farelo brasileiro permitem sua entrada em mercados exigentes como os da União Europeia e do Japão. Na safra 2017/2018, foram exportadas 80 milhões de toneladas, sendo 68,1 milhões de toneladas de soja em grãos, 14,2 milhões de toneladas de farelo e 1,3 milhões toneladas de óleo. O total arrecadado com as exportações chegaram a US\$ 31,7 bilhões<sup>59</sup>. O consumo interno de soja em grãos atingiu os 59 milhões de toneladas<sup>58</sup>.

Figura 5 – Série histórica (1961 -2018) da produção de soja pelos maiores países produtores: Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, Paraguai e Índia. (Fonte: Food Security Portal e USDA – Ago/2018)



As projeções indicam um aumento de 29,7% em relação à produção de soja em grão de 2016/17 podendo alcançar 146,5 milhões de toneladas em 2026/2027. A área plantada de soja deve aumentar 9,3 milhões de hectares nos próximos 10 anos, chegando a 43,2 milhões de hectares em 2027. As exportações de soja em grão projetadas para 2026/27 são de 84,0 milhões de toneladas, representando um aumento de 21,0 milhões de toneladas em relação à quantidade exportada pelo Brasil em 2016/17<sup>60</sup>. A produção de grãos deverá passar de 232,0 milhões de toneladas em 2016/2017 para 288,2 milhões de toneladas em 2026/27. Isso indica um acréscimo de 56,0 milhões de toneladas à produção atual do Brasil, ou 24,2%. A soja, junto com o trigo e o milho são os grãos que devem continuar impulsionando esse crescimento<sup>60</sup>.

O processamento da soja para a fabricação de biodiesel também vem aumentando, sendo uma forma de agregar ainda mais valor ao complexo sojícola. A produção do biodiesel utilizando óleo de soja como matéria-prima corresponde a mais de 70% da produção nacional, em média. O biodiesel é um combustível capaz de reduzir em até 78% a emissão dos gases causadores do efeito estufa na atmosfera, o qual constitui uma alternativa interessante aos combustíveis fósseis<sup>14; 61</sup>.

## 2.4. Avaliação do estado nutricional das plantas

As plantas são organismos fotoautotróficos capazes de completar todo o ciclo de vida utilizando energia fotoquímica do sol para sintetizar todos os componentes químicos necessários, baseados em CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e 14 minerais, sendo estes classificados como nutrientes essenciais. As plantas são compostas basicamente de hidrogênio (H), carbono (C) e oxigênio (O), *ca.* 95% da matéria seca, e os outros 5% consistem de 6 macronutrientes (N, Mg, P, S, K, Ca) e 8 micronutrientes (B, Cl, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Mo), que são absorvidos da solução do solo<sup>62</sup>.

Os nutrientes essenciais têm uma ou mais funções não redundantes no metabolismo primário das plantas e, como consequência, as plantas são incapazes de completar todo o ciclo de vida, da germinação à maturidade, se apenas um dos nutrientes essenciais estiver indisponível. Para ser classificado como nutriente essencial, o elemento precisa ser requerido por todas as plantas superiores, sem exceção<sup>62</sup>.

Os nutrientes essenciais têm uma infinidade de funções em plantas como, por exemplo, são componentes estruturais, ativadores enzimáticos (cofatores) e reguladores de potenciais eletroquímicos e osmóticos. Alguns desses nutrientes, por exemplo, Zn e Fe, têm muitas funções enquanto outros como Cl, Ni e Mo estão envolvidos em apenas alguns processos. Os macronutrientes, geralmente, constituem 0,1 a 5,5% da matéria seca da planta (MS), ou seja, 1 a 55 mg g<sup>-1</sup> MS, e participam da síntese de proteínas, da parede celular, do transporte de energia, entre outras funções. Já a faixa correspondente para os micronutrientes, varia de, aproximadamente, 0,1 a 100 mg g<sup>-1</sup> MS. Eles, geralmente, estão envolvidos em processos de ativação enzimática e de proteção contra o estresse oxidativo. Para cada cultura há recomendações de teores adequados para cada um dos elementos essenciais. A Tabela 1 mostra as faixas de concentração de macro- e micronutrientes em tecidos foliares de soja em bom estado nutricional e em níveis considerados deficientes<sup>2;63</sup>, além das principais funções que cada nutriente essencial desempenha no metabolismo das plantas<sup>64</sup>.

A determinação de elementos essenciais em tecidos vegetais é importante para identificar quais estão presentes em quantidades subótimas e, assim, corrigir as deficiências no solo através do uso de fertilizantes e, eventualmente, de outros insumos.

Tabela 1 – Teores de macro- e micronutrientes essenciais em tecidos foliares de soja em bom estado nutricional (suficientes) e em níveis considerados deficientes, e principais funções bioquímicas de cada nutriente

Nutriente	Suficientes <sup>2</sup>	Deficientes <sup>63</sup>	Função bioquímica
	Faixa de concentração		
Macronutrientes (g kg <sup>-1</sup> )			
N	55 – 58	< 32,5	Síntese proteica, ácidos nucleicos, equilíbrio hormonal
P	4 – 5	< 1,6	Transporte de energia, biomembranas
K	22 – 25	< 12,5	Translocação, osmorregulação, homeostase do pH, ativação enzimática
Ca	9 – 10	< 2,0	Síntese e estabilização da parede celular, transdução de sinal
Mg	3,5 – 4,0	< 1,0	Fotossíntese (átomo central da clorofila), ativação enzimática
S	2,5 – 3,0	< 1,5	Síntese e funcionalidade de proteínas
Micronutrientes (mg kg <sup>-1</sup> )			
Fe	125 – 150	< 30,0	Ativação enzimática, transporte de elétrons, biossíntese de clorofila, proteção contra o estresse oxidativo
Mn	35 – 50	< 15,0	Ativação enzimática, fotossíntese, transporte de elétrons, síntese de componentes da parede celular, proteção contra o estresse oxidativo
Zn	50 – 70	< 11,0	Expressão gênica, ativação enzimática, síntese de hormônios e ácidos nucleicos, proteção contra o estresse oxidativo
Cu	12 – 15	< 5,0	Ativação enzimática, síntese de componentes da parede celular, transporte de elétrons, proteção contra o estresse oxidativo
B	40 – 45	< 10,0	Estabilização da parede celular, biossíntese de nucleotídeos, translocação, germinação de pólen
Mo	1 – 4	< 0,5	Ativação enzimática, fixação de nitrogênio, redução de nitrato
Cl	-*	-*	Eletroneutralidade, osmorregulação, fotossíntese
Ni	-*	-*	Ativação enzimática, metabolismo da uréia

Fonte: Adaptado de Husted *et al.*<sup>64</sup> \*Não há dados disponíveis para Cl e Ni.

Em um sistema de produção agrícola, o suprimento balanceado de nutrientes essenciais é pré-requisito para se obter o ótimo crescimento das plantas, alto rendimento e produtividade e garantir a qualidade dos produtos. Assim, a análise de tecido vegetal é uma ferramenta valiosa para avaliar o estado nutricional e a qualidade das culturas, sendo amplamente utilizada para fins comerciais e científicos<sup>65</sup>.

A avaliação do estado nutricional de plantas é comumente realizada por meio da diagnose foliar, pois a folha é o órgão que melhor reflete o estado nutricional da cultura, ou seja, que responde mais às variações nos suprimentos de nutrientes, seja pelo solo ou por fertilizantes<sup>1:2</sup>. A diagnose foliar também é especialmente importante na identificação de deficiências que provocam sintomas semelhantes, o que pode dificultar a diagnose visual, e na determinação de doses de fertilizante(s) que devem ser implementadas ou ajustadas para se alcançar uma boa produtividade. Esse tipo de análise deve ser empregada, sempre que possível, em conjunto com outros métodos como, por exemplo, a análise de fertilidade do solo<sup>2</sup>.

A composição elementar das plantas é relevante não apenas para quem produz, mas também para os consumidores, uma vez que os vegetais são a maior fonte de minerais inorgânicos essenciais ou benéficos para a nutrição e saúde humana. Qualquer elemento que esteja presente no solo, em menor ou maior quantidade, pode ser absorvido pelas plantas. Isso inclui não só elementos benéficos, como também elementos potencialmente tóxicos como Cd, As e Hg. Desse modo, técnicas analíticas que permitem análises multielementares têm se apresentado como ferramentas importantes na avaliação do estado nutricional das plantas e da qualidade dos produtos vegetais<sup>65</sup>.

As técnicas baseadas em plasmas acoplados indutivamente (ICP), como as espectrometrias de emissão óptica (ICP OES) e de massas (ICP MS), têm sido amplamente empregadas e vêm substituindo gradualmente a maioria dos métodos tradicionais baseados na espectrometria de absorção atômica (AAS), que permite a determinação de um único elemento por vez. Essas técnicas permitem análises rápidas e multielementares, quando combinadas com métodos apropriados de preparo de amostras e decomposição, e os baixos limites de detecção associados à alta precisão e exatidão, têm permitido uma alta frequência analítica da maior parte dos elementos da tabela periódica, em praticamente qualquer amostra de planta. Este desenvolvimento tem aumentado significativamente a compreensão da biologia vegetal fundamental e nutrição vegetal<sup>64</sup>.

A vantagem analítica das técnicas baseadas em ICP consiste na capacidade de determinar todos os elementos que estão presentes nas amostras (*fingerprint*) em uma ampla

faixa de concentração, abrangendo valores abaixo de 0,10 até valores maiores que 50000 mg kg<sup>-1</sup>, ou seja, de 0,00001 a 5% da matéria seca. Entretanto, o desempenho analítico dessas técnicas é altamente dependente das rotinas laboratoriais de preparo de amostras, digestão e análise. Além disso, deve ser realizada a validação dos métodos analíticos<sup>66</sup>.

Cabe aqui mencionar que, nesta tese, o nutriente P foi escolhido para fins de avaliação dos métodos propostos devido à sua importância econômica e social. Como já foi mencionado anteriormente, o P é um elemento essencial para as plantas e, por isso, elas necessitam de uma quantidade adequada para completar o ciclo de vida. Estima-se que 30 % dos solos agricultáveis do mundo sejam deficientes em P e precisam da adição de fertilizantes para garantir o rendimento e a qualidade<sup>67</sup>. No entanto, a principal fonte de fertilizantes fosfatados é a rocha fosfática, um recurso natural finito. As previsões mais pessimistas estimam que as reservas naturais não vão durar mais 50 anos. Isso faz do P um recurso natural estratégico, da mesma forma que o petróleo, com pouquíssimos países controlando a grande maioria das reservas conhecidas<sup>68; 69</sup>.

Atualmente, o uso excessivo de P na agricultura está causando a eutrofização de lagos e mares, em algumas partes do mundo, enquanto a depleção de P resulta em limitações de rendimento em outros lugares<sup>67</sup>. Uma forma de resolver ou minimizar os dois problemas, o excesso ou a falta de P, é aumentar a eficiência do uso de P na agricultura, reduzindo assim o impacto ambiental negativo, garantindo a produção de alimentos e fazendo um uso mais sustentável desse recurso natural<sup>70; 71</sup>.

## **2.5. Análise direta de plantas por LIBS e EDXRF**

LIBS e EDXRF têm sido amplamente empregadas para análise direta de plantas. Na literatura podem ser encontrados vários trabalhos com métodos propostos para a determinação direta e simultânea de P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn, Zn, B e Si em materiais vegetais na forma de pastilhas. A apresentação da amostra em forma de pastilha promove uma diminuição nas etapas da sequência analítica, simplificando o processo de análise quando comparado aos métodos convencionais que requerem a decomposição prévia da amostra<sup>3; 4</sup>.

Embora simplifique a sequência analítica, essa forma de apresentação ainda requer etapas de secagem, cominuição, homogeneização e pastilhamento do material vegetal previamente às análises. Assim, uma forma de diminuir ainda mais as etapas da sequência analítica é a análise direta. Nesse contexto, a maior parte dos trabalhos encontrados na

literatura sobre métodos de análise direta de plantas são determinações de caráter qualitativo ou semi-quantitativo de nutrientes e/ou elementos potencialmente tóxicos. Há poucos trabalhos que apresentam métodos quantitativos, principalmente para quantificação de macro- e micronutrientes em folhas de culturas de interesse econômico.

Ma et al.<sup>72</sup> empregaram um sistema fs-LIBS e o método *calibration free* para a determinação quantitativa de N, P, Ca e Fe em folhas secas de álamo. Neste trabalho, as folhas foram analisadas diretamente, mas não há quaisquer informações sobre a validação do método proposto ou avaliação da estratégia de amostragem.

Em 2012, Santos et al.<sup>27</sup> fizeram uma revisão sobre aplicações de LIBS para a determinação de elementos em material vegetal. Para análise de folhas foram encontrados e apresentados 14 trabalhos empregando LIBS para investigar a composição (análise qualitativa) e distribuição espacial de elementos (macro- e micronutrientes, além de Ag, Al, Cd, Cl, Li, Mo, Na, Pb, Sr, Ti, V) em folhas frescas e 8 trabalhos em folhas secas. Apenas 2 trabalhos entre os mencionados acima fizeram uma análise semi-quantitativa<sup>73; 74</sup>.

Em 2014, Yao et al.<sup>75</sup> empregaram um sistema LIBS, composto por um laser de Nd:YAG (1064 nm, 10 ns, 200 mJ por pulso, 5 Hz) e um espectrômetro Avantes (200 – 1100 nm) com detector ICCD, para a identificação de nutrientes em folhas de laranja. As espécies de interesse foram identificadas e a concentração relativa foi possível de ser determinada através da análise dos espectros obtidos. Para isso, 20 espectros foram coletados para cada amostra e cada espectro era composto por 100 pulsos de laser acumulados. A média das intensidades das linhas de emissão dos elementos dos 20 espectros foram considerados como sendo proporcional à concentração do elemento na amostra.

Em 2015, Guerra et al.<sup>48</sup> propuseram um novo protocolo analítico para a determinação direta de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, B e Si em folhas de cana-de-açúcar. O procedimento consiste em analisar 15 fragmentos (9 mm x 9 mm) por terço médio foliar, amostrando 3 linhas igualmente espaçadas com 48 pulsos acumulados do laser (Nd:YAG 1064 nm, 5 ns, 10 Hz, 50 J cm<sup>-2</sup>) perpendiculares à nervura central. A validação cruzada foi realizada com EDXRF e as frações de massa previstas para P, K, Ca, Fe, Mn e Si apresentaram coeficientes de correlação linear de até 0,9778.

Em 2017, Ranulfi et al.<sup>76</sup> utilizaram LIBS para identificar as mudanças nutricionais provocadas pela doença *Huanglongbing* (HLB) em folhas de citrus e associar o perfil de composição mineral com o status nutricional. Foram avaliadas folhas de árvores de citrus saudáveis, com HLB sintomática e com HLB assintomática, identificadas por inspeção visual. Para isso, foi empregado um sistema LIBS comercial, o LIBS2500, equipado com um laser de

Nd:YAG (1064 nm, 8 ns, 75 mJ por pulso, 10 Hz) e sete espectrômetros de alta resolução (189 – 966 nm) com detector CCD. Ca, Mg e K foram os nutrientes que apresentaram maiores variações e, por isso, foram escolhidos. Considerando-se as mudanças no perfil nutricional, a classificação foi realizada via regressão combinada com PLSR, resultando em 73 % de exatidão para distinguir as três categorias de folhas.

Mais recentemente, em 2018, Jull et al.<sup>77</sup> avaliaram a viabilidade de LIBS ser usado na análise de folhas frescas de pastagem e na forma de pastilhas. Para isso, foi empregado um sistema LIBS constituído por laser de Nd:YAG (1064 nm, 7 ns, 100 mJ por pulso, 450  $\mu$ m, 1,27  $\mu$ s de atraso e 1 ms de integração) e um arranjo de seis espectrômetros (182,26 – 908,07 nm). O método de regressão parcial dos mínimos quadrados (PLS, do inglês *Partial Least Squares*) foi usado para construir modelos para macro- (N, P, K, S, Ca e Mg), micronutrientes (Fe, Mn, Zn, Cu e B) e Na. Os melhores resultados foram obtidos para K, Na e Mn que apresentaram coeficientes de correlação linear de 0,92, 0,93 e 0,90, respectivamente.

Por outro lado, um dos primeiros trabalhos sobre análise direta de folhas por EDXRF foi publicado em 1992: Frank et al.<sup>78</sup> propuseram um método de análise direta e simultâneo para determinações quantitativas de macro- (P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes ((Fe, Cu, Mn e Zn) em folhas secas de milho por EDXRF. O objetivo do estudo foi comparar os resultados obtidos a partir da análise de discos de folhas não-moídas, discos de folhas moídas e amostras de folhas inteiras. Os resultados obtidos para os discos de folhas não moídas foram concordantes com os discos de folhas moídas. Os autores também destacam a influência da nervura central, que deve ser levada em consideração quando as frações de massa estão próximas aos níveis críticos.

Em 2007, Blonski et al.<sup>79</sup> avaliaram os efeitos da fumagina, doença causada pelo fungo *Capnodium citri*, na composição elementar de folhas de citrus. Amostras *in natura* e pastilhas do material cominuído, com e sem ácido bórico, foram analisadas por um equipamento de bancada. Informações qualitativas de K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn foram obtidas nas análises de amostras *in natura*. Mn, Fe, Cu e Zn foram quantificados e as concentrações obtidas para Fe variaram de 44 a 192  $\mu$ g g<sup>-1</sup> em folhas saudáveis e de 363 a 704  $\mu$ g g<sup>-1</sup> em folhas de citrus infectadas por fumagina.

Em 2012, McLaren et al.<sup>80</sup> avaliaram a aplicabilidade do equipamento portátil de EDXRF (PXRF, do inglês *Portable X-Ray Fluorescence*) para determinação dos teores totais de elementos em quatro espécies de plantas de interesse econômico: milho, algodão, soja e

trigo. O efeito do tempo de varredura e do tamanho de partícula na qualidade dos dados obtidos também foram avaliados. Para isso, as amostras foram secas, moídas e as análises foram realizadas empregando o método do pó solto. O tempo de varredura foi avaliado entre 120 e 420 s. Para milho, algodão e soja foram observadas correlações lineares entre os resultados obtidos por PXRF e aqueles obtidos após digestão ácida e determinação por ICP OES para Si, P, S, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni e Zn.

Em 2014, Reidinger et al.<sup>81</sup> avaliaram um sistema PXRF para a determinação de Si e P em pastilhas preparadas a partir de folhas moídas de plantas da família das Poáceas (*D caespitosa*, *Lolium perene* e *Triticum aestivum*). A calibração foi baseada no preparo de padrões com metilcelulose sintética a fim de simular a matriz vegetal e materiais de referência certificados (CRMs) foram utilizados para avaliar a performance do equipamento. Foram obtidas curvas de calibração de 2,5 a 20 g kg<sup>-1</sup> para o P e de 5 a 1000 g kg<sup>-1</sup> para o Si, empregando atmosfera de He a fim de minimizar a atenuação dos fótons de raios X de baixa energia do Si e do P pelo ar. Os limites de detecção foram estimados em 0,13 g kg<sup>-1</sup> para o P e 0,14 g kg<sup>-1</sup> para o Si. Os autores destacaram como vantagens a exatidão, a precisão e a alta frequência analítica do método proposto, sendo possível analisar 200 amostras por dia, além de requerer uma pequena massa de amostra e ser um método não-destrutivo.

Guerra et al.<sup>82</sup> compararam a performance analítica de um espectrômetro de bancada e um sistema portátil de EDXRF para a determinação direta de Si, P, S, K, Ca, Mn e Fe em pastilhas de folhas de cana-de-açúcar moídas criogenicamente. Foram analisadas 23 variedades de cana-de-açúcar. Ambos os equipamentos apresentaram limites de detecção apropriados para todos os analitos de interesse, sendo adequado para a avaliação do status nutricional da cultura da cana-de-açúcar. Os autores ainda destacam que o sistema portátil é uma alternativa atraente para análises *in situ*, com performance equivalente ao equipamento de bancada.

Tighe e Forster<sup>83</sup> empregaram um sistema PXRF para determinar a composição elementar de amostras de resíduo vegetal coletado debaixo de vegetação lenhosa perene. As amostras foram lavadas, secas e moídas previamente às análises. Ca e K foram determinados com precisão devido às altas frações de massa e ao alto número atômico, quando comparados aos outros elementos de interesse como Na, Mg, Al, P, S, Mn e Fe.

Em 2015, Guerra et al.<sup>48</sup> empregaram um EDXRF de bancada para a validação cruzada de um novo protocolo analítico para determinação de macro-, micronutrientes e Si, em folhas de cana-de-açúcar empregando LIBS. Como descrito anteriormente, as frações de

massa previstas para P, K, Ca, Fe, Mn e Si apresentaram coeficientes de correlação linear de até 0,9778.

Em 2016, Towett et al.<sup>84</sup> investigaram três formas diferentes de apresentação de amostra para análise de material vegetal por PXRF: i) a análise direta da superfície da amostra sob vácuo; ii) o uso de um copo de amostra selado por uma janela de filme fino com Prolene® e iii) análise sob pressão atmosférica. Os resultados obtidos mostram que a análise direta da superfície da amostra sob vácuo apresenta maior sensibilidade e precisão, principalmente para os elementos de baixo número atômico. S, K e Ca podem ser determinados sem o uso de vácuo, entretanto os limites de detecção podem ser comprometidos. Para finalizar, os autores afirmam que a precisão e a sensibilidade são dependentes não só das condições de operação e formas de apresentação da amostra, mas também das configurações, marca e modelo do equipamento.

Dao et al.<sup>85</sup> avaliaram o uso de um sistema PXRF para analisar diretamente folhas frescas de milho, cultivadas em solos adubados com P de origem mineral e P de origem animal. Nesse estudo, as folhas superiores das plantas foram analisadas em atmosfera de hélio. Boas correlações ( $r^2 \geq 0,918$ ) foram observadas entre as intensidades de emissão da linha de P K $\alpha$  (normalizadas pela linha de espalhamento Ag L $\alpha$ ) e as frações de massa correspondentes.

Guerra et al.<sup>49</sup> empregaram um sistema PXRF para determinação *in situ* de K, Ca, S e Si em folhas de cana-de-açúcar. Foram analisados 20 fragmentos de folhas frescas de 10 variedades de cana-de-açúcar, sendo 2 medidas por fragmento. Os resultados obtidos foram concordantes com aqueles obtidos por um método validado. Os coeficientes de correlação linear variaram de 0,9575 para Ca a 0,9851 para Si. Os limites de detecção estimados foram pelo menos 2 vezes menores que os níveis críticos desses nutrientes para a cana-de-açúcar.

Carvalho et al.<sup>45</sup> fizeram uma revisão sobre aplicações recentes de LIBS e EDXRF em análises de plantas. Nesta revisão são apresentados 18 trabalhos que utilizaram LIBS para determinar quantitativamente macro- (Ca, Mg, K, P, S, N) e micronutrientes (Fe, Mn, B, Cu, Zn), além de elementos benéficos (Si), potencialmente tóxicos (Cr, Pb, Ba) e outros (Na, Br, Cl, Rb, Sr), em tecidos foliares. Por outro lado, são apresentados 21 trabalhos que utilizaram XRF (EDXRF, WDXRF, PXRF, SRXRF e  $\mu$ -EDXRF) para determinar quantitativamente Al, As, Cd, Ce, Co, La, Mo, Ni, Hg, Ti e Zr, além dos elementos mencionados anteriormente. O método de preparo das amostras, assim como a

instrumentação, as estratégias de calibração e os limites de detecção também são apresentados.

Cabe aqui mencionar que, o Grupo de Espectrometria Atômica do CENA (GEA-CENA) vem trabalhando com LIBS desde 2007. Uma das principais linhas de pesquisa do grupo tem sido a análise de tecidos vegetais<sup>47; 48; 86; 87; 88; 89</sup> além de estratégias de calibração, otimização e validação<sup>90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97</sup>; e outras aplicações<sup>53; 98; 99; 100; 101; 102; 103</sup>. Em 2013, o grupo iniciou os trabalhos com EDXRF como técnica alternativa e complementar ao LIBS na análise de material vegetal<sup>45; 49; 82; 104</sup>.

Fazendo uma breve retrospectiva dos trabalhos do grupo com tecidos vegetais: em 2008, Trevizan et al. avaliaram um sistema LIBS, equipado com laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 200 mJ, 10 Hz) e um espectrômetro com óptica *Echelle* e detector *ICCD*, para a determinação de macronutrientes (P, K, Ca e Mg)<sup>86</sup> e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn)<sup>87</sup> em material vegetal. As amostras de folhas de diferentes espécies (*e.g.* café, milho, soja) e CRMs foram moídas criogenicamente e prensadas, sendo analisadas em forma de pastilhas. Os CRMs foram utilizados para a construção das curvas de calibração e os resultados obtidos por LIBS foram comparados aos valores obtidos por ICP OES após decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas. Os resultados obtidos por LIBS foram parcialmente concordantes com os resultados obtidos por ICP OES e isso foi atribuído à pequena massa amostrada, ao fato de os elementos de interesse não estarem homogeneamente distribuídos nas pastilhas e aos efeitos de matriz, *i.e.*, a ocorrência de vários fenômenos relacionados à forte influência da composição do material no processo de vaporização induzida pelo laser e na subsequente emissão do plasma. Os limites de detecção estimados foram considerados apropriados para análise de rotina de material vegetal.

A partir desses dois trabalhos, o grupo iniciou estudos mais aprofundados sobre estratégias de amostragem e calibração a fim de se obter melhores resultados e que estes fossem comparáveis àqueles obtidos pelo método de referência. Assim, Nunes et al.<sup>90; 92</sup> e Braga et al.<sup>91</sup> avaliaram métodos de otimização, calibração e validação uni- e multivariada para a determinação de macro- e micronutrientes em material vegetal empregando LIBS. Em seguida, foram realizados os seguintes estudos: i) avaliação dos métodos de moagem para o preparo de pastilhas para análise<sup>93</sup>; ii) avaliação do diâmetro de focalização e da fluência<sup>94</sup>; iii) avaliação da taxa de repetição e do número de pulsos<sup>95</sup>; iv) avaliação de uma nova estratégia de calibração<sup>96</sup>; v) determinação de Si em material vegetal<sup>47</sup>; vi) aplicação do  $\mu$ -EDXRF na análise de plantas<sup>104</sup>; vii) comparação do desempenho analítico dos equipamentos de EDXRF de bancada e portátil (PXRF)<sup>82</sup> e viii) avaliação da distribuição do tamanho de

partícula para análise de pastilhas por LIBS<sup>97</sup>, até chegar nas análises diretas: i) de material vegetal cominuído por *fs*-LIBS e *ns*-LIBS<sup>89</sup>; ii) de folhas de cana-de-açúcar por LIBS com validação cruzada por EDXRF<sup>48</sup>; iii) de folhas de cana-de-açúcar *in situ*, empregando PXRF<sup>49</sup> e iv) de folhas de soja por LIBS,  $\mu$ -EDXRF e PXRF, que é o trabalho descrito nesta tese. É importante ressaltar que a instrumentação empregada em todos os trabalhos do grupo foi a mesma, exceto para a análise direta de material vegetal por *fs*-LIBS.

## 2.6. Mapeamento microquímico empregando LIBS e EDXRF

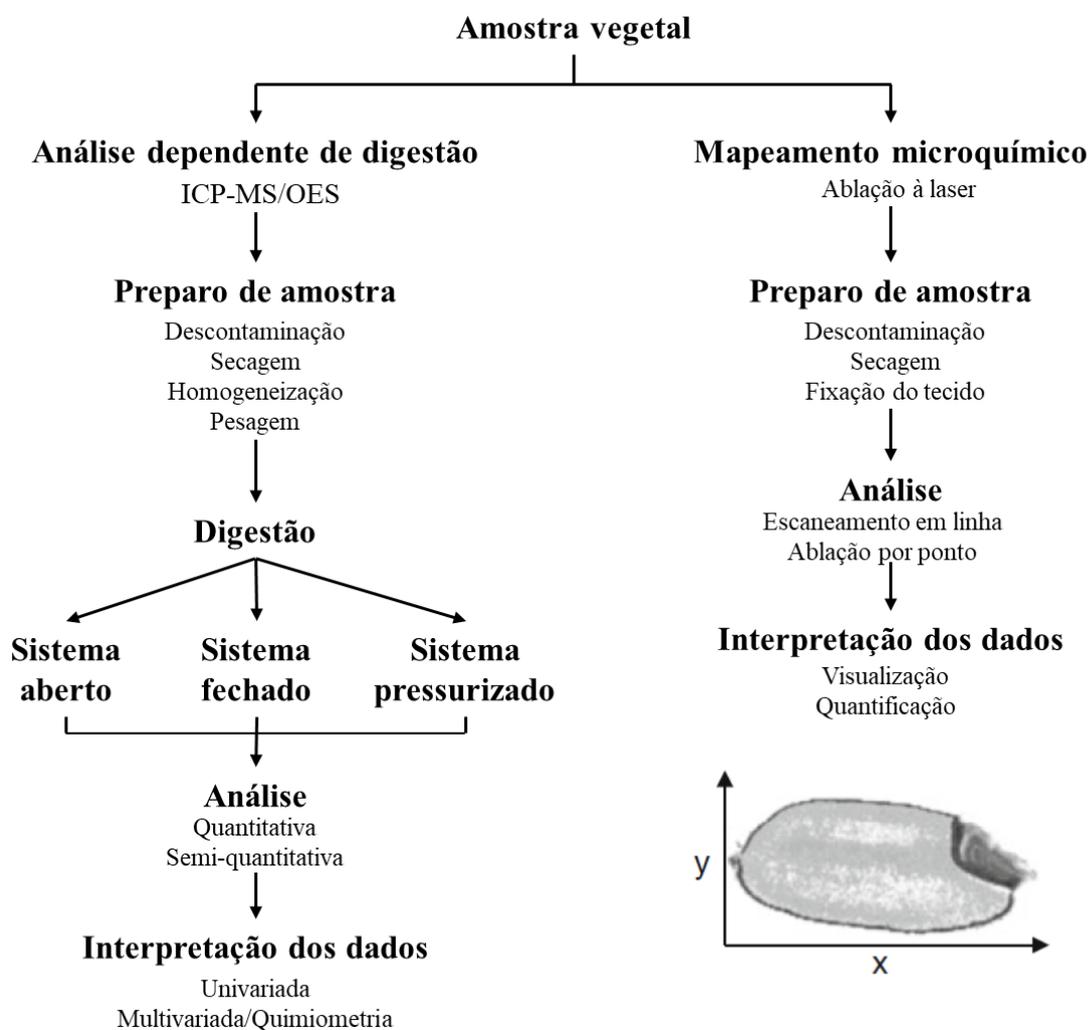
Além de possibilitarem a análise direta dos materiais vegetais, LIBS e EDXRF ainda permitem a avaliação da distribuição espacial elementar das amostras, ou seja, a construção de mapas microquímicos. A fim de ilustrar o fluxo de medições para a construção de mapas microquímicos multielementares de tecidos vegetais comparativamente às análises dependentes de digestão, a Figura 6 mostra um fluxograma para os dois tipos de análises: à esquerda do diagrama, o fluxo de medições que requerem a digestão prévia da amostra e à direita, o fluxo de medições para a construção dos mapas microquímicos de uma amostra *in situ*.

Para as análises dependentes de digestão, a amostra é inicialmente seca e homogeneizada, seguida pela digestão completa usando um agente fortemente oxidante e temperaturas elevadas, que podem ser alcançadas por uma variedade de fontes de energia (sistemas abertos em blocos digestores, fechados e ou pressurizados, assistidos por radiação micro-ondas). Em geral, uma amostra de material vegetal representativa consiste em 150 - 250 mg de material homogeneizado. Para avaliar a qualidade dos resultados obtidos, devem ser incluídos materiais de referência certificados, junto com um número adequado de brancos analíticos. Após a digestão e diluição, amostras, brancos e CRMs são tipicamente analisados empregando um conjunto de padrões de calibração externa, que permite a análise quantitativa dos elementos. A etapa final consiste na análise e interpretação dos resultados, que podem ser processados utilizando-se métodos estatísticos uni- e multivariados (quimiométricos)<sup>4; 65</sup>.

A primeira etapa para uma análise direta típica de mapeamento (LA-ICP-MS, LA-ICP OES, LIBS, EDXRF) envolve a amostragem e a descontaminação superficial do material. Em seguida, as amostras podem ser fixadas em uma lâmina de vidro para microscópio e liofilizadas ou apenas fixadas em um suporte apropriado. As amostras devem apresentar superfície plana, assim, grãos, raízes e caules, por exemplo, devem ser fatiados previamente às análises a fim de se obter uma superfície sem irregularidades. No caso das folhas, não há

necessidade de nenhum tipo de preparo, ela precisa apenas estar plana e ser fixada para não se mover durante a análise. As amostras são posicionadas na câmara de ablação (LA-ICP-MS, LA- ICP OES) ou no porta-amostras (LIBS, EDXRF), onde a microamostragem ocorre. Um grande volume de dados é gerado nesse tipo de análise, uma vez que para cada ponto de amostragem um espectro completo é coletado. Esses dados são tipicamente organizados em planilhas e podem ser classificados ou visualizados usando macros especializadas ou pacotes de software dedicados<sup>65</sup>.

Figura 6 – Diagrama de fluxo esquemático ilustrando o passo-a-passo das análises multielementares de tecido vegetal por ICP-MS/OES. Parte direita inferior: distribuição elementar relativa de fósforo em um grão de arroz analisado por LA-ICP-MS. (Figura adaptada de Hansen et al.<sup>65</sup>)



LIBS tem sido uma alternativa interessante na construção de mapas micro-químicos para avaliar a distribuição elementar em amostras de tecidos vegetais por permitir análises em

profundidade e apresentar alta resolução espacial, ou resolução lateral, que é influenciada: i) pelo diâmetro de focalização do laser sobre as amostras; ii) pela energia do pulso do laser; iii) pela duração do pulso do laser; iv) pelas propriedades do material amostrado e v) pelo tipo e pressão parcial do gás da atmosfera circundante. Se for empregada baixa energia, pulso de curta duração (ps, fs) ou curto comprimento de onda, crateras de ablação com micrômetros de resolução lateral e nanômetros de profundidade podem ser produzidas<sup>26</sup>.

O primeiro trabalho empregando LIBS para a construção de um mapa microquímico foi realizado por Samek et al.<sup>105</sup>. Neste trabalho, um sistema LIBS constituído por um laser de Ti:sapphire (795 nm, 10 Hz, 160 fs, 0,1 mJ por pulso) foi empregado. Os autores avaliaram a distribuição de Fe em folhas frescas de vime vermelho (*Cornus Stolonifera*) e folhas secas de milho. A nervura central também foi monitorada.

De forma semelhante, o grupo de pesquisa liderado pelo Professor Josef Kaiser, da Universidade de Brno na República Tcheca, vem trabalhando desde 2007 com mapeamento microquímico de tecidos vegetais empregando LIBS, LA-ICP-MS e XRF: i) Kaiser et al.<sup>106</sup> avaliaram a bioacumulação de metais potencialmente tóxicos, como Cd e Pb, em tecido vegetais; ii) Galiová et al.<sup>107</sup> avaliaram a influência do acúmulo de Pb na distribuição espacial do Mg em folhas de girassol (*Helianthus annuus*); iii) Kaiser et al.<sup>106</sup> monitoraram o acúmulo de Pb em folhas de alface; iv) Galiová et al.<sup>108</sup> avaliaram a distribuição espacial de Ag e Cu em folhas de girassol cultivadas em meio contendo contaminantes; v) Krizkova et al.<sup>109</sup> investigaram a acumulação de Ag nas folhas, caule e raiz de girassol; vi) Kaiser et al.<sup>110</sup> avaliaram a distribuição de Pb, Mg e Cu em folhas de girassol; vii) Kristofova et al.<sup>111</sup> monitoraram P em folhas de girassol e alface e viii) Galiová et al.<sup>112</sup> avaliaram a distribuição espacial de Pb, Mn e K em folhas de pimentão (*Capsicum annuum L.*).

Além desses, Ohta et al.<sup>113</sup> monitoraram os teores de macro- e micronutrientes em folhas de tangerina e azaleia. No artigo de revisão de Santos *et al.*<sup>27</sup> estão listados trabalhos que empregam LIBS para mapeamento de raízes, caules e outros materiais vegetais, além da instrumentação e condições experimentais empregadas nos trabalhos citados acima.

Na literatura, há vários trabalhos empregando a micro-fluorescência de raios X ( $\mu$ -EDXRF) como ferramenta para a construção de mapas de distribuição elementar de diferentes matrizes vegetais. A Tabela 2 apresenta algumas aplicações mais recentes de mapeamento microquímico de amostras foliares empregando a  $\mu$ -EDXRF com fonte de radiação síncrotron.

Tabela 2 – Mapeamento microquímico de amostras foliares empregando a espectrometria de  $\mu$ -EDXRF com fonte de radiação síncrotron

Matrix	Analitos	Diâmetro do feixe ( $\mu\text{m}$ )	Preparo de amostra	Objetivo	Mapeamento	Referências
Folhas de plantas hiperacumuladoras de Cd	Ca, Mn, Zn, Cd	3,8 x 1,3	Cortar, achatar e cobrir com filme Mylar®	Investigação do mecanismo de acúmulo de Cd	Qualitativo	114
Folhas de plantas híbridas ‘peach-almond’	Ca, K, Cl, S, Fe, Mn, Zn, Cu	100	Lavar, secar com papel absorvente e analisar fragmentos das folhas (3 x 3 mm)	Investigar os efeitos do suprimento de Fe nas mudanças do Fe e da clorofila	Qualitativo	115
Folhas de tomateiro	Fe, K, Ca, Cu, Ni, Zn, Br, Mn	20	Lavar e congelar em N <sub>2</sub> líquido; liofilizar sob vácuo e selecionar uma área de 2 mm <sup>2</sup> para analisar	Investigar a contribuição de diferentes quelatos naturais para aquisição de Fe, avaliar a fração de micronutrientes alocados a nível foliar	Qualitativo	116
Folhas e caules de plantas co-hipercumuladoras de Zn/Pb e hiperacumuladoras de Pb	P, K, Ca, S, Zn, Pb	3,5 x 5,5	Cortar e preparar um corte fino com criomicrotomo.	Investigar a distribuição espacial e especiação de Pb em uma planta hiperacumuladora de Pb	Qualitativo	117
Pecíolos foliares de girassol	Ca, K, Zn	2	Fazer cortes transversais de 100 $\mu\text{m}$ de espessura com um criomicrotomo e liofilizar	Avaliar a distribuição elementar e o transporte após a aplicação de diferentes formulações de Zn	Qualitativo	118
Folhas de plantas de pepino	Fe	20	Lavar, secar com papel de filtro e achatar entre dois discos de plástico. Imersão em nitrogênio líquido e liofilização sob vácuo. As folhas foram colocadas em um porta amostras oco de alumínio.	Investigar a dinâmica de acúmulo e distribuição do Fe dentro dos tecidos foliares de plantas de pepino deficientes em Fe	Quantitativo	119
Folhas de tomateiro	K, Ca, Fe, S, Sr, Br, Cl, Zn, Mn, Cu*	250 $\mu\text{m}$ e 650 $\mu\text{m}$	Lavar com água, achatar e secar.	Investigar a distribuição espacial de diversos elementos em raízes, caules, folhas e frutos da planta de <i>Solanum lycopersicum</i>	Qualitativo	120

\*Foi utilizado um equipamento de bancada.

## 2.7. Outros métodos de análise direta *in situ* e *in vivo*

Além de LIBS e EDXRF, a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente empregando ablação a laser (LA-ICP-MS) apresenta características muito interessantes do ponto de vista analítico tanto para a determinação direta de nutrientes em tecido vegetal quanto para o mapeamento microquímico. Além de ser uma técnica que permite análises multielementares e isotópicas, apresenta excelentes limites de detecção e boa resolução espacial.<sup>121; 122</sup>

Procedimentos analíticos que empregam o método da fluorescência da *clorofila a* foram desenvolvidos recentemente visando diagnosticar deficiências de manganês<sup>123</sup> e fósforo<sup>124</sup> em cevada (*Hordeum vulgare L.*). Este método é baseado nas medidas de sinais transientes de fluorescência da *clorofila a* e permite a análise direta, não-destrutiva, em tempo real e *in situ* do estado nutricional de plantas. Os resultados obtidos mostram que o método foi apropriado para a determinação desses nutrientes em poucos minutos, sendo suficientemente sensível e específico para cada nutriente.

Recentemente, Marie van Maarschalkerweerd e Søren Husted<sup>125</sup> fizeram um artigo de revisão em que são apresentadas as técnicas espectroscópicas mais utilizadas para análises de material vegetal, o preparo de amostras e o estado da arte de cada uma delas.

### 3. OBJETIVOS

Esta tese de doutorado teve como objetivo geral a análise direta de folhas de soja por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) e por espectrometria de fluorescência de raios X dispersiva em energia (EDXRF), visando à determinação de macro- (P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Zn e B) para diagnose foliar.

Em uma primeira etapa, mapas de distribuição elementar foram construídos empregando-se  $\mu$ -EDXRF e LIBS a fim de avaliar a distribuição espacial dos nutrientes nas folhas de soja para definir estratégias de amostragem mais apropriadas para diagnose.

Em uma segunda etapa, folhas de soja frescas foram analisadas por EDXRF, empregando-se um equipamento portátil, a fim de avaliar o estado nutricional das plantas. Nesta etapa, ferramentas quimiométricas de classificação, tais como PCA e SIMCA foram empregadas com o objetivo de separar as amostras analisadas em dois grupos: i) tratamento controle e ii) com deficiência induzida de P.

Posteriormente, foram realizados experimentos de prova de conceito com o objetivo de se comprovar a viabilidade prática das análises de folhas frescas de soja por LIBS visando à diagnose foliar.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Descrição das amostras**

#### **4.1.1. Coleta de amostras de experimentos em casa de vegetação**

Inicialmente, amostras de folhas de soja foram gentilmente cedidas por alunos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do CENA. As plantas foram cultivadas em condições experimentais de casa de vegetação, em vasos de polipropileno revestidos com sacos plásticos e preenchidos com 3 kg de solo. A caracterização física e química do solo e as correções necessárias foram realizadas previamente ao plantio. As cultivares semeadas foram a BRS 183 e BRS Tianá e os tratamentos divididos em 2 níveis de fósforo, alto e baixo. As plantas foram irrigadas diariamente com água deionizada, mantendo a umidade do solo em aproximadamente 70 % da capacidade máxima de retenção de água durante todo o desenvolvimento do experimento. A temperatura e a umidade relativa do ar média durante o período experimental foram de 32 °C e 75 %, respectivamente.

#### **4.1.2. Cultivo de soja em casa de vegetação**

##### **4.1.2.1. Hidroponia**

O cultivo de soja em sistema hidropônico foi realizado em condições de casa de vegetação no período de novembro de 2016 a fevereiro de 2017. A temperatura e a umidade relativa do ar médias durante o período experimental na cidade de Piracicaba foram de 25 °C e 76 % (Apêndice A), respectivamente. Foram utilizadas sementes de soja das cultivares RK7214 IPRO e M6210 IPRO.

As sementes foram dispostas em bandejas contendo vermiculita, umedecidas com solução de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ CaSO}_4$ , transferindo-se as plantas emergidas com cerca de 5 cm de altura para bandeja de 40 L contendo solução nutritiva<sup>126</sup> completa e diluída 1 + 4 com água (também denominada “solução de adaptação”), de modo a agravar as carências nutricionais, considerando a contribuição das reservas da semente (dados não apresentados). Após uma semana, as plantas foram transferidas para vasos plásticos (capacidade para 2,5 L) contendo soluções nutritivas (2,0 L – 100% da força iônica) adequadas para cada tratamento: controle (solução nutritiva completa) e com deficiência induzida de P (solução nutritiva sem P). As plantas foram fixadas na região do colo com espuma de plástico e mantidas sob aeração constante. O pH da solução nutritiva foi ajustado para  $6,0 \pm 0,5$ , quando necessário, empregando-se para este fim soluções de  $1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$  e  $1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ . A solução nutritiva foi preparada a partir da solução completa de Hoagland e Arnon (1950)<sup>127</sup> e

modificada para atender ao tratamento com deficiência induzida de P. A Tabela 3 apresenta o volume utilizado para o preparo da solução nutritiva para os tratamentos: controle e deficiência induzida de P.

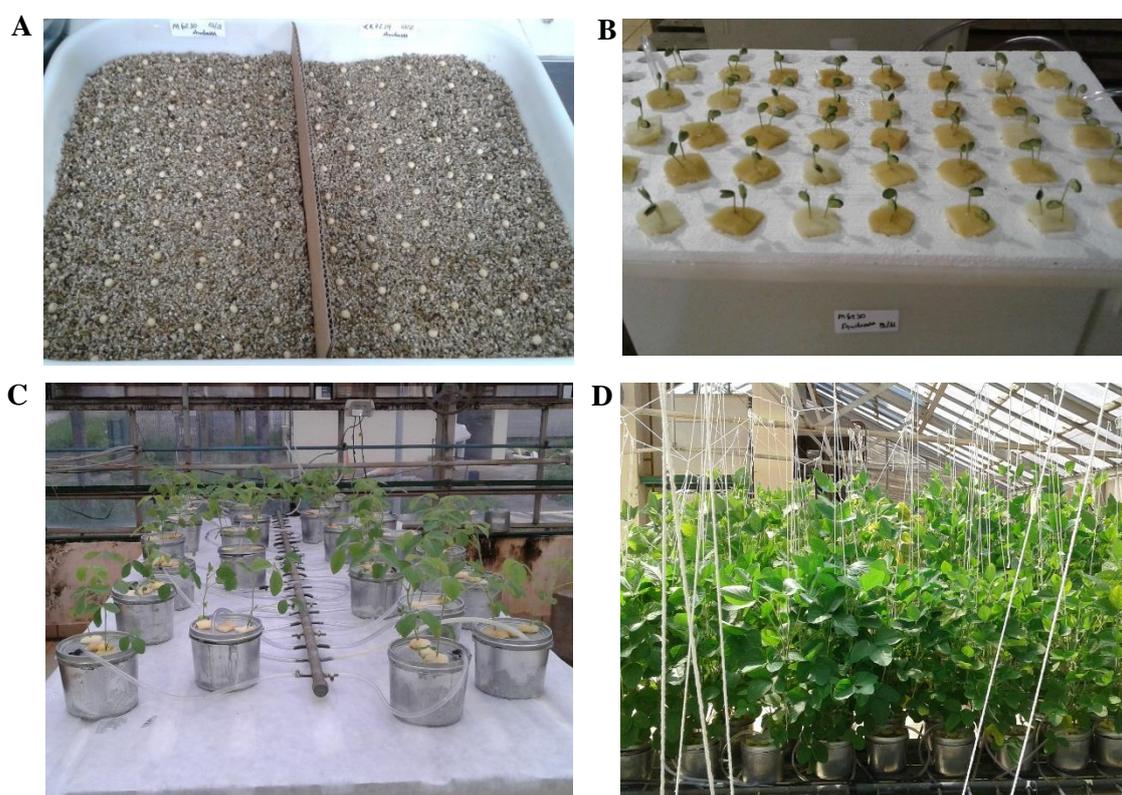
Tabela 3 – Volumes das soluções-estoque de macro- e micronutrientes empregados para o preparo das soluções nutritivas completa e com ausência de P

<b>Composição da solução nutritiva (mL L<sup>-1</sup>)</b>		
<b>Solução estoque</b>	<b>Tratamentos</b>	
	<b>Controle</b>	<b>Com deficiência induzida de P</b>
KNO <sub>3</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	6,0	6,0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O (1 mol L <sup>-1</sup> )	4,0	4,0
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	2,0	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	-	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (1 mol L <sup>-1</sup> )	2,0	2,0
Micronutrientes*	1,0	1,0
Fe-EDTA*	1,0	1,0

Fonte: Johnson et al. (1957) adaptado. \*Preparados segundo protocolos próprios do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do CENA/USP (vide APÊNDICE A).

Para esse cultivo foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo que as plantas das duas cultivares foram submetidas aos 2 tratamentos - controle e com deficiência induzida de fósforo - com 9 replicatas cada. Após 15 dias da primeira semeadura, foi realizada uma segunda semeadura, repetindo todo o procedimento descrito acima, e seguiu-se com o cultivo de ambas. Esse cuidado foi necessário para que houvesse plantas suficientes no estágio fenológico adequado para a diagnose (R1), quando as análises fossem realizadas. A Figura 7 mostra as etapas de cultivo da soja que foi realizado em sistema hidropônico, em condições de casa de vegetação.

Figura 7 – Fotos ilustrativas do cultivo da soja em sistema hidropônico, RK7214 IPRO e M6210 IPRO: em (A) a semeadura em vermiculita; em (B) a transferência para a solução de adaptação; em (C) a transferência para os vasos plásticos de 2,5 L, contendo as soluções nutritivas adequadas para cada tratamento; e em (D), as plantas já desenvolvidas, antes da coleta das folhas-diagnóstico para análise



#### 4.1.2.2. Solo

O cultivo da soja em solo foi realizado em condições de casa de vegetação no período de dezembro de 2017 a janeiro de 2018. A temperatura e a umidade relativa do ar média durante o período experimental na cidade de Piracicaba foram de 25 °C e 77 %, respectivamente (Apêndice A). As plantas foram cultivadas em vasos de polipropileno revestidos com sacos plásticos e preenchidos com 3 kg de solo. As caracterizações físicas e químicas do solo, e as correções necessárias, foram realizadas previamente ao plantio. A cultivar semeada foi a RK7214 IPRO. As plantas foram irrigadas diariamente com água deionizada, mantendo a umidade do solo em aproximadamente 70 % da capacidade máxima de retenção de água durante todo o desenvolvimento do experimento. Para esse cultivo foram dispostos 20 vasos sobre as bancadas com 2 plantas cada. A Figura 8 mostra uma foto ilustrativa do cultivo da soja em solo em casa de vegetação.

Figura 8 – Foto ilustrativa do cultivo da soja RK7214 IPRO em solo, em condições de casa de vegetação, no período de dezembro de 2017 a fevereiro de 2018



#### 4.1.3. Coleta de amostras em campos experimentais da ESALQ

Amostras de folhas de soja frescas foram coletadas no campo experimental do Grupo de Extensão Pró-Hort do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ. As plantas foram cultivadas no período de novembro 2017 a janeiro de 2018. A temperatura e a umidade relativa do ar média durante o período experimental na cidade de Piracicaba foram de 25 °C e 77 %, respectivamente. A semeadura das cultivares BMX GARRA RR 2/STS e BMX POTÊNCIA RR foi realizada no mês de novembro de 2017, após o tratamento das sementes e adubação do solo (Apêndice A). A Figura 9 mostra a foto das cultivares plantadas no campo experimental.

Figura 9 – Fotos das cultivares de soja BMX GARRA RR 2/STS e BMX POTÊNCIA RR cultivadas no campo experimental do Grupo de Extensão Pró-Hort do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ, no período de novembro de 2017 a janeiro de 2018



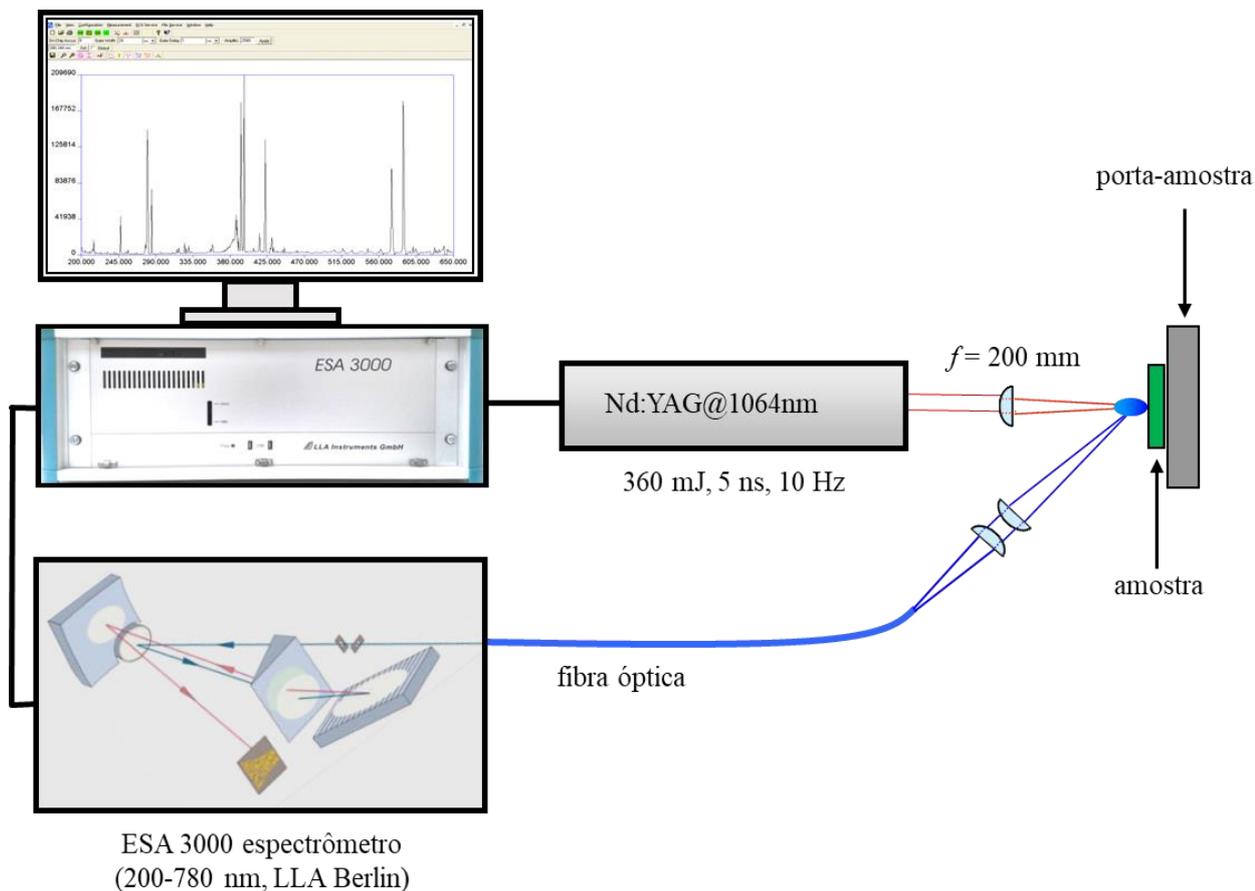
## 4.2. Instrumentação

### 4.2.1. LIBS

O sistema LIBS utilizado é constituído por um laser pulsado de Nd:YAG (*Brilliant*, Quantel, França) com taxa de repetição de até 10 Hz. Os pulsos de laser no comprimento de onda fundamental (1064 nm) apresentam 6 mm de diâmetro (fator de qualidade  $M^2 < 2$ ), energia máxima de  $360 \pm 3$  mJ e 5 ns de duração (*full width at half maximum* – FWHM). Para a focalização dos pulsos de laser na superfície das folhas, utilizou-se uma lente convergente plano-convexa de sílica fundida com diâmetro de 2,54 cm e distância focal de 200 mm (Newport, EUA), colocada à 50 cm de distância da abertura do laser. Para a coleta da radiação emitida pelo plasma, utilizou-se um telescópio composto de lentes de sílica fundida de 50 mm e 80 mm (LLA Instruments GmbH, Alemanha) acoplado à fenda de entrada de um espectrômetro com fibra óptica (1,5 m e 600  $\mu$ m de núcleo). O ângulo de coleta foi de 25° em relação ao eixo óptico do laser. O espectrômetro utilizado foi o ESA 3000 (LLA Instruments GmbH, Alemanha) equipado com óptica *Echelle* e detector *ICCD*

Kodak KAF 1001 de 1024 x 1024 pixels, com resolução de 5 pm em 200 nm a 19 pm em 780 nm. A Figura 10 mostra o arranjo experimental do sistema LIBS empregado nas análises.

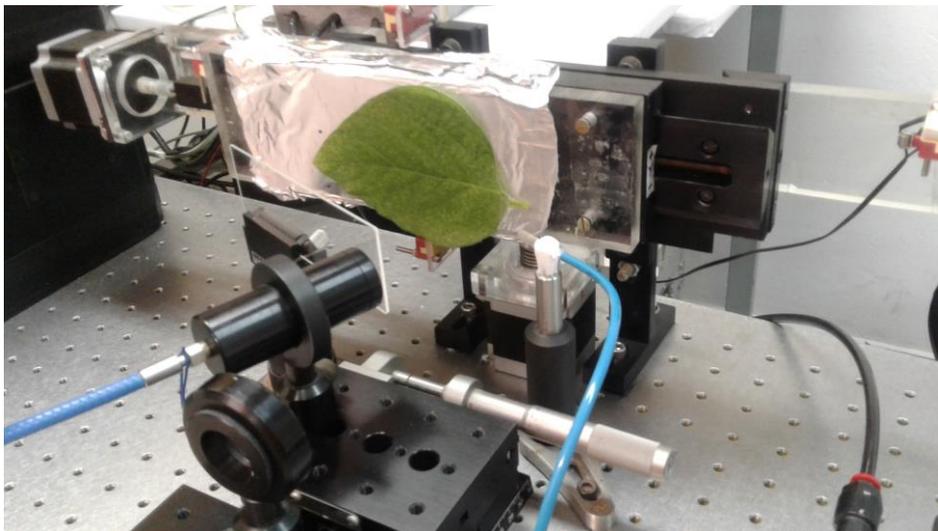
Figura 10 – Representação esquemática do arranjo experimental do sistema LIBS empregado nas análises



As amostras foram fixadas em um porta amostras automático (Figura 11), construído em laboratório, com estágios translacionais x-y que permite movimentos micrométricos precisos nos dois eixos do plano ortogonal ao pulso do laser incidente. O ar atmosférico na superfície da amostra foi deslocado por um fluxo de argônio de  $5,0 \text{ L min}^{-1}$  diretamente no ponto incidente do feixe.

O tratamento preliminar dos dados obtidos foi realizado pelo software ESAWIN 3.22 do mesmo fabricante (LLA Instruments GmbH, Alemanha), ativando a ferramenta de altura da fenda. A base de dados de linhas atômicas do *National Institute of Standards and Technology* (NIST)<sup>128</sup> e o Software MATLAB® (MathWorks, Inc., USA) foram empregados para análise dos dados obtidos.

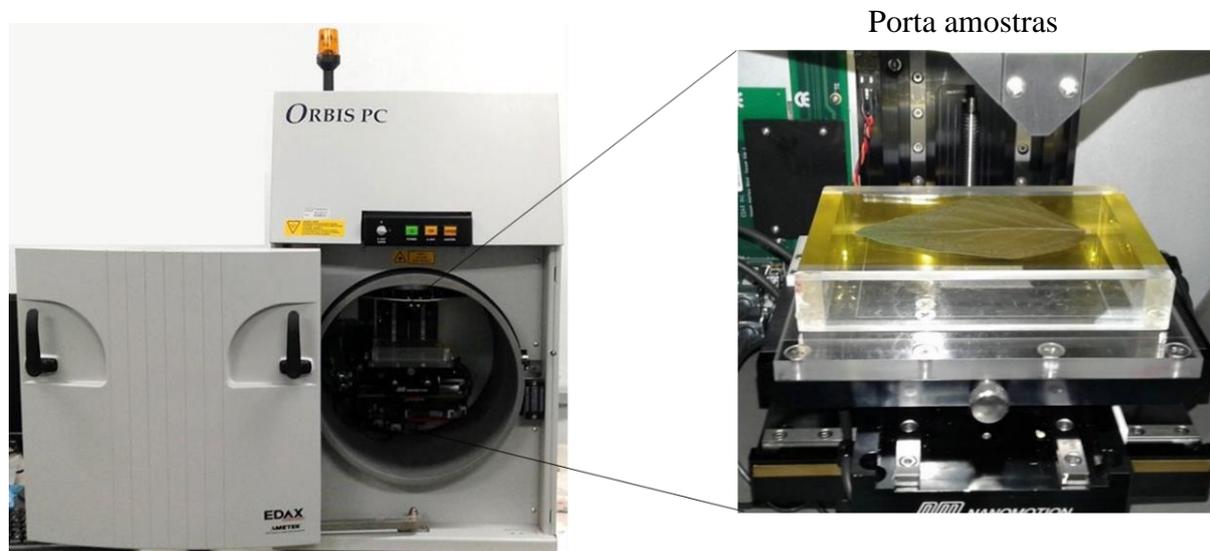
Figura 11 – Detalhe da amostra fixada no porta-amostras automático com estágios translacionais x-y



#### 4.2.2. $\mu$ -EDXRF

Para a construção dos mapas de distribuição elementar (mapas microquímicos) utilizou-se um espectrômetro de bancada ( $\mu$ -EDXRF Orbis PC, EDAX, EUA) equipado com tubo de raios X com alvo de Rh (50 kV, 50 W), colimador de feixe de raios X de 2 mm e detector por deriva de silício (Silicon Drift Detector - SDD) de 30 mm<sup>2</sup>, cuja resolução típica é de 140 eV FWHM na linha  $K\alpha$  do Mn 5,9 keV. As amostras foram suspensas em filme Kapton<sup>®</sup> fixado em um porta-amostras de acrílico de dimensões 145 x 100 x 23 mm, construído no laboratório para este fim. A Figura 12 mostra o espectrômetro de microfluorescência de raios X e o arranjo experimental empregado nas análises.

Figura 12 – Espectrômetro de micro-fluorescência de raios X (Orbis PC, EDAX) e, no detalhe, a amostra suspensa em filme Kapton® fixado ao porta-amostras



Os parâmetros instrumentais utilizados no equipamento, tais como: a diferença de potencial e a corrente aplicadas ao tubo foram 40 kV e 300  $\mu$ A, respectivamente; o tempo de irradiação por ponto foi avaliado entre 1 – 20 s.

O software ORBIS Vision (EDAX Inc.), versão 2.1, foi empregado para obtenção dos dados gerados. Para a construção dos mapas, empregou-se o software ORIGIN (OriginLab Corporation), versão 2016.

#### 4.2.3. EDXRF portátil

Para as medidas realizadas diretamente nas folhas frescas de soja, utilizou-se um equipamento portátil de EDXRF, modelo Tracer III-SD (Bruker, Alemanha) equipado com tubo de raios X com alvo de Rh, colimador de feixe elíptico de 4,5 mm de diâmetro e detector de 10 mm<sup>2</sup> XFlash® SDD, resfriado por um sistema Peltier e com resolução típica de 145 eV a 100.000 cps. O equipamento apresenta também um conjunto de 4 filtros: azul (1 mil<sup>1</sup> Ti), amarelo (12 mil Al + 1 mil Ti), vermelho (12 mil Al + 1 mil Ti + 1 mil Cu) e verde (12 mil Al + 1 mil Ti + 6 mil Cu), que podem ser empregados para melhorar a sensibilidade. Para as medidas feitas sob vácuo, foi necessário o acoplamento de uma bomba de vácuo (Marconi, Piracicaba) ao equipamento.

<sup>1</sup> mil = milésimo de polegada

#### 4.2.4. ICP OES

Para a análise das folhas pelo método de referência, empregou-se um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente iCAP 7400 Duo (Thermo Scientific™ Qtegra™) equipado com um kit de introdução de amostras aquosas: nebulizador de vidro concêntrico e uma câmara de nebulização de vidro ciclônica, tubo injetor de 2 mm, tubulação de bomba aquosa e mini-bomba peristáltica de 4 canais. O espectrômetro é equipado também com óptica *Echelle* simultânea, apresentando 52,91 ranhuras  $\text{mm}^{-1}$ , distância focal efetiva de 383 mm, resolução de 7 pm a 200 nm, faixa de comprimento de onda de 166 - 847 nm e detector Chip CID86 de estado sólido de alto desempenho.

O software Intelligent Scientific Data Solution™ (ISDS) da Thermo Scientific™ Qtegra™ foi empregado para a obtenção dos dados gerados e para a manipulação dos dados pós-análise.

#### 4.2.5. Moagem criogênica

As amostras de folhas de soja foram submetidas à cominuição previamente às análises pelo método de referência, quando necessário. Para isso, empregou-se moinho criogênico (SPEX Sample Prep., Freezer Mill 6870, USA), nitrogênio líquido (-196 °C) e um conjunto de moagem constituído por tubos de policarbonato, barra magnética e tampas de aço inoxidável. A Figura 13 mostra o equipamento utilizado para a moagem criogênica das amostras. Nesse equipamento é possível fazer a moagem de até quatro amostras, simultaneamente, em frascos com capacidade de até 2 g ou a moagem de apenas uma amostra em frasco com capacidade para até 100 g.

Figura 13 – Moinho criogênico e conjuntos de moagem utilizados na cominuição das amostras de folhas de soja



### 4.3. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico, água deionizada ultrapura (18,2M $\Omega$  cm de resistividade) produzida em um sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Merck Millipore, Alemanha) e o ácido nítrico foi purificado em sistema *sub-boiling* (Marconi, Piracicaba, Brasil). Os frascos e vidrarias utilizados foram lavados com detergente, enxaguados com água deionizada, descontaminados pela imersão em banho de HNO<sub>3</sub> (10 % v v<sup>-1</sup>) por 12 h e novamente enxaguados com água deionizada ultrapura. Soluções estoque 1000 mg L<sup>-1</sup> dos elementos analisados no âmbito desta tese foram utilizadas para o preparo de todas as soluções-padrão para obtenção das curvas de calibração para as determinações de Ca, Mg, K, P, S, Fe, Mn, Cu, Zn e B por ICP OES. Após a lavagem, os materiais foram secos a temperatura ambiente em capela de fluxo laminar horizontal (Pachane, Piracicaba, Brasil).

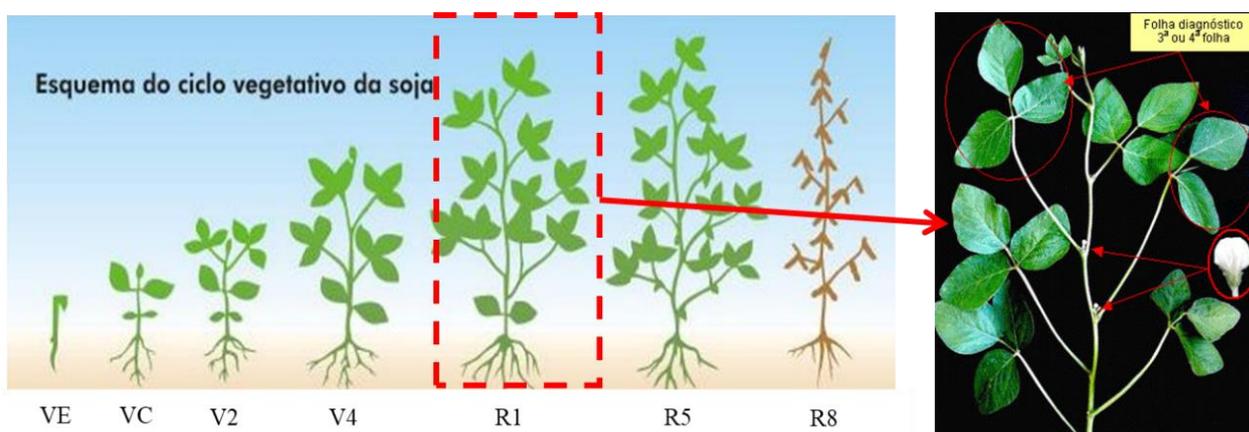
### 4.4. Métodos

#### 4.4.1. Coleta e preparo das amostras

A amostragem das folhas de soja, independentemente da forma de cultivo, foi realizada no início do florescimento – estágio fenológico R1 (45 a 60 dias após a semeadura), segundo escala fenológica da soja<sup>129</sup>. Seguindo a recomendação para a diagnose foliar, as folhas (os três folíolos, sem o pecíolo) recém-maduras, correspondentes às terceiras ou

quartas folhas a partir do ápice da haste principal, foram coletadas. Após a coleta, as folhas foram lavadas superficialmente com água deionizada e cuidadosamente secas com a ajuda de um papel absorvente macio, separadas, identificadas por folíolos (direito, esquerdo e do meio) e submetidas à análise no laboratório.

Figura 14 – Representação do ciclo vegetativo contendo fases mais importantes das plantas de soja e, no detalhe, as folhas-diagnóstico. (Figuras adaptadas de Embrapa Soja. Documentos 305<sup>130</sup>, <http://www.agrolink.com.br/culturas/soja/características>)



#### 4.4.2. LIBS

##### 4.4.2.1. Estudos iniciais – análise de folhas frescas

Os estudos iniciais com LIBS foram feitos com as amostras coletadas nos experimentos de casa de vegetação, conforme descrito em 4.1.1. Para essas análises, empregaram-se 25 pulsos acumulados do laser (Nd:YAG a 1064 nm, 5 ns, 5 Hz) no modo de varredura, em 4 linhas paralelas à nervura central, totalizando 100 pulsos do laser por folíolo e 300 pulsos por folha. O diâmetro de focalização foi fixado em 750  $\mu\text{m}$  e a fluência de 50  $\text{J cm}^{-2}$  foi empregada. Os tempos de integração e de atraso foram fixados em 2 e 5  $\mu\text{s}$ , respectivamente. As linhas de emissão monitoradas foram: Ca II 442,544 nm, Mg I 277,983 nm, P I 213,618 nm, Zn I 213,856 nm, B I 249,773 nm e Cu I 324,754 nm.

##### 4.4.2.2. Mapeamento de folhas de soja

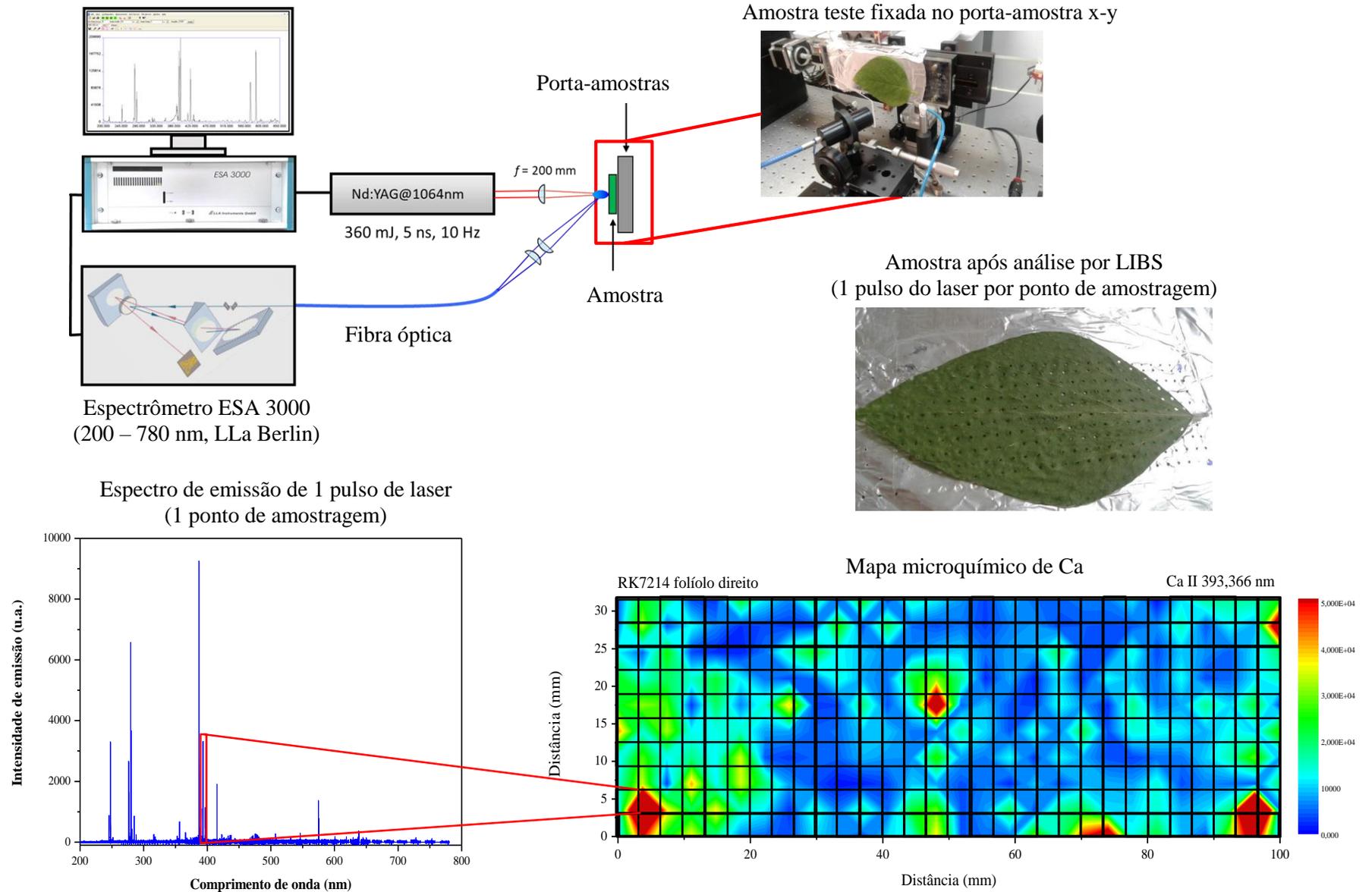
Para o mapeamento de folhas de soja empregando LIBS, utilizou-se amostras provenientes do cultivo em sistema hidropônico em casa de vegetação, conforme descrito em 4.1.2.1. Para esse tipo de análise, empregou-se 1 pulso do laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 10 Hz) por ponto, em uma matriz de mapeamento de 27 x 10 pontos. O

diâmetro de focalização foi fixado em 750  $\mu\text{m}$  e a fluência de 50  $\text{J cm}^{-2}$  foi empregada. Os tempos de integração e de atraso foram fixados em 2 e 5  $\mu\text{s}$ , respectivamente. As linhas de emissão monitoradas foram: Ca II 393,366 nm, Mg II 279,553 nm e Al I 394,401 nm. A Figura 15 apresenta a construção do mapa microquímico de Ca para um folíolo de soja.

#### **4.4.2.3. Análise direta de folhas frescas de soja**

Para análise direta das folhas frescas por LIBS, utilizou-se amostras cultivadas em solo, em condições de casa de vegetação, e amostras coletadas no campo experimental da ESALQ, conforme descrito nos itens 4.1.2.2 e 4.1.3. Previamente às análises, foram realizados estudos variando-se alguns parâmetros instrumentais, tais como a energia por pulso do laser, o número de pulsos acumulados por linha e o número de linhas. A partir desses estudos, definiu-se as seguintes condições: 25 pulsos acumulados por linha, a uma frequência de 5 Hz no modo de varredura, com velocidade de 10  $\text{mm s}^{-1}$ . Foram amostradas 12 linhas paralelas na parte central do folíolo (5 cm x 4 cm), totalizando 300 pontos de amostragem por folíolo. O diâmetro de focalização foi fixado em 750  $\mu\text{m}$  em todos os estudos. Os tempos de atraso e de integração foram fixados em 2 e 5  $\mu\text{s}$ , respectivamente. As linhas de emissão monitoradas foram: C I 247,856 nm, Ca II 315,887 nm, Mg I 285,213 nm, P I 213,618 nm, Fe II 261,187 nm, Fe II 259,940 nm, Mn II 257,610 nm, Cu I 327,396 nm, Si I 212,412, Zn II 206,200 nm e Al I 309,271 nm.

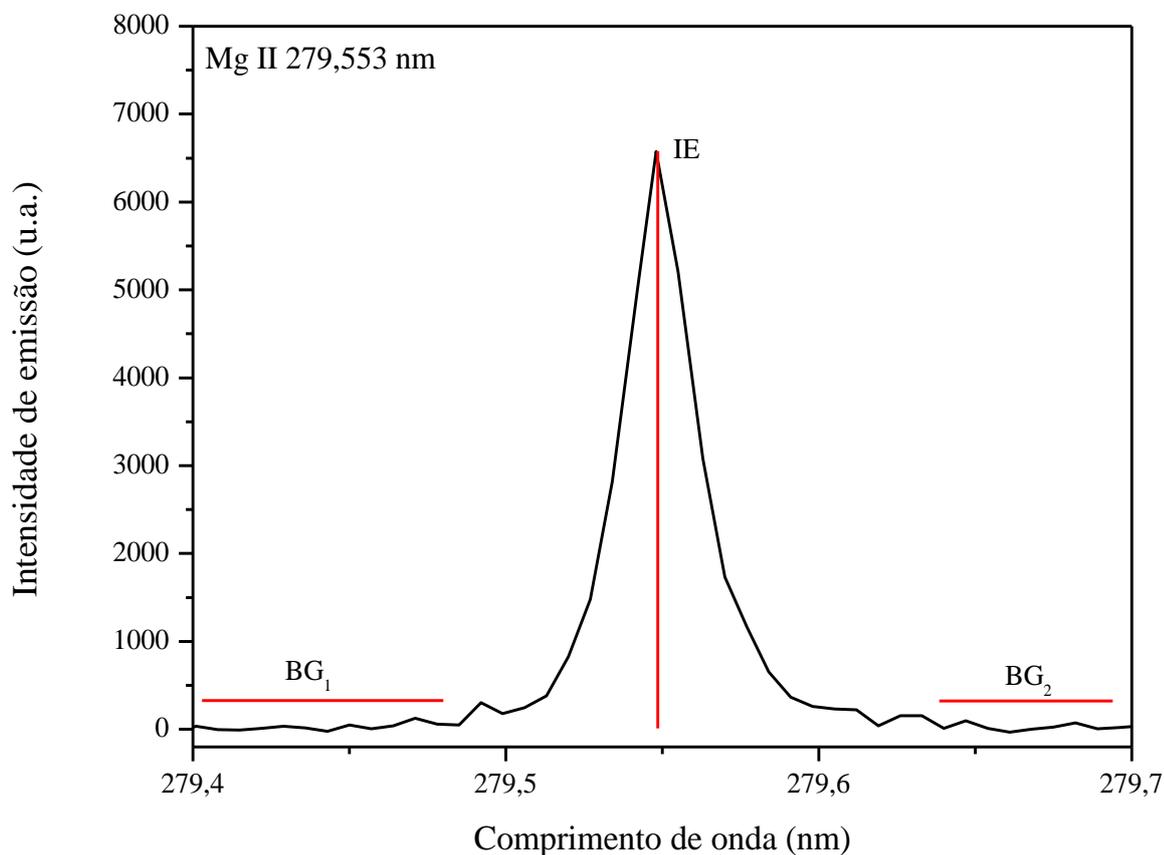
Figura 15 – Representação da construção de um mapa microquímico de cálcio para um folíolo de soja. Condições experimentais: 1 pulso,  $50 \text{ J cm}^{-2}$ ,  $750 \mu\text{m}$  de diâmetro,  $2,0 \mu\text{s}$  de atraso e  $5,0 \mu\text{s}$  de integração



#### 4.4.2.4. Tratamento dos dados obtidos

Para todos os experimentos realizados com LIBS, os dados foram tratados da mesma forma: realizou-se a correção dos sinais de emissão de fundo (background) e a área integrada dos picos foi utilizada como sinal analítico. Para isso, os sinais médios de emissão obtidos em regiões espectrais independentes localizados nas vizinhanças das linhas de emissão dos analitos ( $BG_1$  e  $BG_2$ ) foram subtraídos da intensidade máxima de cada linha de emissão (IE), conforme recomendado<sup>92</sup> e ilustrado para a linha de Mg II 279,553 nm.

Figura 16 – Fragmento do espectro de emissão mostrando a linha iônica do Mg II 279,553 nm. As linhas vermelhas ilustram a intensidade máxima de emissão e as regiões adjacentes do pico,  $BG_1$  e  $BG_2$ , que foram subtraídas. Condições experimentais: 1 pulso,  $50 \text{ J cm}^{-2}$ ,  $2,0 \mu\text{s}$  de atraso e  $5,0 \mu\text{s}$  de integração



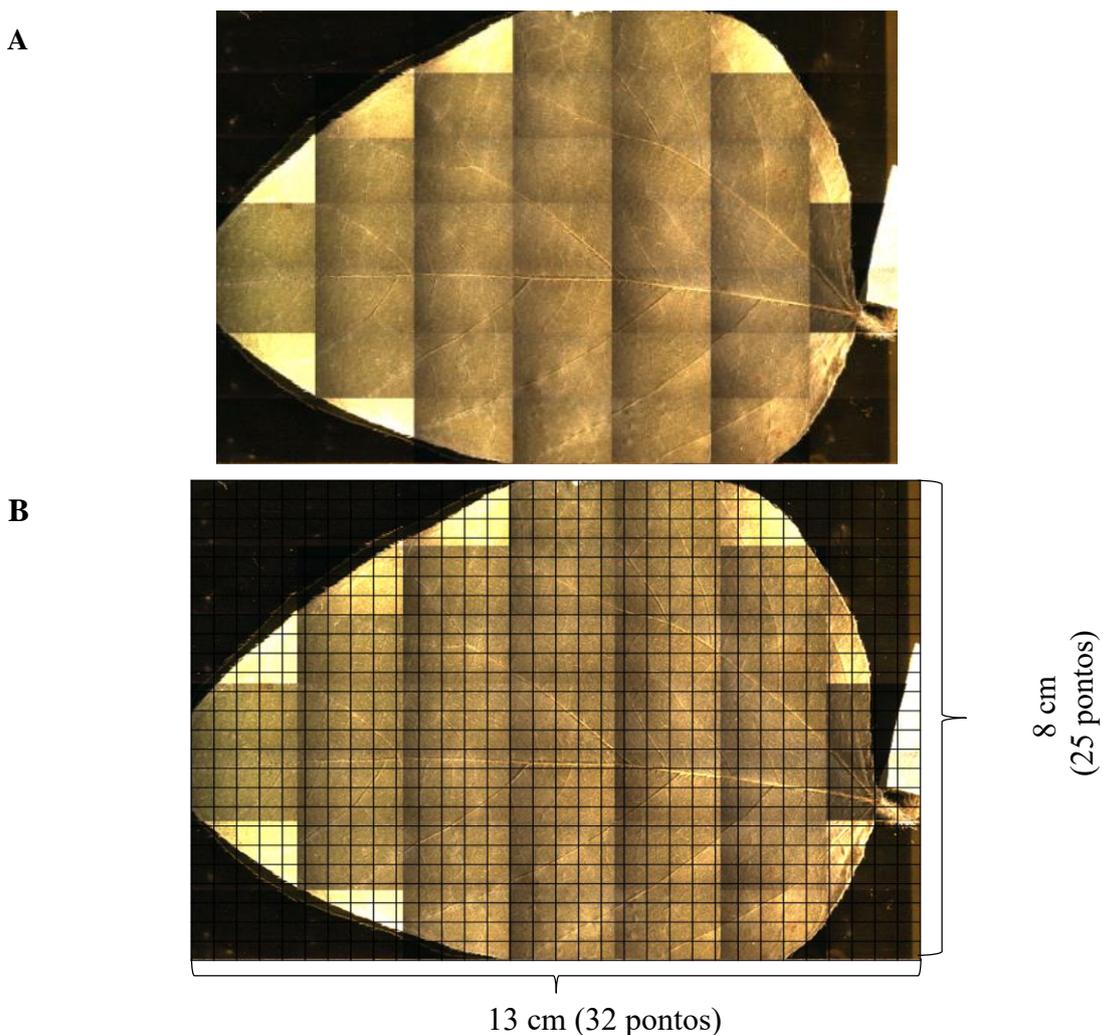
#### 4.4.3. Micro-EDXRF

##### 4.4.3.1. Mapeamento de folhas secas de soja

Para o mapeamento de folhas secas de soja empregando  $\mu$ -EDXRF, coletaram-se amostras de experimentos que estavam em andamento em casa de vegetação, conforme descrito no item 4.1.1. As amostras foram suspensas em filme Kapton<sup>®</sup>, fixado ao porta

amostras de acrílico, a fim de minimizar o ruído proveniente do espalhamento dos raios X, e submetidas à análise no equipamento descrito no item 4.2.2. As análises foram feitas empregando-se o colimador de feixe de raios X de 2 mm e a área mapeada foi definida de forma a mapear toda a superfície da amostra. A matriz de mapeamento e o tempo de irradiação por ponto foram avaliados a fim de se obter uma condição de compromisso entre resolução e tempo total de análise. Assim, definiu-se uma matriz de mapeamento de 32 x 25 pontos e fixaram-se 5 s de irradiação por ponto. A Figura 17 mostra um exemplo da área a ser mapeada e a determinação da matriz de mapeamento. As linhas de emissão de raios X monitoradas foram: Ca  $K\alpha$  3,69 keV, S  $K\alpha$  2,31 keV, P  $K\alpha$  2,01 keV e K  $K\alpha$  3,31 keV.

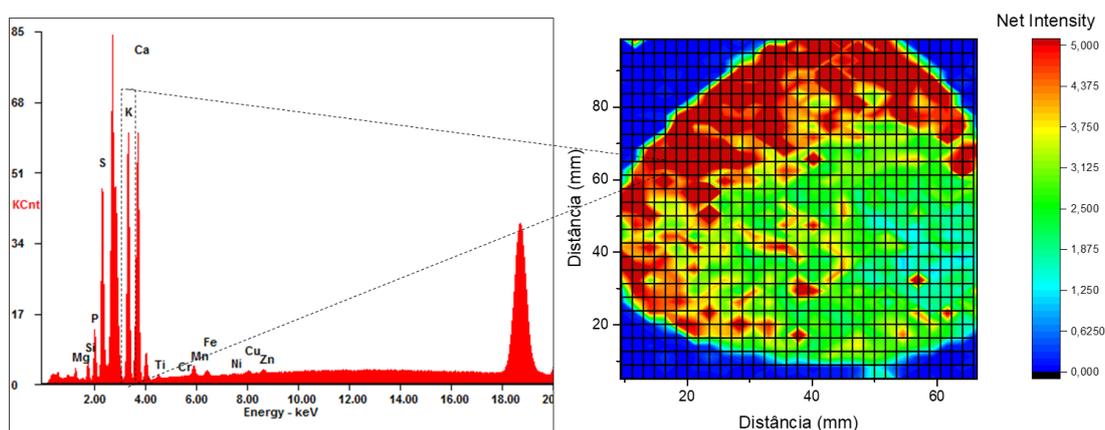
Figura 17 – Exemplo de determinação da área mapeada e da matriz de mapeamento para uma amostra de folha seca de soja. Em (A) imagem capturada pela câmera CCD do equipamento e em (B) representação da matriz de mapeamento 32 x 25 pontos, empregada nos experimentos



#### 4.4.3.2. Tratamento dos dados

Nos mapeamentos feitos por  $\mu$ -EDXRF, foram obtidas matrizes de dados com resultados em contagens por segundo. Para a obtenção desses, o software do equipamento emprega o método de deconvolução dos picos (sinais de emissão) e faz a correção dos dados pelo tempo de irradiação e corrente aplicada ao tubo. Esses dados foram então normalizados, ou seja, para cada um dos elementos de interesse os dados em contagem líquida foram divididos pelos dados obtidos para o Rh, correspondente ao espalhamento Compton. Após a normalização, construiu-se os mapas de cada um dos elementos de interesse. Um exemplo da construção dos mapas é apresentado na Figura 18.

Figura 18 – Representação da construção do mapa microquímico de K, a partir dos espectros obtidos em cada ponto da matriz de mapeamento 32 x 25 pontos de um folíolo de soja submetido à análise por  $\mu$ -EDXRF



#### 4.4.4. EDXRF - sistema portátil

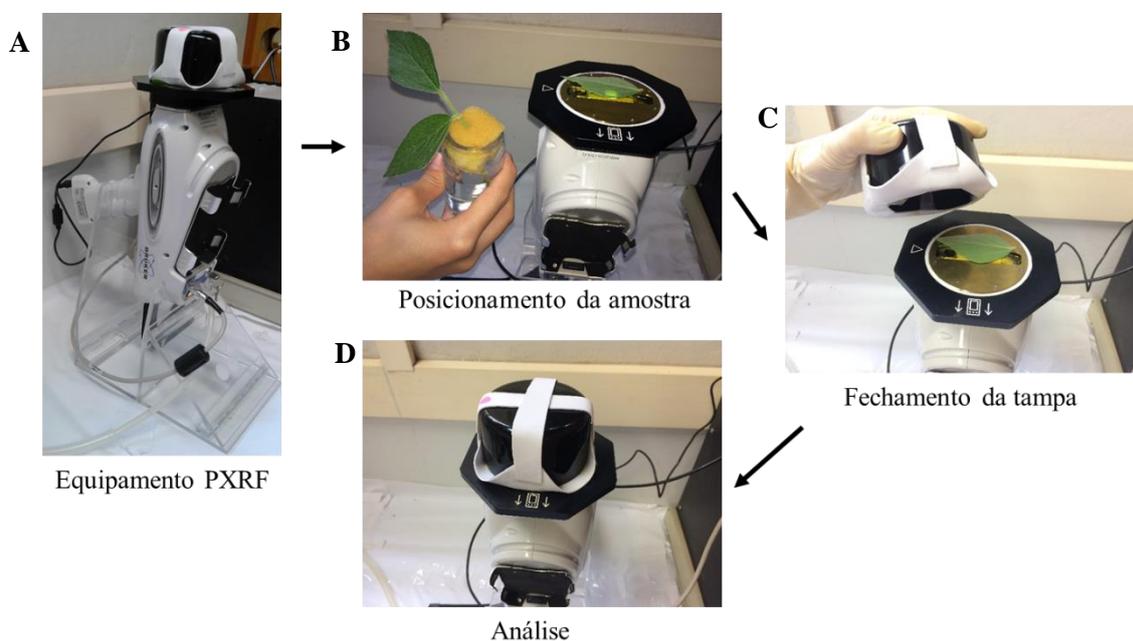
##### 4.4.4.1. Análise direta de folhas frescas de soja

Para análise direta de folhas frescas de soja empregando-se o equipamento portátil de EDXRF, utilizaram-se as amostras cultivadas em sistema hidropônico em condições de casa de vegetação, conforme descrito em 4.1.2.1. Após a coleta e preparo mínimo, manteve-se cada uma das amostras em um frasco com água, de forma que o pecíolo ficasse submerso, evitando-se assim a desidratação antes da análise. No momento da análise, cada folíolo foi destacado do trifólio, pesado e devidamente posicionado sobre a abertura do equipamento. A Figura 19 mostra as etapas e o posicionamento da amostra no equipamento portátil de EDXRF para análise. A fim de determinar as melhores condições experimentais, foram realizados estudos variando-se os seguintes parâmetros instrumentais: tempo de irradiação,

diferença de potencial e corrente aplicadas ao tubo de raios X. Foram avaliados também o uso de filtros, a atmosfera de análise e a face da folha que seria investigada, adaxial (parte superior) ou abaxial (parte inferior).

Assim, as condições experimentais definidas nesses estudos foram: 45 kV e 30  $\mu$ A de tensão e corrente, respectivamente; 40 s de irradiação por ponto; análises realizadas sem filtros e sob vácuo, sendo a superfície adaxial escolhida para análise.

Figura 19 – Representação das análises realizadas empregando o equipamento de EDXRF portátil: em (A) o equipamento posicionado no suporte sobre a bancada; em (B) o folíolo a ser analisado é destacado do trifólio e posicionado sobre a abertura em que os raios X serão incididos; em (C) é feito o fechamento da tampa de proteção e, em (D) a análise é iniciada



#### 4.4.4.2. Tratamento dos dados obtidos

Os dados obtidos nas análises empregando o equipamento portátil de EDXRF foram tratados pelo método de deconvolução Bayesiana dos picos<sup>131</sup>. Para isso, utilizaram-se os softwares S1PXRF e ARTAX da BRUKER. As linhas de emissão de raios X monitoradas foram Si K $\alpha$  1,74 keV, P K $\alpha$  2,01 keV, S K $\alpha$  2,31 keV, K K $\alpha$  3,31 keV, Ca K $\alpha$  3,69 keV, Mn K $\alpha$  5,9 keV, Fe K $\alpha$  6,4 keV, Cu K $\alpha$  8,04 keV, Zn K $\alpha$  8,64 keV. Após a deconvolução, os dados obtidos em contagens líquidas foram corrigidos pelo tempo real de análise (real time) e pela corrente aplicada ao tubo de raios X (30  $\mu$ A). Os dados corrigidos (cps  $\mu$ A<sup>-1</sup>) foram utilizados nas análises quimiométricas.

Os métodos quimiométricos, aplicados aos resultados obtidos com equipamento portátil de EDXRF, foram a análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) e a modelagem independente por analogia de classes (SIMCA, do inglês *Soft Independent Modeling by Class Analogy*).

PCA tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta útil e versátil na análise dos dados obtidos por LIBS e EDXRF. Essa ferramenta tem sido empregada para visualização, classificação, regressão (PCR), seleção de variáveis, redução de dimensionalidade, identificação de *outliers* e mapeamento multivariado. As aplicações são realizadas nas mais diversas áreas, tais como: arqueologia, forense, biologia, geologia, farmacêutica, polímeros, metais e materiais explosivos, químicos e nucleares.<sup>25</sup>

A ideia central da análise de componentes principais é reduzir a dimensão de um conjunto de dados que consiste em um grande número de variáveis, mantendo o máximo possível da variação presente neste conjunto. Isto é conseguido através da transformação para um novo conjunto de variáveis, as componentes principais (PCs), que não são correlacionadas entre si, e que são ordenadas de forma a reter nas primeiras componentes a maior parte da variação presente em todas as variáveis originais.<sup>132</sup> A primeira componente principal é aquela situada na direção de maior variação dos dados; a segunda é ortogonal à primeira e em uma direção que também abrange a maior variação nos dados, e assim sucessivamente. Cada amostra é representada por um ponto no espaço multidimensional em que é possível se extrair informações sobre agrupamentos ou classes de amostras que apresentem características semelhantes.

SIMCA é um método de reconhecimento de padrões baseado na PCA. Inicialmente, a PCA é empregada para se obter uma impressão básica da classificação da amostra. O modelo de classe apropriado estabelecido para todos os tipos de amostra é então empregado para prever a classe da amostra de classificação desconhecida. Esse método desconsidera outras classes quando o modelo está sendo construído, assim, pode-se obter um bom resultado de classificação quando a diferença entre classes é muito maior do que as diferenças dentro da própria classe. A limitação desse método é que um modelo diferencial não otimizado será gerado quando as diferenças entre classes forem similares às diferenças dentro da própria classe.

#### 4.4.5. Método de referência

O método de referência empregado para a determinação dos elementos de interesse foi a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) após a decomposição ácida das amostras assistida por radiação micro-ondas. Esse método é consolidado e amplamente utilizado para a determinação de macro- e micronutrientes em plantas<sup>27,66,133</sup>.

##### 4.4.5.1. Preparo das amostras - cominuição

Previamente à determinação dos elementos de interesse pelo método de referência, as amostras dos itens 4.4.4.1 e 4.4.3.1 foram submetidas à cominuição em moinho criogênico, com uma etapa de pré-congelamento de 5 minutos e intervalos de recongelamento de 1 minuto. Empregou-se 5 ciclos de 2 minutos, totalizando 10 min de moagem<sup>93</sup>.

##### 4.4.5.2. Decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas

As decomposições das amostras dos itens 4.4.2.3, 4.4.3.1 e 4.4.4.1 ( $m \geq 0,250$  g) foram realizadas transferindo-se 0,250 g do material seco e moído para os frascos de digestão. Para as amostras dos itens 4.4.2.1 e 4.4.4.1 ( $m \leq 0,250$  g) as decomposições foram feitas transferindo-se cada folíolo e/ou cada trifólio, previamente secos e pesados, para os frascos de digestão de PTFE (TFM<sup>®</sup>). Em seguida, foram adicionados 6 mL de 2,8 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> e 2 mL de 30 % m m<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>133</sup> Os frascos foram fechados, acondicionados no suporte apropriado para 15 amostras e colocados na câmara única de reação com aquecimento assistido por radiação micro-ondas (Ultrawave, Milestone). O sistema foi fechado, pressurizado com Ar (40 bar) e iniciado o programa de aquecimento (Tabela 4). Ao término da digestão, o sistema foi resfriado com uma taxa de despressurização de 6 bar min<sup>-1</sup>. Após essa etapa, o sistema foi aberto e as soluções das amostras digeridas foram transferidas para tubos tipo *Falcon* de polietileno de 50,0 mL e os volumes completados para 15 mL com água deionizada ultrapura.

Tabela 4 – Programa de aquecimento para decomposição de amostras de tecido vegetal assistida por radiação micro-ondas

<b>Etapa</b>	<b>t (min)</b>	<b>E (W)</b>	<b>T1 (°C)</b>	<b>T2 (°C)</b>	<b>P (bar)</b>
<b>1</b>	20	1500	240	60	150
<b>2</b>	20	1500	240	60	150

#### 4.4.5.3. Determinação dos elementos por ICP OES

As determinações de macro- e micronutrientes nas amostras digeridas foram realizadas por ICP OES (iCAP 7400 Duo, Thermo) com vista radial (Ca, Mg, K, P, S) e axial (Fe, Mn, B, Cu, Zn), e nebulizador concêntrico em câmara ciclônica, em condições robustas de análise. A Tabela 5 mostra os parâmetros operacionais utilizados neste equipamento. Para a construção das curvas analíticas, foram preparados padrões multielementares a partir de soluções estoque ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ). Para o controle de qualidade das análises dos digeridos foram utilizados os seguintes CRMs:

- NIST 1515 *Apple leaves*;
- NIST 1547 *Peach leaves*;
- NIST 1570a *Spinach leaves*;
- NIST 1573a *Tomato leaves*.

Tabela 5 – Parâmetros operacionais utilizados no espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente Thermo iCAP 7400 Duo

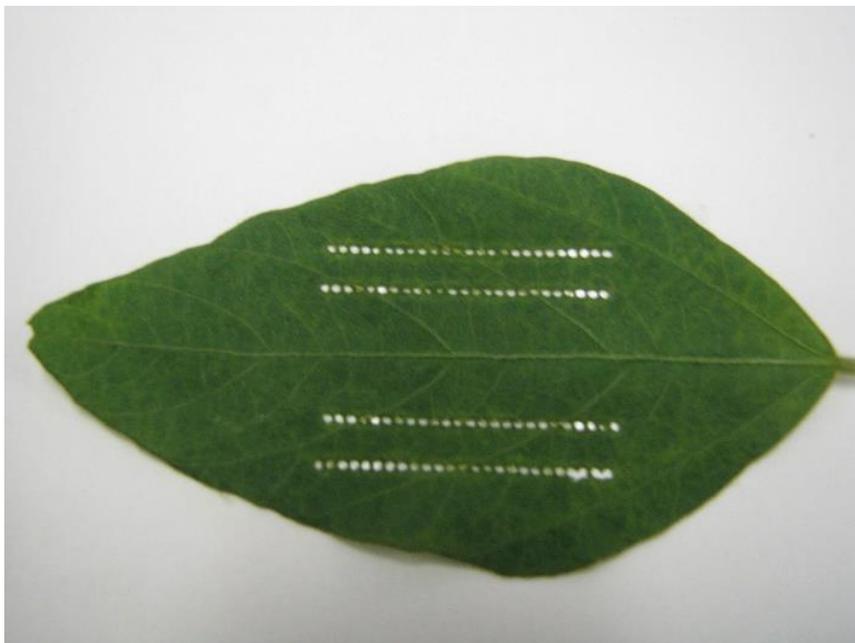
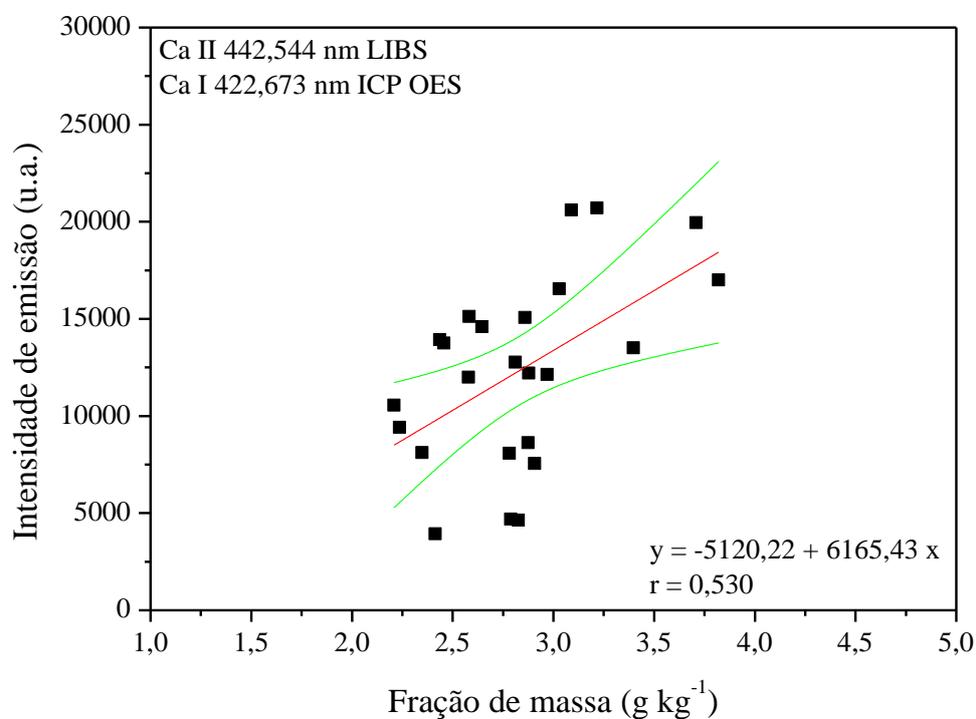
<b>Parâmetros operacionais</b>	<b>Valores</b>
<b>Potência da radiofrequência (kW)</b>	1,2
<b>Vazão do gás do plasma (<math>\text{L min}^{-1}</math>)</b>	12
<b>Vazão do gás auxiliar (<math>\text{L min}^{-1}</math>)</b>	0,5
<b>Vazão do gás de nebulização (<math>\text{L min}^{-1}</math>)</b>	0,6
<b>Vazão da amostra (<math>\text{mL min}^{-1}</math>)</b>	1,5
<b>Altura de observação (mm)</b>	8
<b>Tempo de exposição (s)</b>	UV - 10 Vis - 5
<b>Número de replicatas</b>	1 - 3
<b>Linhas de emissão (nm)</b>	K I 766,490 Ca I 422,673 Mg II 285,213 P I 185,891 S I 180,731 Fe II 259,940 Mn II 257,260 B I 208,957 Cu I 324,754 Zn I 213,856

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Estudos iniciais – análise de folhas de soja por LIBS

Estudos preliminares por LIBS foram realizados com folhas frescas de soja, conforme procedimento descrito em 4.4.2.1. As amostras empregadas nesses estudos foram coletadas de plantas cultivadas em condições de casa de vegetação, conforme descrito em 4.1.1. Após as análises por LIBS, as amostras foram submetidas à análise pelo método de referência, descrito no item 4.4.5. O objetivo desses estudos foi verificar a viabilidade técnica da análise direta de folhas frescas de soja por LIBS e a correlação com o método de referência. Para isso, foram empregadas as condições experimentais previamente utilizadas nas análises diretas de folhas de cana-de-açúcar e de material vegetal analisado na forma de pastilhas<sup>48; 97</sup>. A viabilidade foi confirmada, mas o sinal analítico e as frações de massa obtidos nesses experimentos não apresentaram coeficientes de correlação satisfatórios ( $r \leq 0,530$ ) para os elementos de interesse. Os resultados obtidos nesses estudos indicaram a necessidade de se definir uma estratégia de amostragem mais apropriada, pois a baixa correlação pode ser atribuída à heterogeneidade na distribuição dos analitos nas folhas, que é inerente à microamostragem. A Figura 20 mostra os resultados obtidos para o cálcio, que apresentaram a melhor correlação ( $r = 0,530$ ) dentre os elementos avaliados. Os gráficos dos demais elementos avaliados (Mg, P, B, Zn e Cu) encontram-se no Apêndice B.

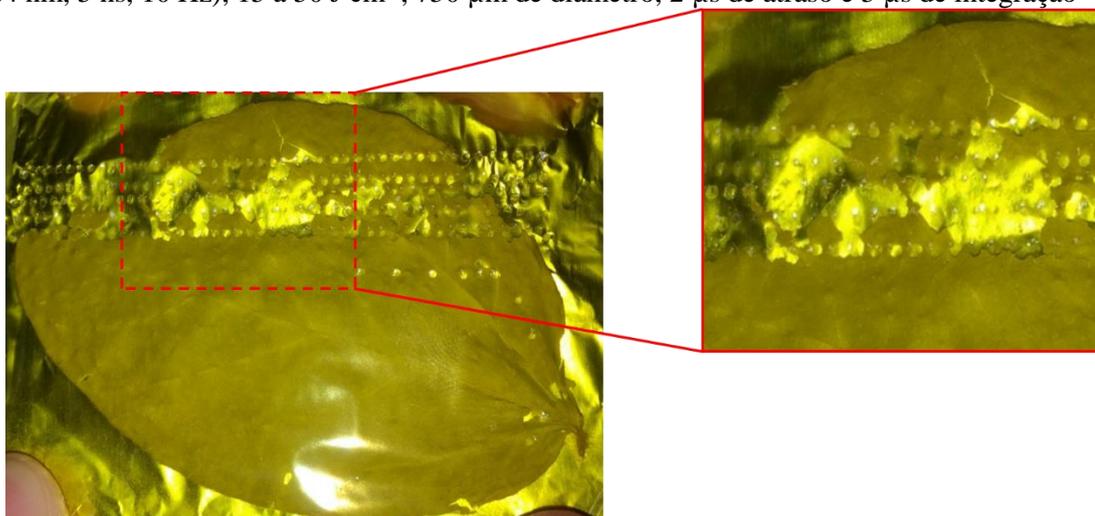
Figura 20 – Análise de folhas frescas de soja por LIBS: (A) amostragem no modo varredura com 25 pulsos de laser em 4 linhas paralelas à nervura central e (B) representação gráfica do sinal analítico *versus* a fração de massa obtida para o cálcio. Condições experimentais: laser de Nd:YAG @1064 nm, 5 ns, 5 Hz, 50 J cm<sup>-2</sup>, 750 μm de diâmetro, 2 μs de atraso e 5 μs de integração

**A****B**

## 5.2. Mapeamento de folhas de soja por LIBS

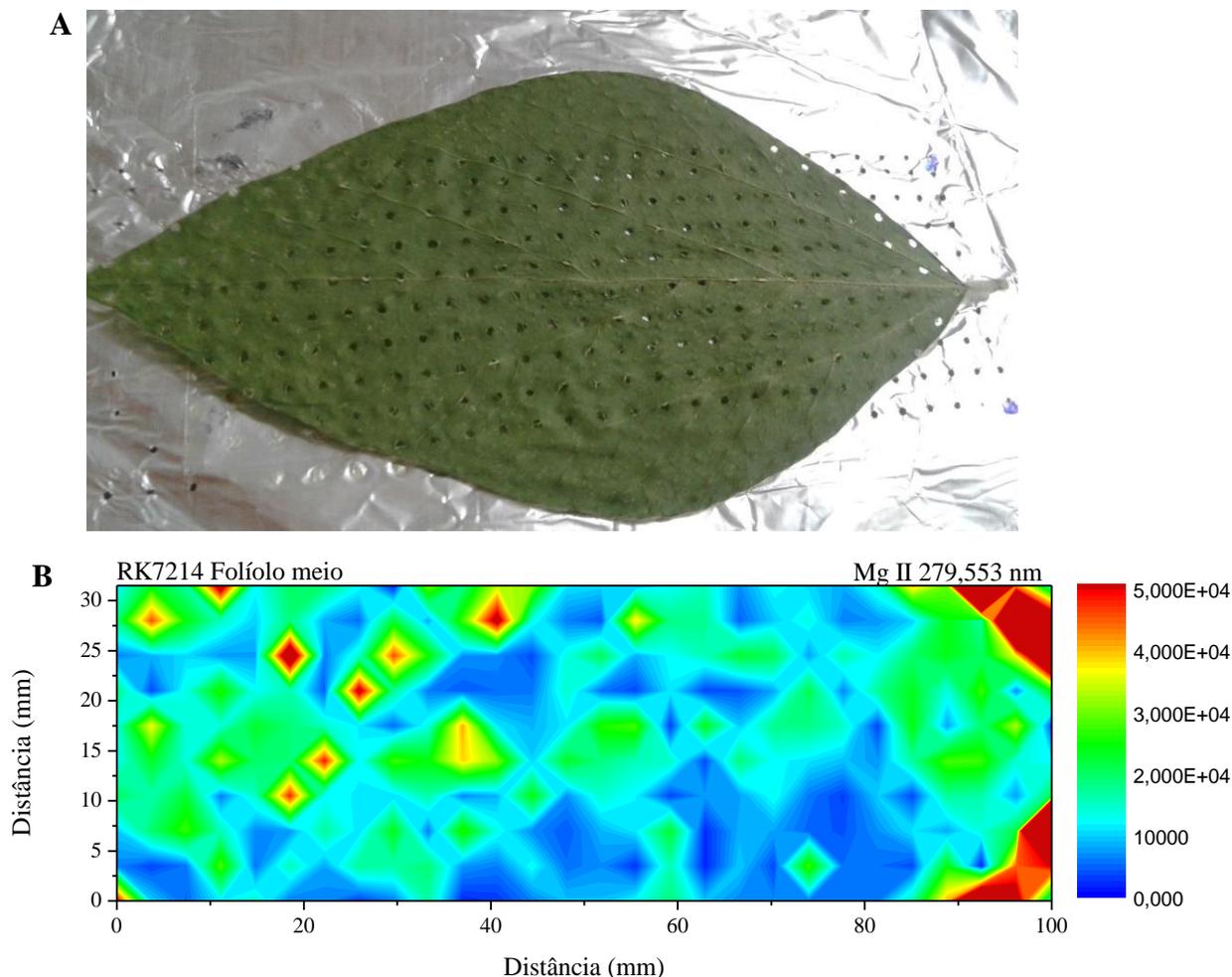
Os estudos iniciais para a construção de mapas de distribuição elementar com LIBS foram realizados com folhas secas de soja. No entanto, houve grande dificuldade em selecionar uma condição experimental de fluência (energia do pulso do laser por unidade de área, expressa em  $\text{J cm}^{-2}$ ) que fosse apropriada para análise das mesmas, sendo que apenas 1 pulso do laser com  $20 \text{ J cm}^{-2}$  já provocava fragmentação no local amostrado. A Figura 21 mostra a baixa resistência mecânica desse tipo de amostra. Por esse motivo, decidiu-se fazer o mapeamento nas folhas secas de soja apenas por  $\mu$ -EDXRF.

Figura 21 – Foto ilustrativa da baixa resistência mecânica da folha seca de soja. Nesta imagem é possível visualizar a folha seca fixada em folha de alumínio coberta com filme Kapton®. O detalhe mostra a fragmentação da amostra com  $20 \text{ J cm}^{-2}$ . Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 10 Hz), 15 a  $50 \text{ J cm}^{-2}$ , 750  $\mu\text{m}$  de diâmetro, 2  $\mu\text{s}$  de atraso e 5  $\mu\text{s}$  de integração



Os estudos de mapeamento com LIBS foram retomados quando as amostras de folhas de soja provenientes do cultivo hidropônico ficaram disponíveis. Assim, para a construção de mapas microquímicos por LIBS foram empregadas as amostras obtidas conforme descrito em 4.1.2.1. Como as amostras frescas também apresentaram baixa resistência mecânica à onda de choque dos pulsos do laser nos estudos preliminares, além de empregar apenas um pulso do laser por ponto ( $5 \text{ ns}$ ,  $50 \text{ J cm}^{-2}$ ,  $10 \text{ Hz}$ ), tomou-se o cuidado de fixá-las numa folha de alumínio antes de prendê-las ao porta amostras x-y, para que houvesse um controle do que estava sendo amostrado. Desse modo, a linha Al I 394,401 nm foi monitorada e utilizada como indicador de que somente a folha estava sendo amostrada. A Figura 22 mostra um folíolo de soja após ser submetido às análises por LIBS e um mapa de distribuição elementar de Mg construído a partir dos espectros obtidos.

Figura 22 – Representação do mapeamento de folhas de soja empregando LIBS. Em (A) são mostradas as crateras geradas pela incidência dos pulsos de laser sobre a amostra e em (B) um mapa microquímico de magnésio de um folíolo de soja. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 10 Hz), 1 pulso de  $50 \text{ J cm}^{-2}$  por ponto,  $750 \mu\text{m}$  de diâmetro,  $2 \mu\text{s}$  de atraso e  $5 \mu\text{s}$  de integração



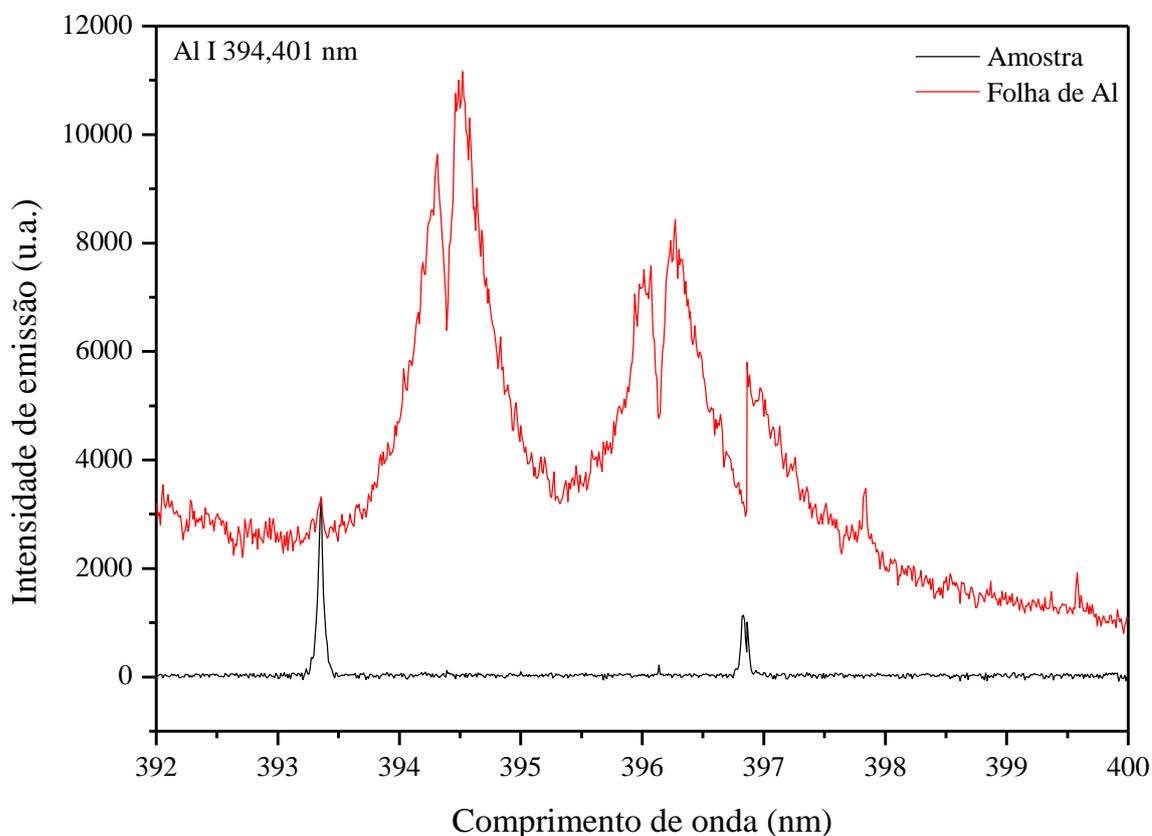
Nas condições experimentais utilizadas, foi possível detectar e construir os mapas microquímicos apenas de Ca e Mg. A partir desses mapas, não foi possível observar diferenças na distribuição dos elementos de interesse e, dessa forma, não foi possível definir quaisquer estratégias de amostragem.

Embora os resultados não tenham correspondido às expectativas, uma vez que os mapas não mostraram diferenças ou semelhanças na distribuição dos nutrientes nas folhas de soja, optou-se por apresentá-los nesta tese para que fique registrada a potencialidade da técnica e o tipo de informação obtida com apenas um pulso do laser por ponto para esse tipo de amostra. Os demais mapas de distribuição elementar de Ca e Mg estão apresentados no Apêndice C.

Além dos mapas mencionados acima, foram construídos mapas de Al para comprovar que não houve remoção do material, embora as folhas de soja fossem perfuradas pelo pulso do laser. A Figura 23 mostra a comparação dos espectros da folha de soja e da folha de alumínio, amostrados por LIBS, observando-se a grande diferença que há entre eles.

Em alguns trabalhos de mapeamento microquímico de folhas empregando LIBS descritos na literatura, as amostras apresentam-se visivelmente danificadas (perfuradas), mas não há quaisquer informações sobre cuidados na amostragem. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Galiová *et al.*<sup>107</sup> no qual folhas de girassol (*Helianthus annuus*) foram mapeadas a fim de se avaliar o acúmulo de Pb no tecido foliar. Para isso, empregou-se um sistema LIBS constituído por laser de Nd:YAG @ 532 nm (5 ns, 10 mJ por pulso, 1 μs de atraso e 10 μs de integração) e, embora a energia por pulso seja de apenas 10 mJ por pulso, em comparação com 230 mJ por pulso utilizada nesta tese, é possível visualizar nas figuras apresentadas que houve dano significativo nas folhas.

Figura 23 – Fragmentos dos espectros obtidos no modo mapeamento incidindo-se um pulso de laser sobre a amostra e sobre a folha de alumínio. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 10 Hz), 1 pulso de 50 J cm<sup>-2</sup>, 750 μm de diâmetro, 2 μs de atraso e 5 μs de integração



Os mapas microquímicos obtidos por LIBS são apresentados apenas em termos de intensidade da linha espectral, que pode ser proporcional à concentração local, mas não há uma forma de calibração ou de demonstrar uma linearidade das respostas. Isto porque, como mencionado em outros trabalhos sobre mapeamento, não há padrões ou materiais de referência que possam ser utilizados para este fim ainda. O que há para plantas são materiais de referência certificados em pó, que não fornecem nenhum tipo de informação sobre a distribuição espacial dos nutrientes<sup>26</sup>.

No entanto, na literatura há trabalhos que apresentam mapas microquímicos quantitativos empregando-se LA-ICP-MS. Wu *et al.*<sup>134</sup> mapearam macro- (Mg, K, P, S) e micronutrientes (Mn, Cu, B) em folhas de *Elsholtzia splendens* e o método de adição de analito para calibração. Para isso, empregaram um material de referência certificado, *NIST 1515 Apple Leaves*, dopado com soluções de referência dos analitos de interesse com concentrações conhecidas. Para validar o procedimento desenvolvido, foi empregado outro CRM, o *NIST 1547 Peach Leaves*. A intensidade do íon  $^{13}\text{C}^+$  foi utilizada para corrigir as medidas, a fim de compensar i) a possível heterogeneidade do material devido aos procedimentos de preparo, e ii) o efeito da umidade no processo de ablação e na intensidade.

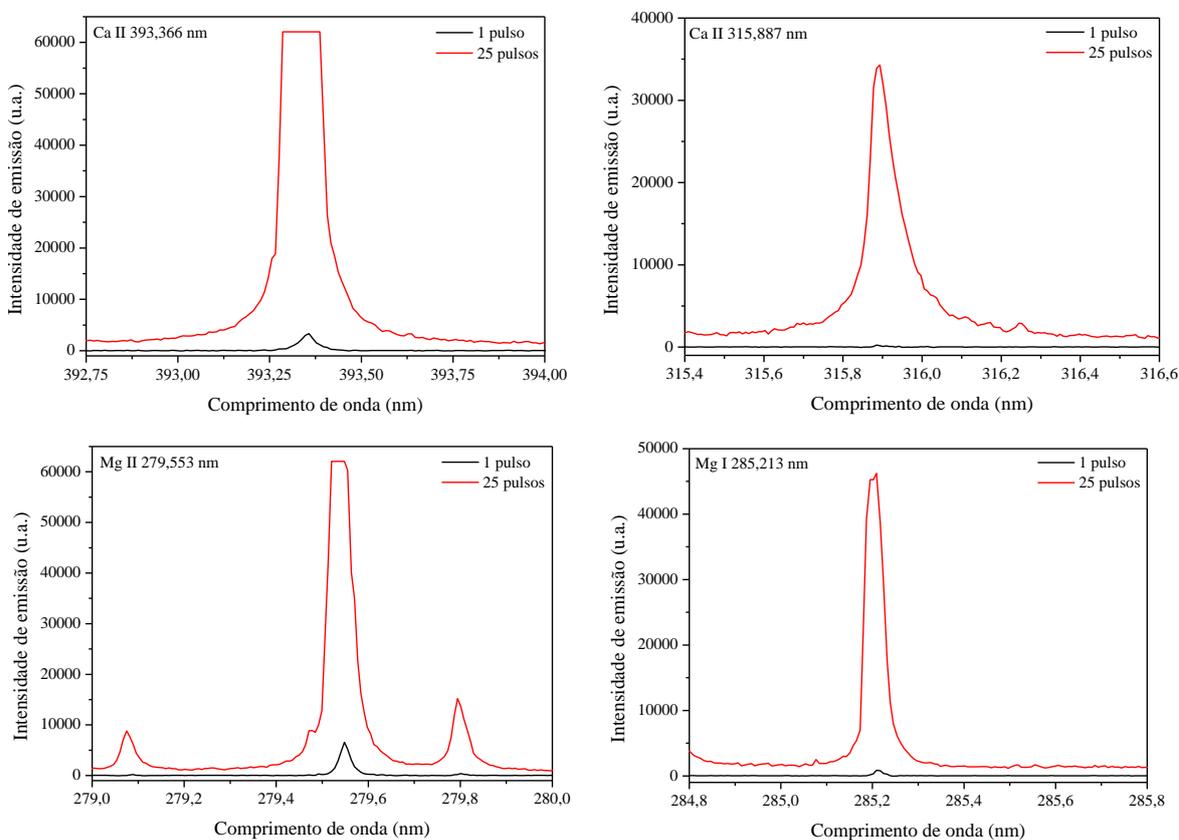
Mais recentemente, Ko *et al.*<sup>135</sup> mapearam Cs em folhas de manjerição empregando LA-ICP-MS. Como não havia material de referência com composição idêntica à amostra, concentrações conhecidas de Cs e K foram adicionadas ao CRM *NIST 1573a Tomato Leaves*. Para o teste de homogeneidade, In foi adicionado aos padrões e a proporção  $^{115}\text{In}/^{13}\text{C}$  foi avaliada a fim de garantir a homogeneidade dos padrões.

Outro ponto que deve ser discutido é a influência da umidade no processo de ablação. Segundo Wisbrun *et al.*<sup>136</sup>, a umidade da amostra pode reduzir a intensidade de emissão do plasma. Há várias razões que contribuem para este efeito, mas a principal delas é que parte da energia do laser é consumida para o aquecimento da água, em vez de ser usada para a formação do plasma. O mecanismo de produção de aerossóis também é suprimido pela umidade, reduzindo os sinais de intensidade em altas frequências. Ao nível microscópico, a água aumenta a energia requerida para a ablação do substrato da amostra. No entanto, estes efeitos agem de formas diferentes para várias matrizes. Amostras de areia e solo foram analisadas - para as amostras de areia, a intensidade era reduzida pela metade com 0,8 % de umidade, enquanto que para as amostras de solo, 5 % de umidade era necessária para a mesma redução. A razão, segundo os autores, é que o solo absorve a água muito melhor que a areia. A água não penetra nos grãos de areia e, assim, para o mesmo teor de umidade, muito mais água estava presente na superfície dos grãos de areia em comparação com o solo.

Por este motivo, para a construção de mapas microquímicos quantitativos por LIBS, deve-se avaliar todos os parâmetros mencionados acima, como a influência do teor de umidade, o uso de padrões para a calibração e, se os padrões forem preparados em base seca, a correção da umidade é outro parâmetro que deve ser pensado.

Além disso, quando comparados os espectros de 1 pulso do laser com os espectros acumulados (25 pulsos, por exemplo) é possível observar uma grande diferença na sensibilidade. A Figura 24 mostra os espectros obtidos por LIBS com 1 pulso do laser por ponto, no modo mapeamento, e 25 pulsos acumulados no modo varredura. No exemplo apresentado há um aumento significativo nas intensidades das linhas de emissão mais sensíveis de Ca e Mg selecionadas para a construção dos mapas e aquelas empregadas no modo varredura. Com os 25 pulsos acumulados, as intensidades das linhas de emissão dos dois elementos atingiram o número máximo de contagens do detector (62000) e saturaram o sinal das linhas de emissão mais sensíveis.

Figura 24 – Fragmentos de espectros de emissão de folha de soja obtidos por LIBS: com 1 pulso de laser por ponto, no modo mapeamento, e 25 pulsos acumulados por linha no modo varredura. Linhas de emissão selecionadas: Ca II 393,366 nm, Ca II 315,887 nm, Mg II 279,553 nm e Mg I 285,213 nm. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns), 50 J cm<sup>-2</sup>, 750 µm de diâmetro, 2 µs de atraso, 5 µs de integração, taxas de repetição de 10 Hz no modo mapeamento e 5 Hz no modo varredura



Assim, pode-se afirmar que LIBS é uma técnica capaz de produzir mapas microquímicos de folhas frescas de soja com boa resolução, rapidez e com relativa facilidade para cobrir áreas grandes (cm x cm). Mapas microquímicos de Ca e Mg foram construídos com sucesso, com resolução apropriada. No entanto, esse mapeamento elementar não forneceu as informações esperadas sobre a distribuição elementar desses nutrientes, uma vez que, a partir deles, não foi possível definir uma estratégia de amostragem para estudos posteriores. Nenhuma abordagem quantitativa foi feita, pois há vários fatores que devem ser levados em consideração antes de qualquer tentativa de quantificação, tais como a influência da umidade no processo de ablação e na formação do plasma, a representatividade da amostragem e a estratégia de calibração mais apropriada.

### **5.3. Análise direta de folhas frescas de soja por LIBS**

Após a construção dos mapas microquímicos por LIBS e verificada a dificuldade em se trabalhar com as folhas de soja, tanto secas como frescas, optou-se por fazer uma prova de conceito: as folhas de soja frescas seriam analisadas por LIBS, conforme método descrito no item 4.4.2.3 e o espectro médio obtido das 30 folhas seria considerado comparável ao resultado que é obtido na análise convencional.

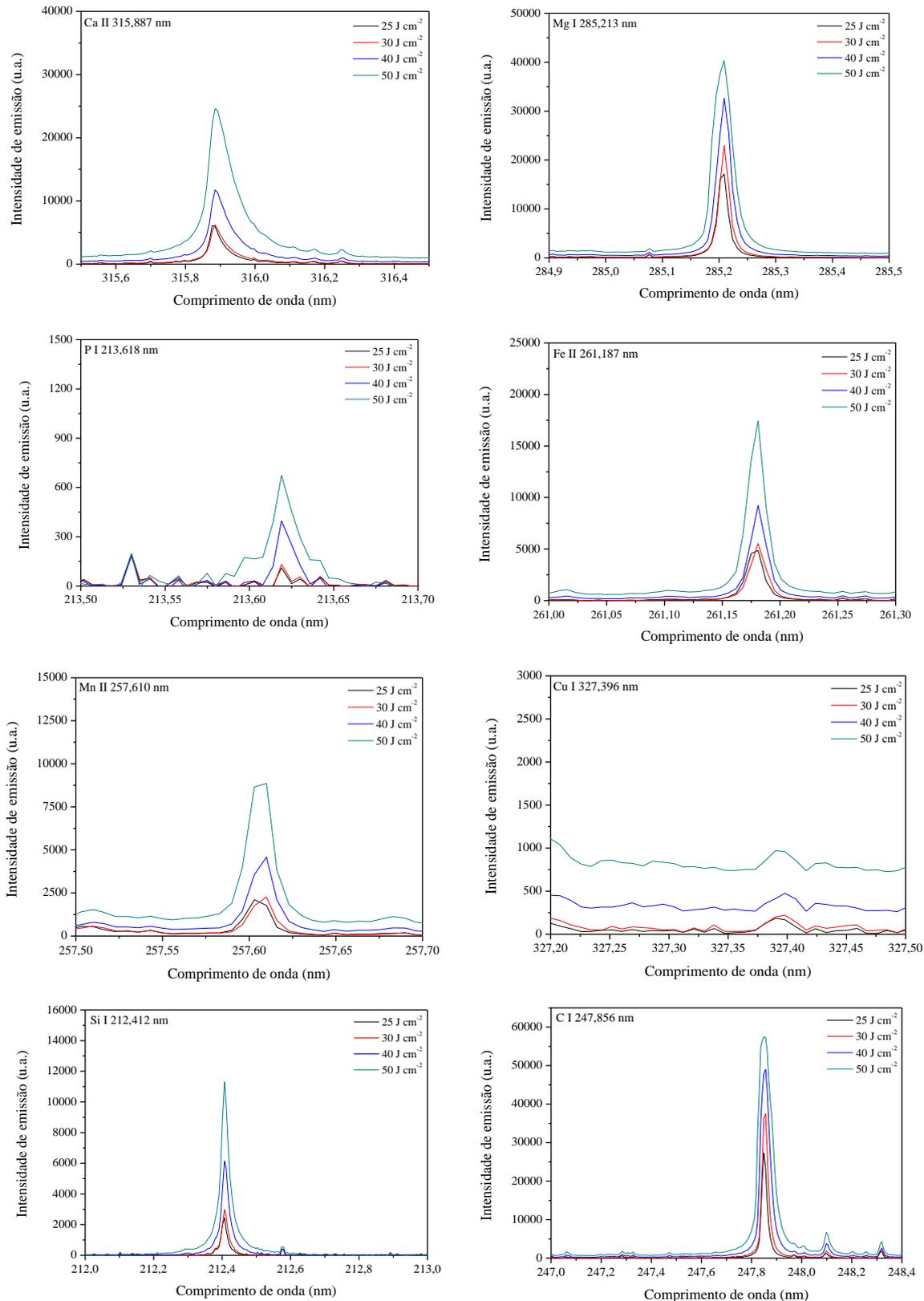
Primeiramente, foram realizados experimentos a fim de se estabelecer as melhores condições de análise. Os parâmetros avaliados foram a fluência (25, 30, 40 e 50 J cm<sup>-2</sup>), o número de pulsos acumulados por linha e o número de linhas. Os demais parâmetros instrumentais foram fixados: taxa de repetição em 5 Hz, tempo de atraso em 2 µs, tempo de integração em 5 µs e distância lente-amostra (LTSD) de 17,5 cm para 750 µm de diâmetro de focalização.

A área ótima para análise das folhas foi definida pela área foliar das amostras e pelos limites de movimentação do porta amostra x-y. Como esta área é de aproximadamente 3 cm x 5 cm e o diâmetro de focalização 750 µm, buscou-se amostrar a maior área possível dentro desses limites, evitando-se a sobreposição dos pontos amostrados. Desse modo, definiu-se 12 linhas de 25 pulsos de laser acumulados, totalizando 300 pulsos de laser por folíolo.

Em seguida, a fluência foi avaliada. A fluência é definida como energia por unidade de área e medida em J cm<sup>-2</sup>. Para um laser com determinado comprimento de onda e duração de pulso, tanto a energia por pulso quanto a distância lente-amostra podem afetar a fluência e a irradiância. A distância lente-amostra determina a área irradiada (*i.e.* o diâmetro de focalização) da superfície da amostra e deve ser menor que a distância focal da lente para que

o diâmetro de focalização seja maior<sup>94</sup>. Nesse estudo, o diâmetro de focalização foi fixado em 750  $\mu\text{m}$  e variou-se a energia por pulso do laser (110 – 230 mJ). Três amostras de folhas de soja foram submetidas às análises por LIBS para cada uma das fluências avaliadas. Os resultados obtidos para Ca, Mg, P, Fe, Mn, Cu, Si e C são apresentados na Figura 25. Pode-se observar que para todos os elementos de interesse, a intensidade de emissão foi maior quando se empregou 50  $\text{J cm}^{-2}$  de fluência.

Figura 25 – Efeito da fluência na intensidade das linhas de emissão de Ca II 315,887 nm, Mg I 285,213 nm, P I 213,618 nm, Fe II 261,187 nm, Mn II 257,610 nm, Cu I 327,396 nm, Si I 212,412 nm e C I 247,856 nm. Espectros médios ( $n = 3$ ) obtidos de folhas de soja coletadas em campo experimental da ESALQ. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 5 Hz), 750  $\mu\text{m}$  de diâmetro, 2  $\mu\text{s}$  de atraso e 5  $\mu\text{s}$  de integração



Com as melhores condições de análise definidas, realizou-se a prova de conceito para comprovar a viabilidade técnica e prática de se fazer a diagnose foliar por LIBS. Para isso, 30 folhas foram coletadas em campo experimental da ESALQ (item 4.1.3) e 30 folhas coletadas de plantas cultivadas em solo em condições de casa de vegetação (item 4.1.2.2), e analisadas por LIBS. As análises foram realizadas segundo as condições otimizadas e os espectros médios foram tratados, primeiramente, por folíolo, em seguida, foi obtido um espectro médio por folha.

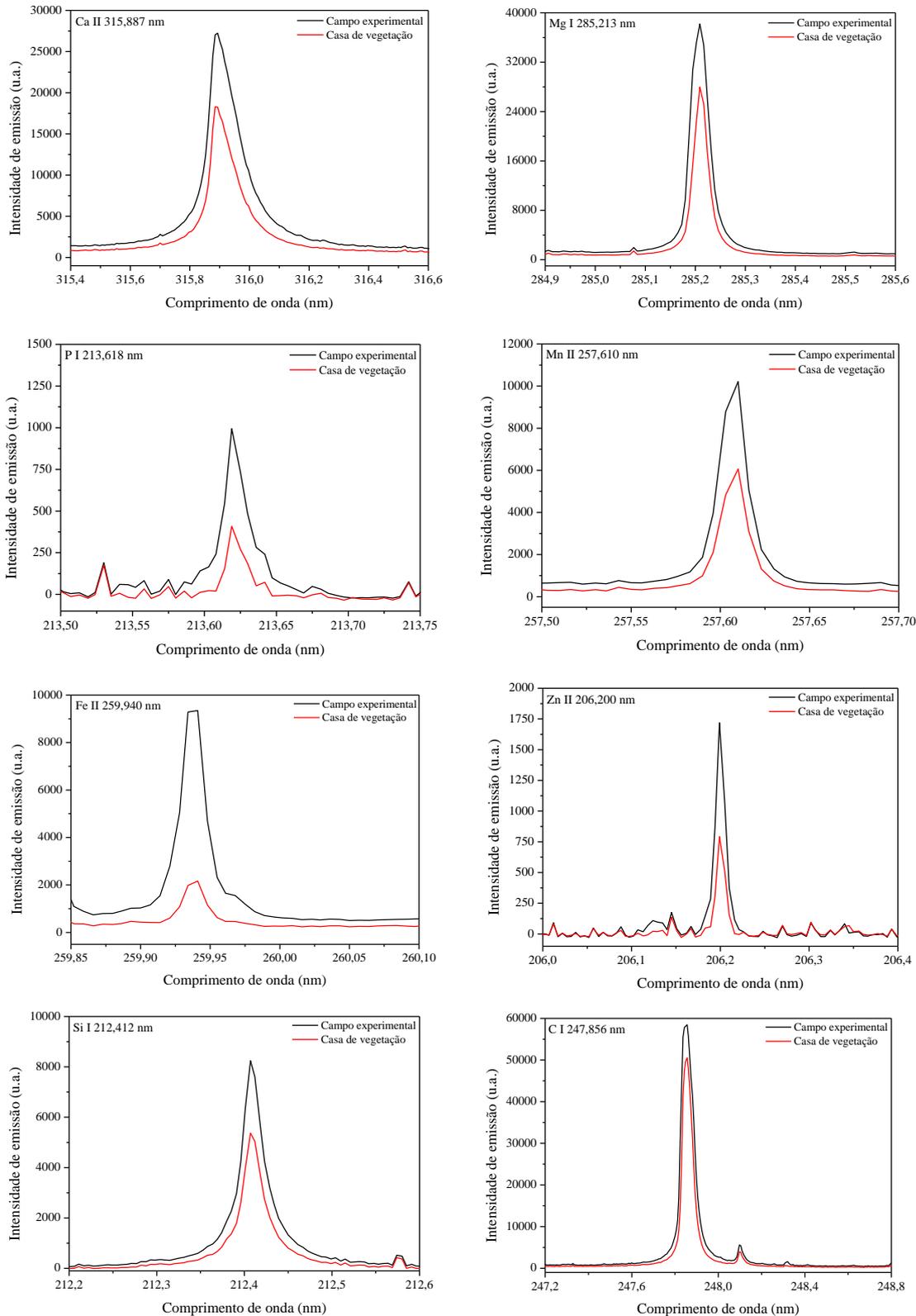
Após as análises por LIBS, as 30 folhas de cada cultivo foram misturadas, formando uma amostra composta, e analisadas pelo método de referência (item 0.). Para garantir a qualidade dos resultados obtidos, foi utilizado o CRM *NIST 1570a Spinach Leaves*. Os resultados obtidos pelo método de referência estão dispostos na Tabela 6. O espectro médio das 30 folhas analisadas, assim como a fração de massa para cada um dos elementos determinados por ICP OES estão apresentados na Figura 26.

Tabela 6 – Frações de massa dos macro- e micronutrientes determinados pelo método de referência em amostras do campo experimental, da casa de vegetação e do CRM *NIST 1570a*

Linha de emissão (nm)	ICP OES			
	Campo experimental	Casa de vegetação	<i>NIST 1570a</i> certificada	<i>NIST 1570a</i> determinada* <sup>1</sup>
	Fração de massa (g kg <sup>-1</sup> )			
<b>Ca I 422,673</b>	9,51 ± 0,17	12,96 ± 0,16	15,26 ± 0,66	15,03 ± 0,09
<b>Mg II 279,079</b>	4,29 ± 0,05	4,66 ± 0,05	9,0	8,54 ± 0,07
<b>K I 766,490</b>	18,14 ± 0,22	17,03 ± 0,26	29,00 ± 0,26	28,46 ± 0,43
<b>P I 185,891</b>	3,52 ± 0,02	2,06 ± 0,04	5,187 ± 0,067	5,237 ± 0,002
<b>S I 180,731</b>	3,03 ± 0,04	3,41 ± 0,10	5,0	5,02 ± 0,08
	Fração de massa (mg kg <sup>-1</sup> )			
<b>B I 208,957</b>	52,16 ± 0,51	43,49 ± 0,41	37,7 ± 1,2	37,57 ± 0,21
<b>Cu I 324,754</b>	6,90 ± 0,11	6,50 ± 0,09	12,22 ± 0,86	10,88 ± 0,05
<b>Zn I 213,856</b>	41,58 ± 0,77	67,00 ± 0,97	82,3 ± 3,9	79,16 ± 1,09
<b>Fe II 259,940</b>	82,68 ± 0,95	91,79 ± 0,71	-	232,13 ± 2,62
<b>Mn II 257,610</b>	96,26 ± 0,83	101,12 ± 1,28	76,0 ± 1,2	69,75 ± 0,81

\*medidas em triplicata; \*<sup>1</sup> medidas em duplicata.

Figura 26 – Fragmentos dos espectros médios das 30 folhas de soja amostradas em campo experimental e em casa de vegetação. Linhas de emissão: Ca II 315,887 nm, Mg I 285,213 nm, P I 213,618 nm, Mn II 257,610 nm, Fe II 259,940 nm, Zn II 206,200 nm, Si I 212,412 nm e C I 247,856 nm. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 5 Hz), 50 J cm<sup>-2</sup>, 750 μm de diâmetro, 2 μs de atraso, 5 μs de integração, 25 pulsos acumulados por linha, 36 linhas por folha



Os resultados obtidos mostram que a prova de conceito foi realizada com sucesso, sendo possível utilizar LIBS para determinar macro- e micronutrientes em folhas frescas de soja. Nas condições de análise empregadas, foi possível identificar e medir sinais de Ca, Mg, P, Mn, Fe, Zn, Si e C. Os nutrientes Cu e B foram identificados, mas os sinais de intensidade de emissão foram muito baixos (não apresentados). A linha de emissão do Al foi monitorada a fim de avaliar se a folha de alumínio, colocada atrás das amostras, estava sendo amostrada. Os dados obtidos mostram que não houve remoção de material além da amostra (dados não apresentados).

As análises das amostras pelo método de referência apontam uma divergência entre as intensidades de emissão dos espectros obtidos e as frações de massa determinadas por ICP OES. O espectro médio das amostras do campo experimental apresenta maior intensidade para todos os elementos identificados por LIBS, enquanto as frações de massa correspondentes são maiores em relação às amostras da casa de vegetação, apenas para K e P. Isto pode ser devido: i) à micro-heterogeneidade intrínseca dos analitos na amostra; ii) à influência da umidade nas medidas por LIBS; iii) à baixa representatividade da amostragem e iv) à ausência de estratégias de amostragem e calibração apropriadas.

De forma semelhante, Jull et al.<sup>77</sup> avaliaram a viabilidade de LIBS ser usado na análise de folhas frescas de pastagem e na forma de pastilhas. Nesse trabalho, os autores destacaram alguns fatores que limitaram a obtenção de bons resultados nas análises de folhas frescas *in situ*, quando comparados às análises de amostras secas: a atmosfera de ablação e o teor de umidade. A umidade variou significativamente entre as amostras frescas e as intensidades das linhas de emissão foram afetadas, uma vez que quanto maior a umidade menor a intensidade do espectro de emissão. Além disso, modelos de calibração para macro- (N, P, K, S, Ca e Mg), micronutrientes (Fe, Mn, Zn, Cu e B) e Na foram construídos utilizando o método de regressão PLS. Os melhores resultados foram obtidos para K, Na e Mn, que apresentaram coeficientes de correlação linear entre 0,90 e 0,92. Embora as capacidades preditivas dos modelos de calibração construídos para folhas frescas tenham sido inferiores aos das pastilhas, análises semi-quantitativas (*i.e.*, estimativa dos níveis de nutrientes) foram possíveis, permitindo identificar se nutrientes estavam dentro de uma determinada faixa de concentração.

Em resumo, os experimentos da prova de conceito apresentaram resultados muito promissores para a diagnose foliar da soja, indicando que LIBS pode ser uma ferramenta muito útil para a determinação de macro- e micronutrientes em folhas frescas, por sua rapidez

e versatilidade. Ainda que resultados quantitativos não tenham sido obtidos nas condições experimentais empregadas, estas podem ser um ponto de partida para estudos mais aprofundados de amostragem e calibração, a fim de se alcançar resultados que orientem o uso de fertilizantes de forma mais eficiente e que permitam tomar decisões em tempo real.

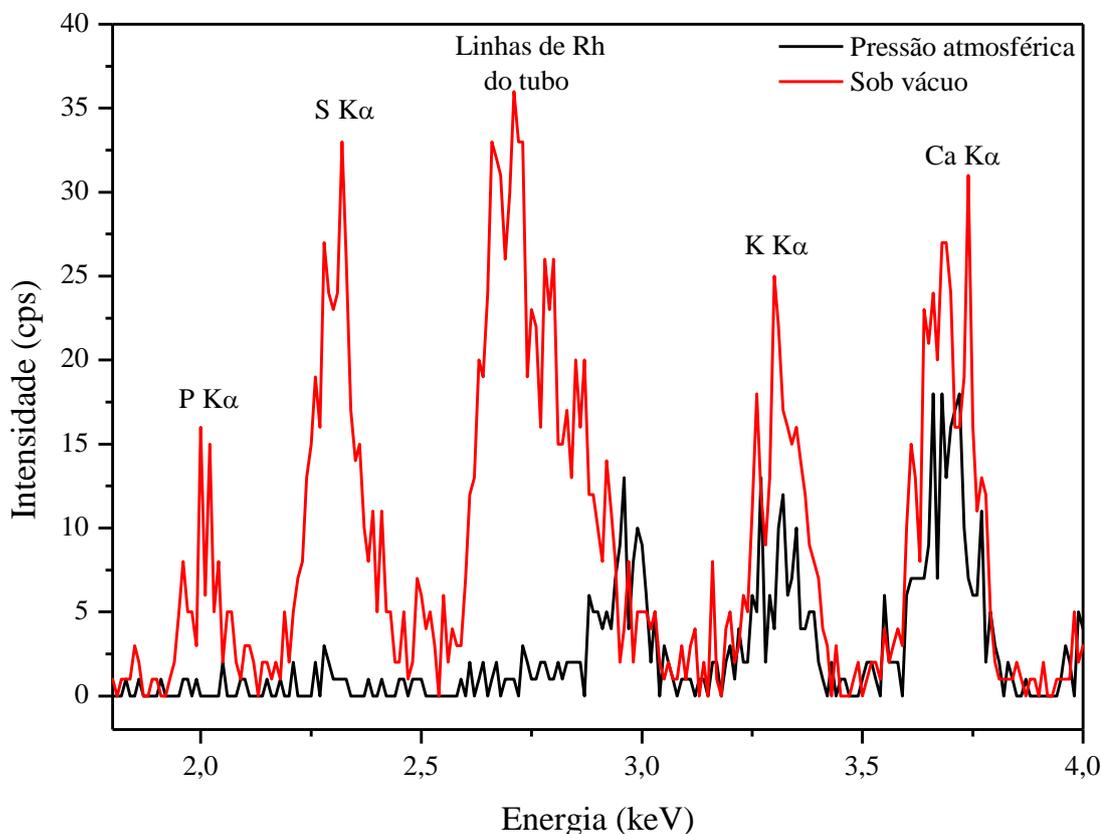
#### **5.4. Mapeamento de folhas de soja por $\mu$ -EDXRF**

Os resultados apresentados (mapas microquímicos) foram obtidos empregando-se o procedimento descrito no item 4.4.3.1. As amostras analisadas foram coletadas de plantas cultivadas em condições de casa de vegetação, conforme descrito no item 4.1.1. A fim de se estabelecer a melhor condição experimental, que satisfizesse uma condição de compromisso entre sinal analítico, resolução espacial e tempo de análise, foram estudados os efeitos do tempo de irradiação sobre o sinal analítico, o diâmetro do feixe de raios X e a matriz de mapeamento. Avaliaram-se os tempos de irradiação de 1, 5, 10 e 15 s por ponto. Para 1 s de irradiação por ponto, a análise foi rápida, mas não houve sinal suficiente de fósforo; para 5 s de irradiação, o sinal de fósforo foi satisfatório e a análise demorou, aproximadamente, 1 h por folíolo. Com 10 e 15 s por ponto, o sinal de P aumentou significativamente, mas o tempo de análise duplicou e triplicou, respectivamente, diminuindo muito a frequência analítica. Assim, 5 s foi escolhido por atender à condição de compromisso entre o aumento de sinal de P e a frequência analítica.

A matriz de mapeamento assim como o diâmetro do feixe são parâmetros críticos, pois influenciam diretamente a resolução espacial e a área total amostrada. O colimador de feixe de 2 mm foi escolhido por ser o maior dentre as opções disponíveis e a matriz de mapeamento 32 x 25 pontos foi definida por apresentar melhor relação entre área efetivamente amostrada e tempo total de análise.

Assim, as condições experimentais foram definidas, visando atender à condição de compromisso entre sinal analítico e frequência analítica: feixe de raios X de 2 mm, 5 s de irradiação por ponto em uma matriz de mapeamento de 32 x 25 pontos. As análises foram feitas sob vácuo, visando, principalmente, aumentar a intensidade do sinal dos elementos de baixo número atômico, como o P e o S. A Figura 27 mostra uma comparação dos espectros obtidos sob pressão atmosférica e com a aplicação de vácuo na câmara de amostragem.

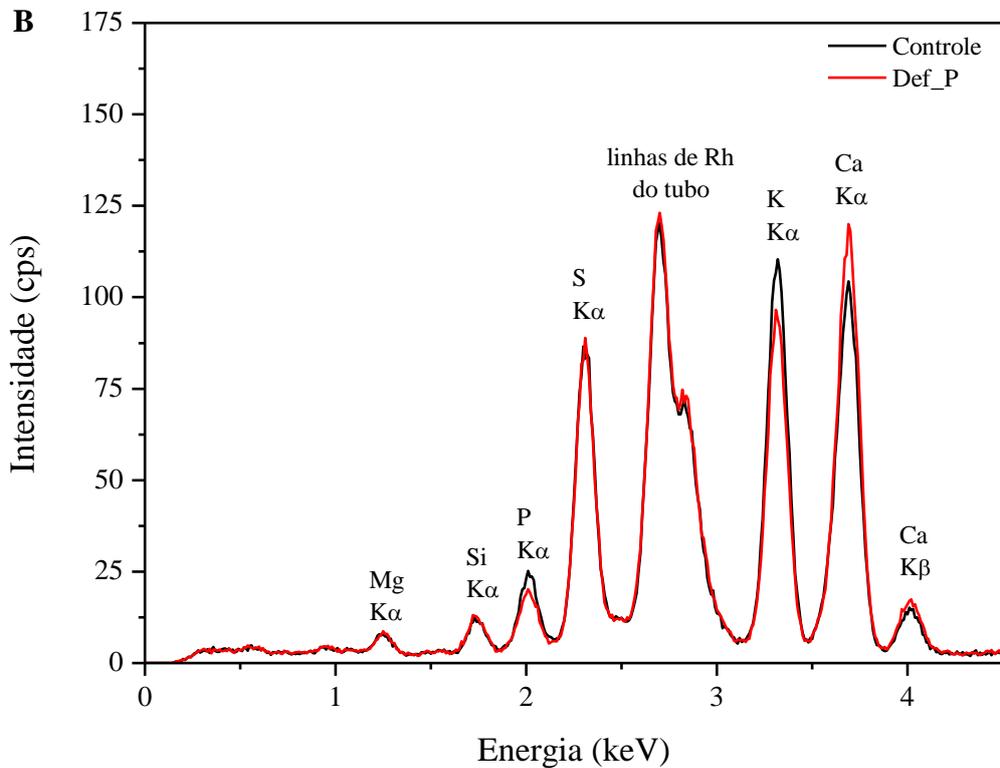
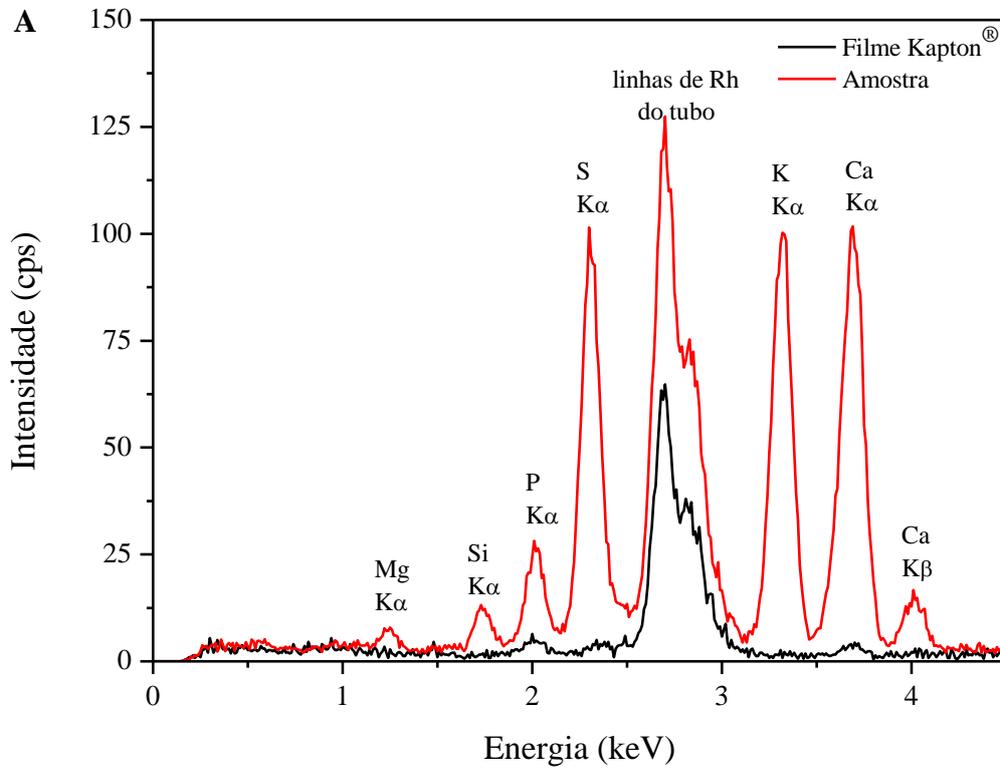
Figura 27 – Espectros obtidos por  $\mu$ -EDXRF sob pressão atmosférica e com vácuo ( $< 0,55$  Torr) aplicado na câmara de amostragem do equipamento. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm, 5 s de irradiação por ponto, 40 kV e 300  $\mu$ A de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh



Em seguida, estudos foram realizados amostrando-se cinco pontos aleatórios de um folhólo de soja e cinco pontos aleatórios do filme Kapton<sup>®</sup>, a fim de se avaliar a presença de possíveis contaminantes no filme. Também foram irradiados dez pontos aleatórios de cada folhólo de uma amostra de uma planta do tratamento controle e de uma com deficiência induzida de P. A Figura 28 mostra a comparação dos espectros médios obtidos nestes experimentos.

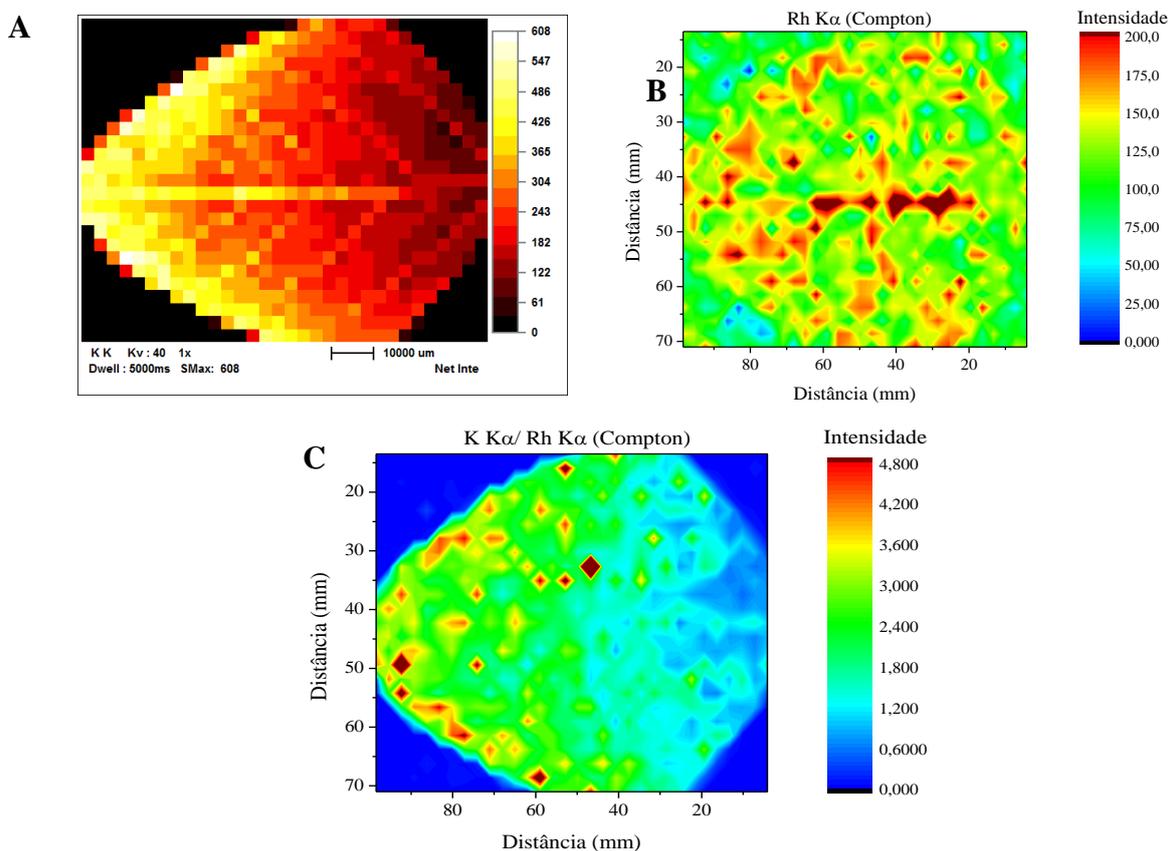
Foi possível observar que as intensidades obtidas para os elementos de interesse foram muito baixas para o filme Kapton<sup>®</sup> e, portanto, não iriam interferir nas análises das folhas de soja. Observou-se, também, que houve diferenças nas intensidades dos sinais obtidos para P, S, K e Ca, quando se irradiou uma amostra de planta do tratamento controle e de uma planta com deficiência induzida de P. Como esses resultados foram promissores, fez-se o mapeamento microquímico das folhas de soja com teor adequado de P e com baixo teor de P.

Figura 28 – Comparação de fragmentos dos (A) espectros médios ( $n = 5$ ) do filme Kapton® e da amostra, e (B) espectros médios ( $n = 15$ ) de uma amostra controle e de uma amostra com deficiência induzida de P. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm, 5 s de irradiação por ponto, 40 kV e 300  $\mu$ A de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh



Para a construção dos mapas microquímicos apresentados, os dados obtidos foram normalizados pelo sinal do Rh (espalhamento Compton). Para isso, dividiu-se a taxa de contagens líquidas de cada elemento pela taxa de contagens líquidas do espalhamento Compton em cada ponto amostrado. Isso foi feito para corrigir as diferenças de espessura que as folhas apresentam ao longo da superfície amostrada. A Figura 29 mostra o mapa microquímico de K construído pelo equipamento, o mapa do espalhamento Compton, e o mesmo mapa de K após a normalização (K/Rh).

Figure 29 – Mapas microquímicos de um folíolo de soja obtidos por  $\mu$ -EDXRF: (A) mapa de K construído pelo equipamento; (B) mapa do espalhamento Compton e (C) mapa de K construído após a normalização (K/Rh). Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30  $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh



Como pode ser observado, a não correção da espessura pode levar à interpretação errônea dos resultados obtidos. A partir do mapa construído pelo equipamento, pode-se verificar um acúmulo de K na região da nervura central do folíolo analisado. Entretanto, o mapa do espalhamento Compton revela que há um maior espalhamento nessa região e, após a

normalização, a distribuição do K nessa amostra apresenta-se mais homogênea sem acúmulos significativos na nervura central.

Esse tipo de normalização é comumente realizado nos trabalhos que empregam  $\mu$ -EDXRF para a construção de mapas microquímicos de amostras que apresentam diferenças intrínsecas de espessura<sup>137</sup>. As Figuras 30 – 39 mostram as fotos das amostras analisadas e os mapas microquímicos de P, S, K e Ca obtidos por  $\mu$ -EDXRF para as cultivares BRS 183 e BRS Tianá, respectivamente.

Figura 30 – Folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS 183 analisadas por  $\mu$ -EDXRF.

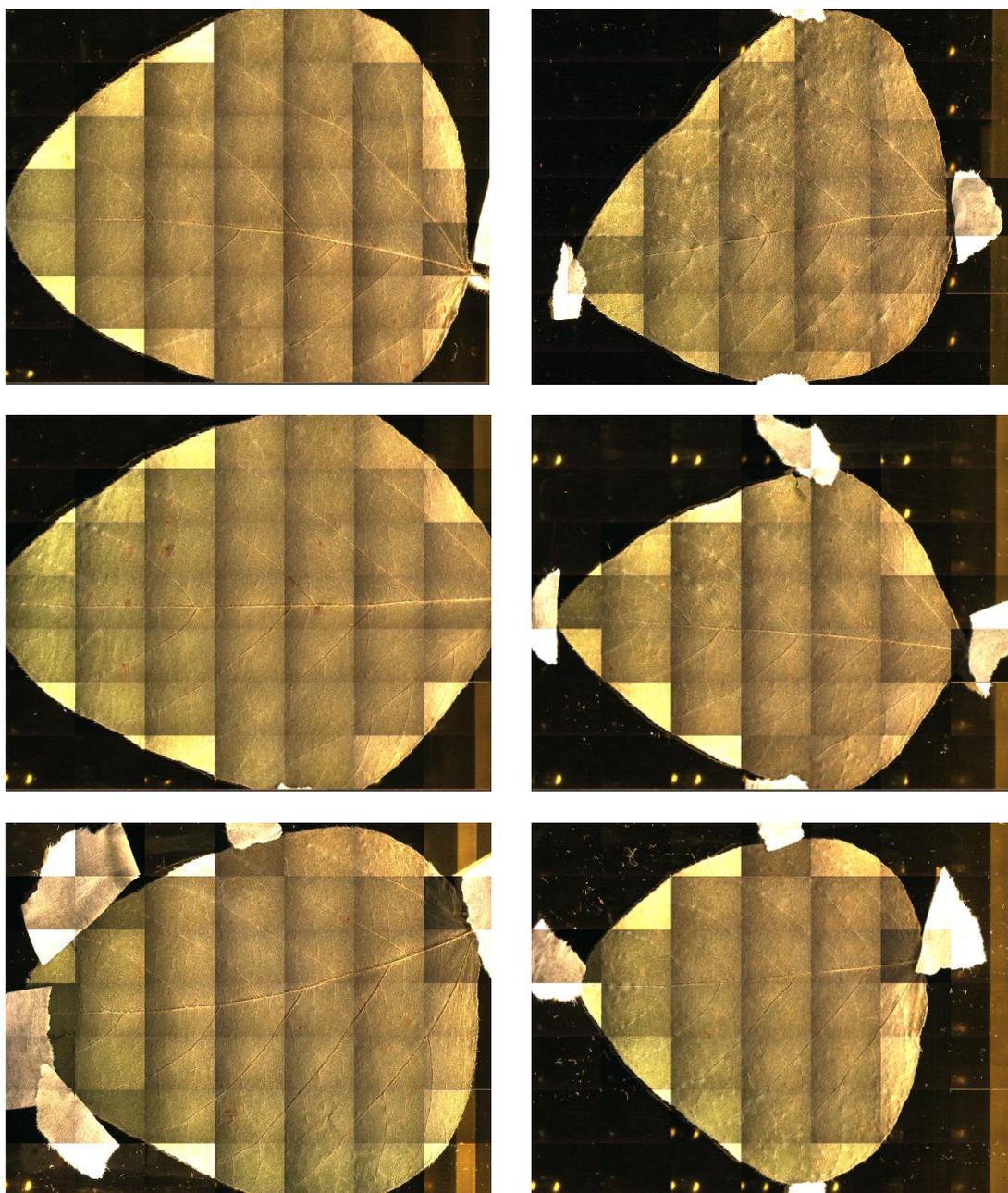


Figura 31 – Mapas de distribuição espacial de P em folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS 183, obtidos por  $\mu$ -EDXRF. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30  $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh

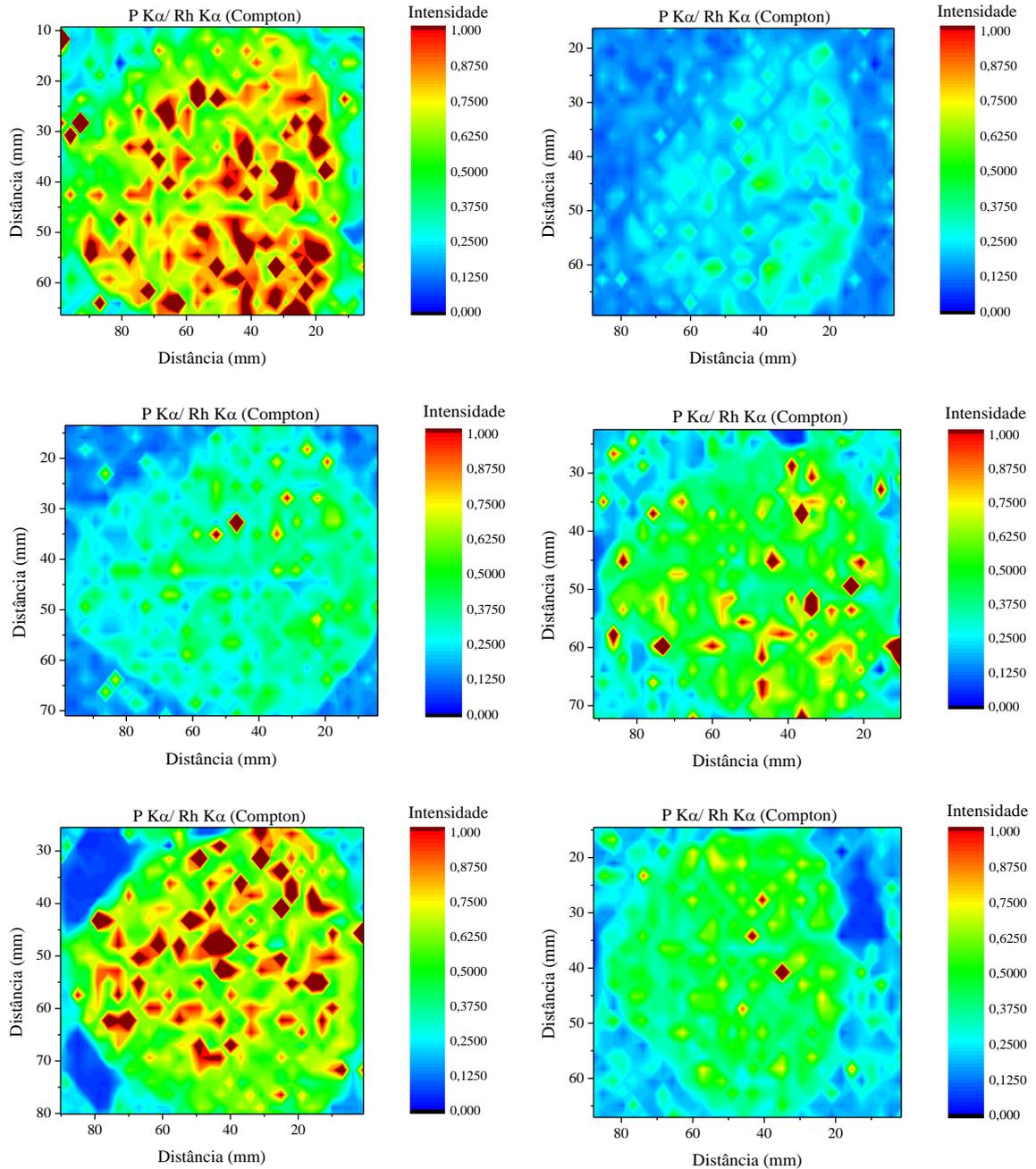


Figura 32 – Mapas de distribuição espacial de S em folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS 183, obtidos por  $\mu$ -EDXRF. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30  $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh

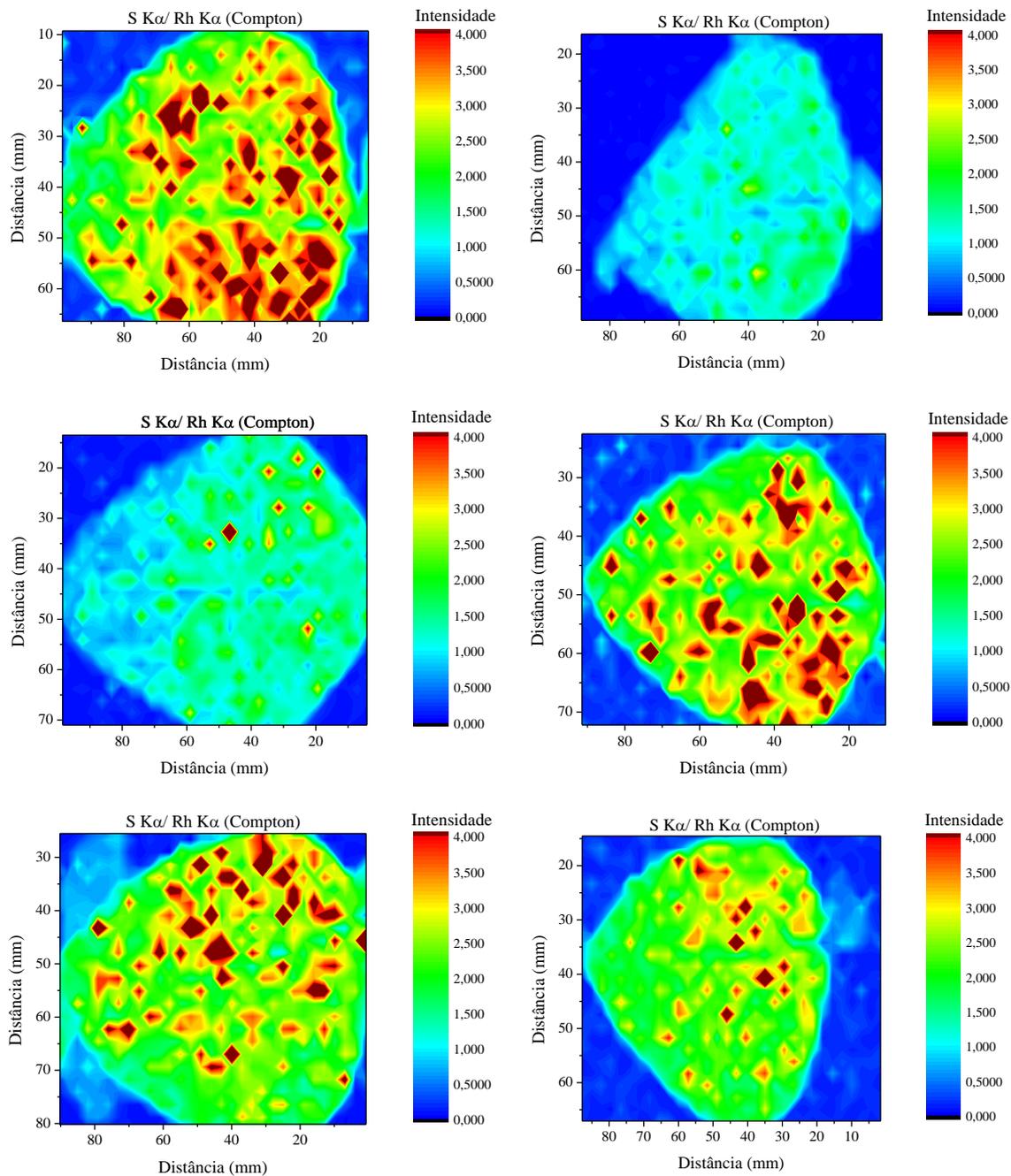


Figura 33 – Mapas de distribuição espacial de K em folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS 183, obtidos por  $\mu$ -EDXRF. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30  $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh

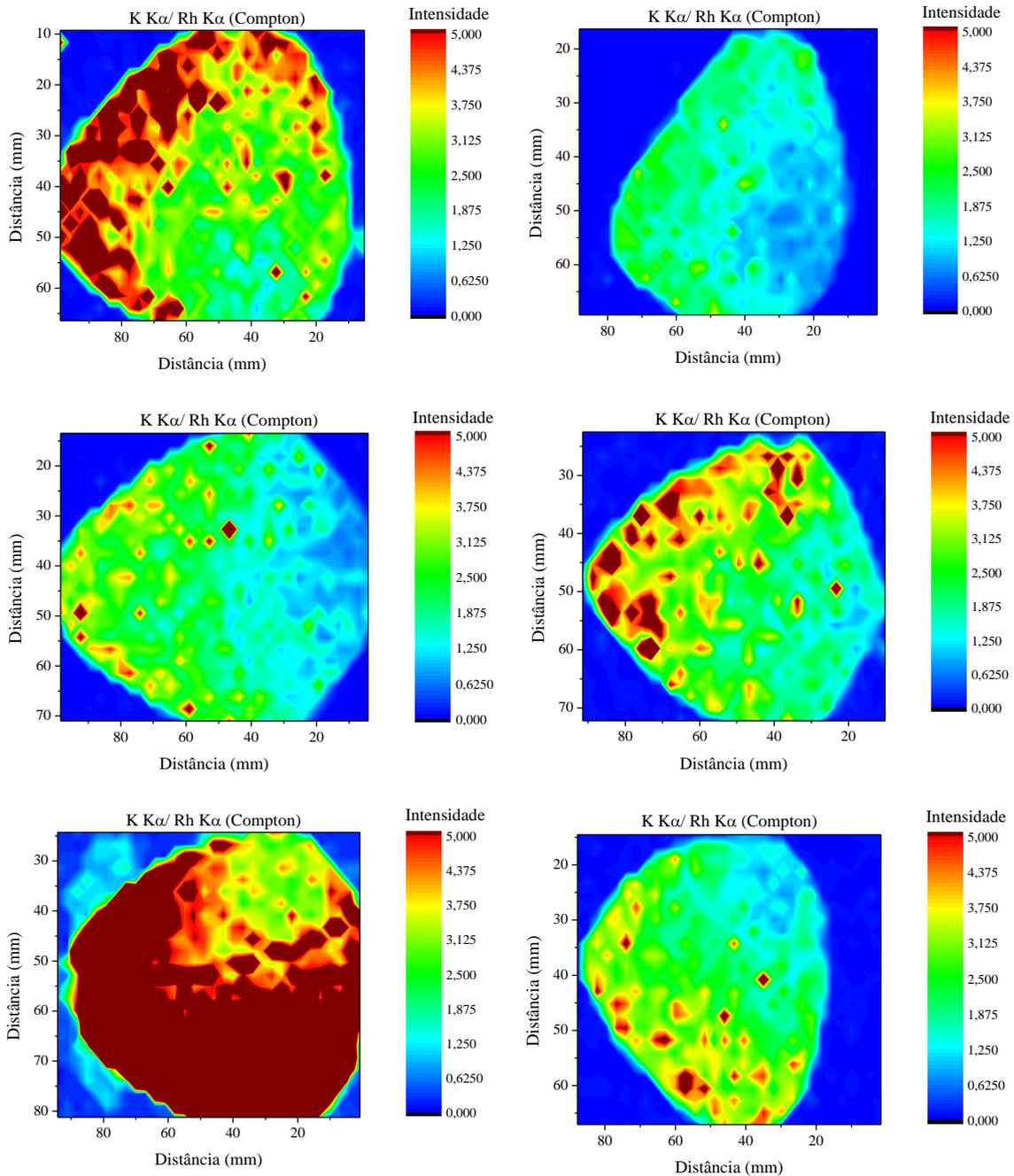


Figura 34 – Mapas de distribuição espacial de Ca em folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS 183, obtidos por  $\mu$ -EDXRF. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30  $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh

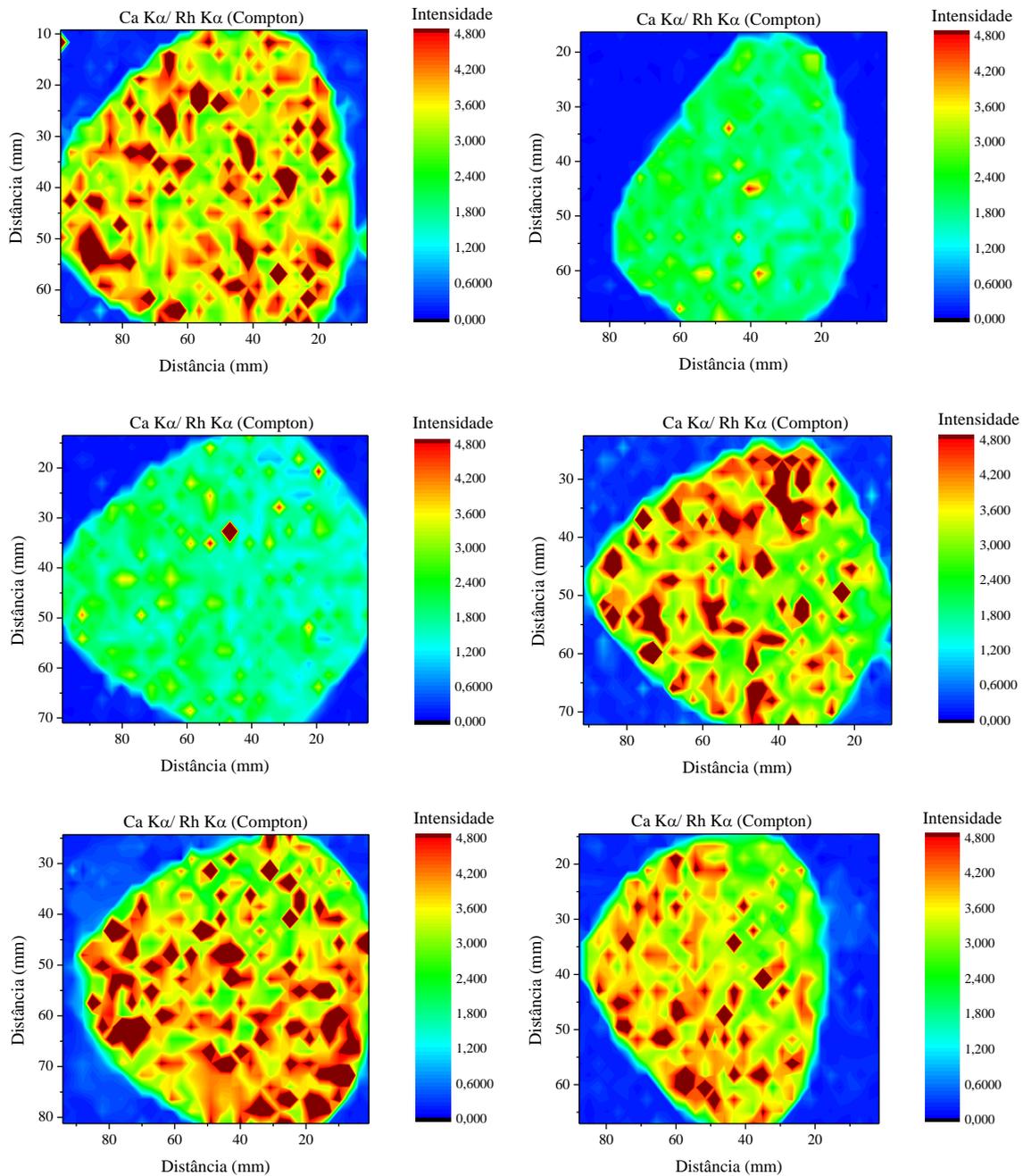


Figura 35 – Folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS Tianá analisadas por  $\mu$ -EDXRF

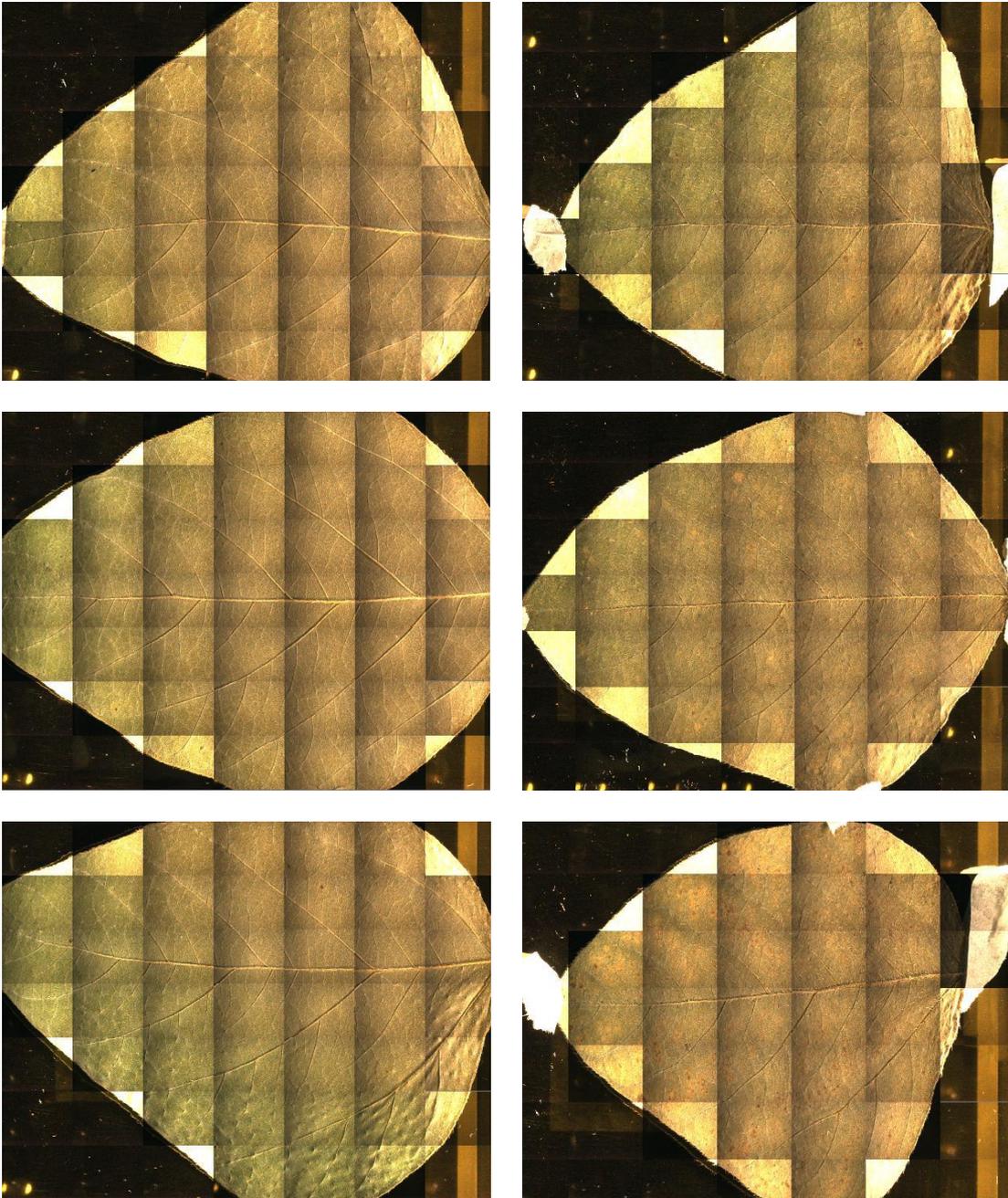


Figura 36 – Mapas de distribuição espacial de P em folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS Tianá, obtidos por  $\mu$ -EDXRF. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30  $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh

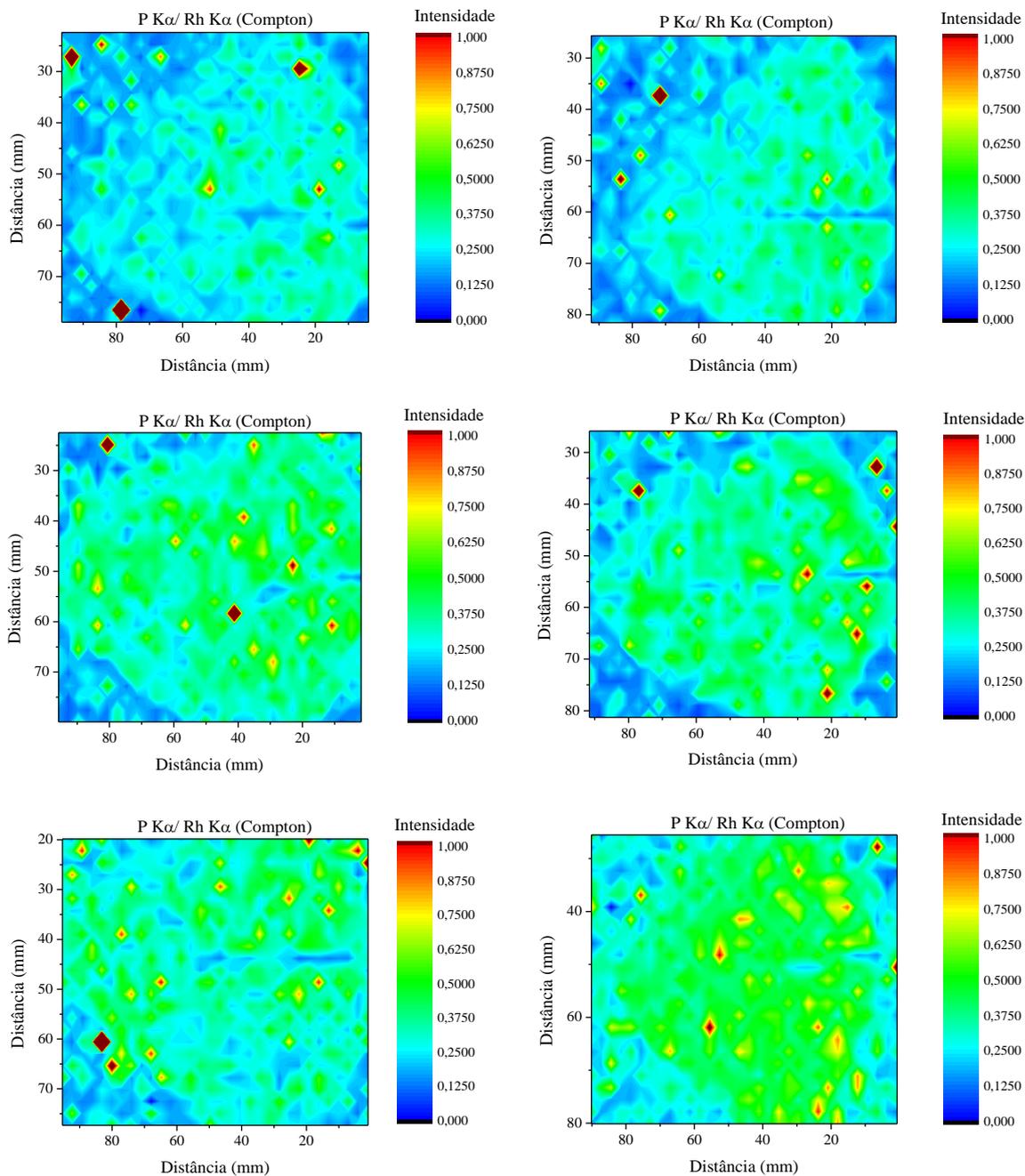


Figura 37 – Mapas de distribuição espacial de S em folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS Tianá, obtidos por  $\mu$ -EDXRF. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30  $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh

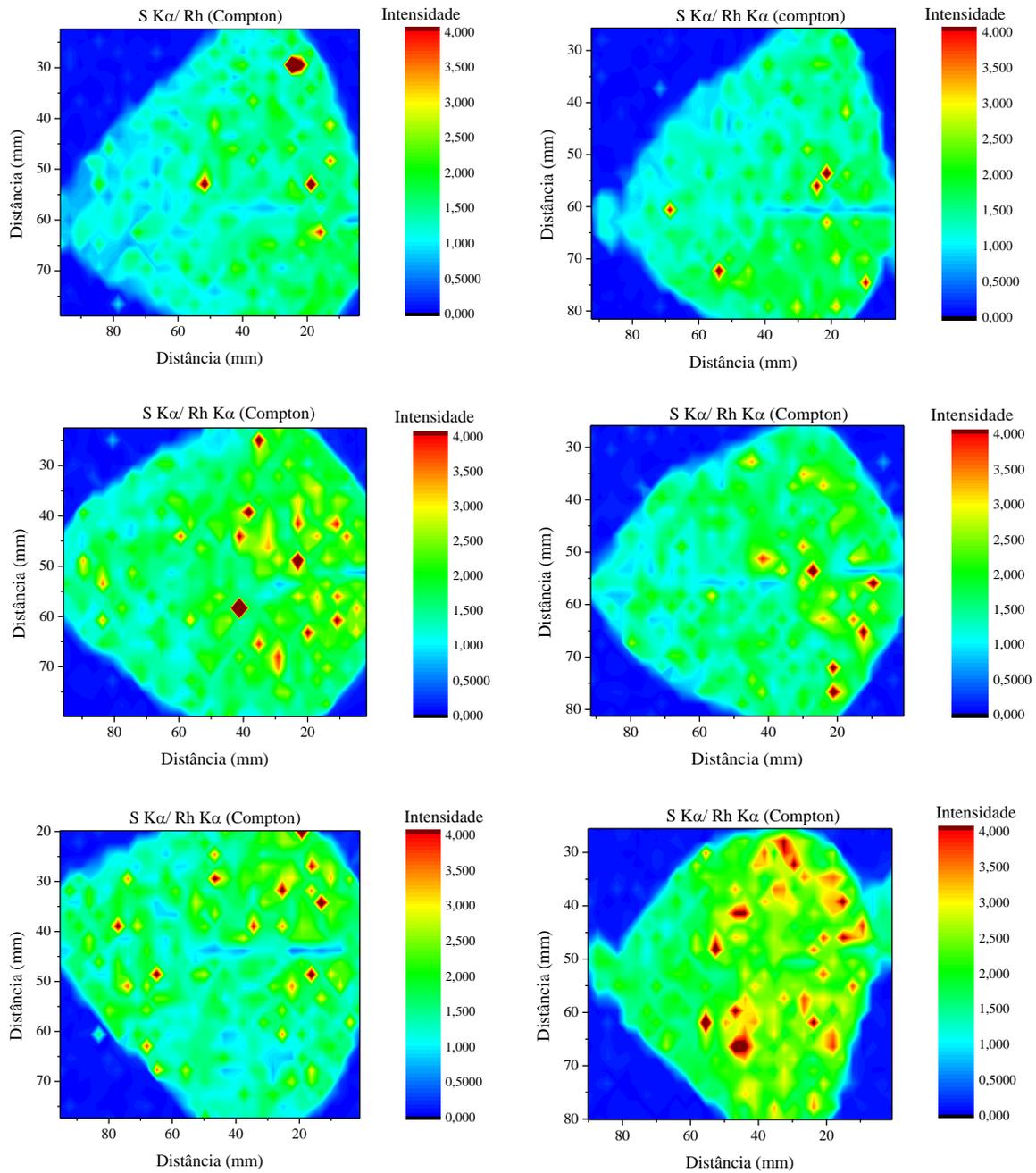


Figura 38 – Mapas de distribuição espacial de K e m folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS Tianá, obtidos por  $\mu$ -EDXRF. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30  $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh

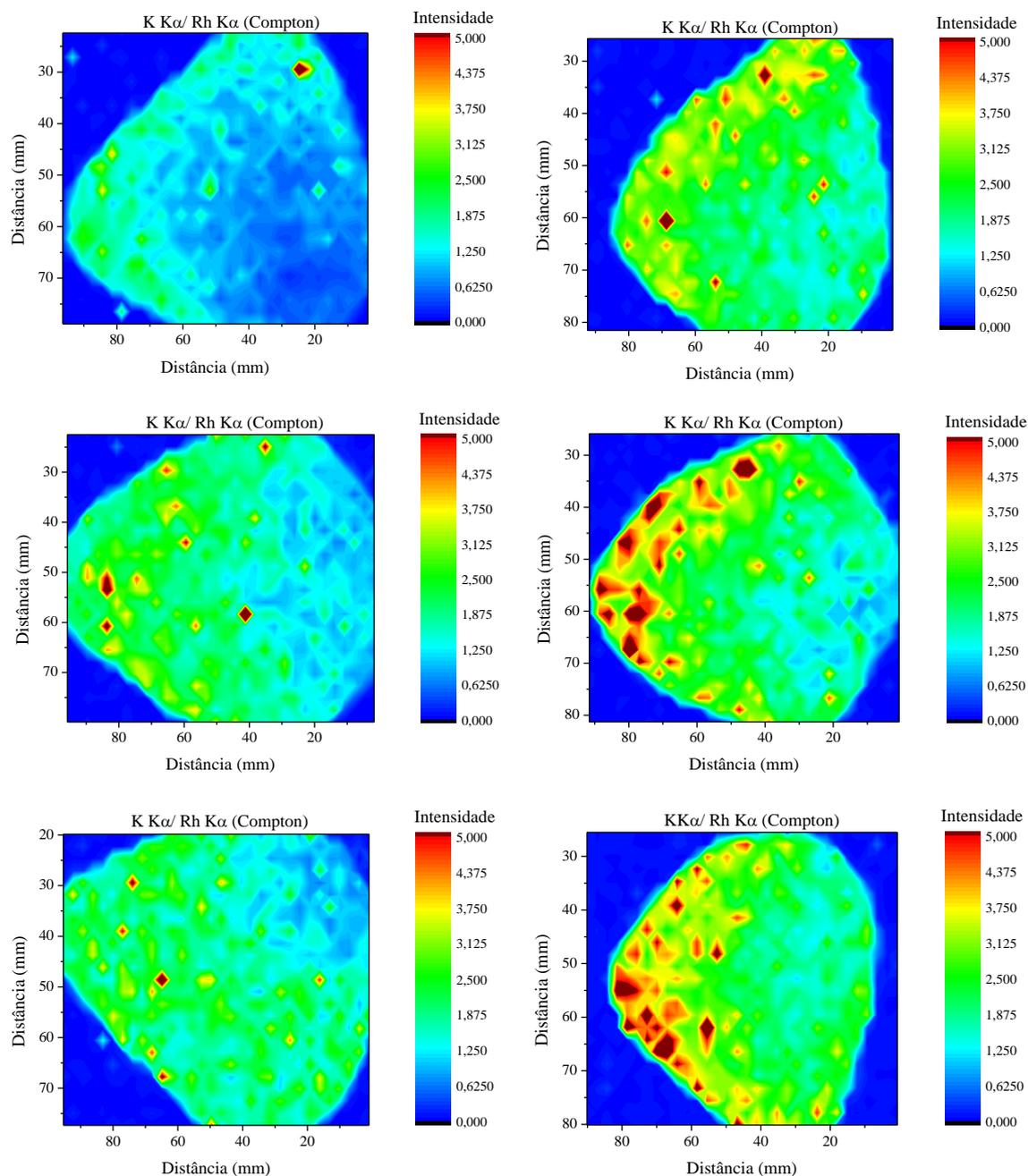
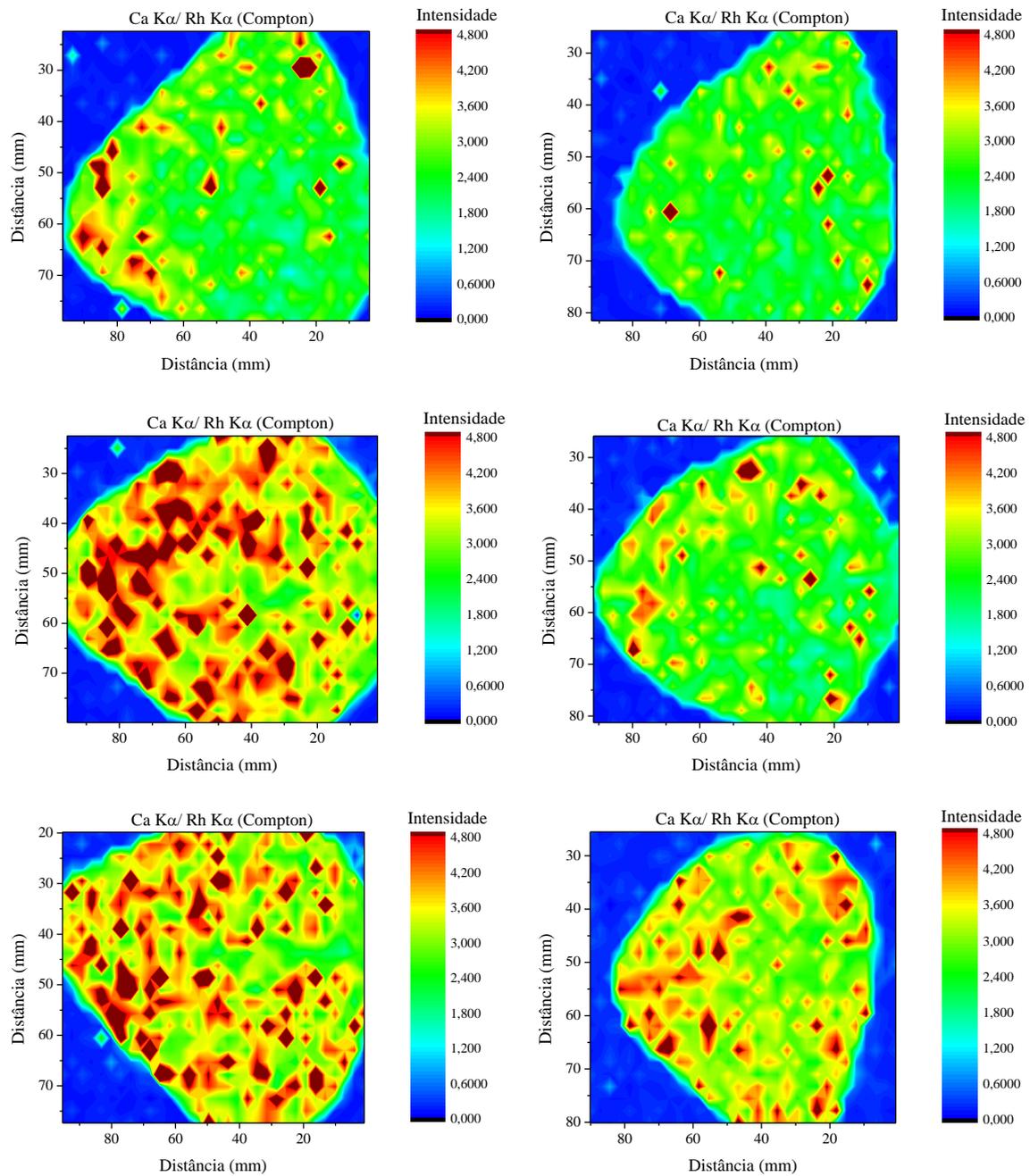


Figura 39 – Mapas de distribuição espacial de Ca em folhas de soja saudáveis (esquerda) e deficientes em fósforo (direita) da cultivar BRS Tianá, obtidos por  $\mu$ -EDX RF. Condições experimentais: feixe de raios X de 2 mm; 5 s de irradiação por ponto, em uma matriz de mapeamento 32 x 25 pontos; 45 kV e 30  $\mu$ A de tensão e corrente aplicados ao tubo com alvo de Rh



Outro ponto que deve ser destacado aqui é que as amostras, que foram submetidas ao mapeamento por  $\mu$ -EDXRF, foram secas previamente às análises para que as medidas fossem realizadas sob vácuo. Essa secagem pode ter alterado a distribuição elementar original, ocorrendo a migração dos íons num processo de redistribuição. No artigo de revisão sobre técnicas baseadas em raios X utilizadas para mapeamento elementar, visando à elucidação da ecofisiologia de plantas hiperacumuladoras, van der Ent et al.<sup>138</sup> afirmaram que os únicos métodos de preparo de amostras apropriados para microanálises elementares são aqueles baseados em criotécnicas. Estas são definidas como várias formas de criofixação, cujo objetivo é resfriar a amostra a uma temperatura baixa ( $< 150^\circ \text{C}$ ) o mais rápido possível. Após a criofixação, as amostras são analisadas congeladas na forma hidratada ou liofilizadas. Esses métodos preservam a distribuição, a forma química e a concentração de todos os elementos *in situ*. Todos os outros métodos de preparo de amostras, incluindo a secagem, a fixação química e a incorporação em resina, podem afetar de maneira significativa a distribuição e a forma química das espécies presentes na amostra.

Assim, embora as amostras tenham sido secas antes das análises e a distribuição dos elementos nas folhas possam ter sido alteradas, os mapas obtidos nessas condições de análise indicam que a distribuição dos elementos investigados não é homogênea e que há variações na composição, tanto entre folíolos de uma mesma planta, quanto entre plantas de um mesmo tratamento. Por esse motivo, definiu-se que a amostragem deveria ser realizada em todos os folíolos e de forma a cobrir toda a área dos mesmos, sem privilegiar uma determinada região da folha.

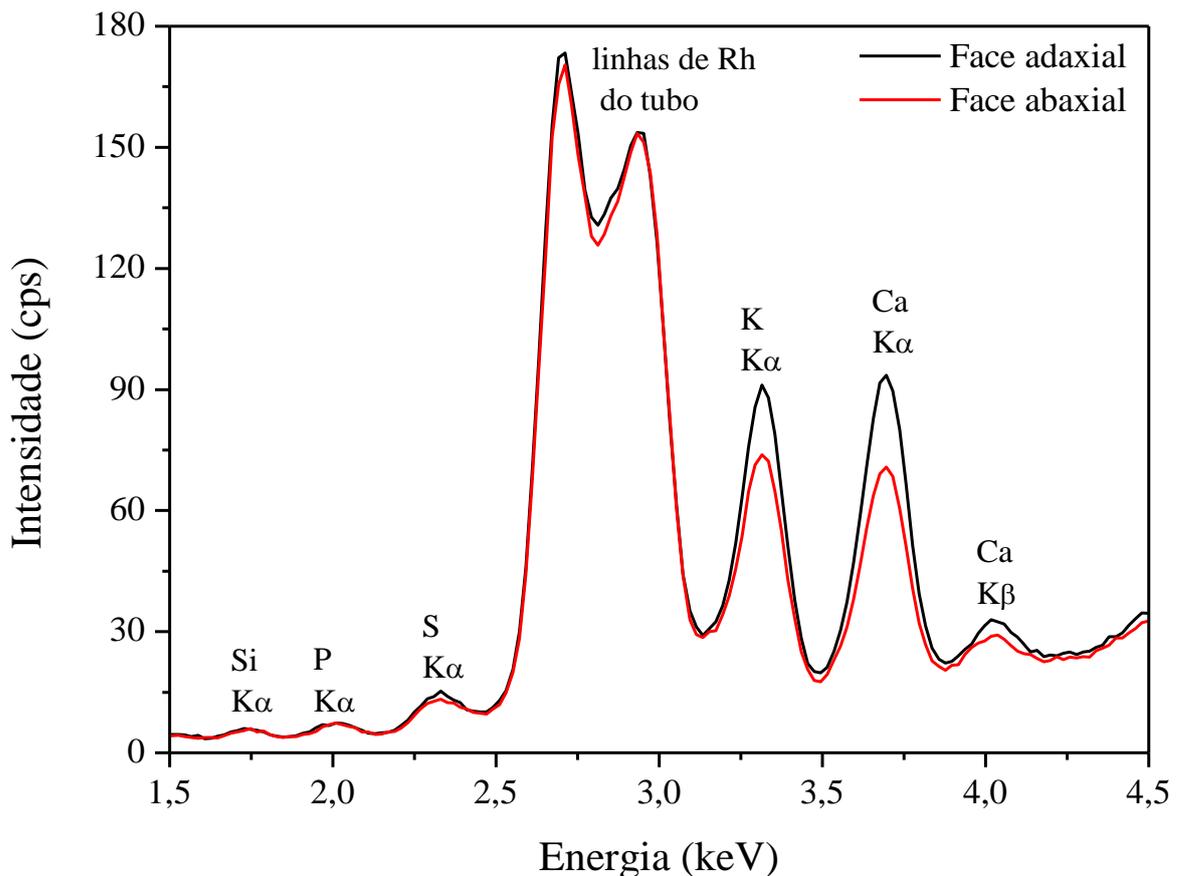
### **5.5. Análise direta de folhas frescas de soja por EDXRF portátil**

Folhas frescas de soja foram analisadas diretamente, empregando-se o equipamento portátil de EDXRF, conforme procedimento descrito em 4.4.4.1. As amostras empregadas nesses estudos foram coletadas de plantas cultivadas em sistema hidropônico em condições de casa de vegetação, conforme descrito em 4.1.2.1. Foram selecionadas amostras de plantas do tratamento controle e com deficiência induzida de P. As amostras foram retiradas da planta imediatamente antes das análises.

Para definir as melhores condições experimentais, foram realizados estudos preliminares a fim de melhorar a sensibilidade e satisfazer a condição de compromisso entre sensibilidade e frequência analítica. Assim, foram avaliados os seguintes parâmetros instrumentais: emprego de filtros, atmosfera de análise, tempo de irradiação por ponto, e também a face da folha a ser analisada (adaxial e abaxial).

Nos primeiros estudos, folhas de soja foram analisadas irradiando-se um ponto aleatório da face adaxial (superior) e o mesmo ponto na face abaxial por 60 s. As medidas foram feitas em triplicata ( $n = 3$ ). Observou-se um aumento na intensidade dos sinais analíticos de S, K e Ca quando a face adaxial da folha foi irradiada, como mostra a Figura 40. Esse aumento de sinal foi estimado em 15,85 % para o S  $K\alpha$  2,30 keV, 23,41 % para o K  $K\alpha$  3,31 keV, 32,09 % para o Ca  $K\alpha$  3,69 keV e 12,87 % para o Ca  $K\beta$  4,01 keV, quando comparados aos sinais da face abaxial. Para os demais elementos não houve diferenças significativas na intensidade do sinal analítico. Assim, foi escolhida a face adaxial para ser irradiada nas análises posteriores.

Figura 40 – Espectros médios ( $n = 3$ ) de emissão de raios X de um ponto aleatório da face adaxial da amostra e do mesmo ponto na face abaxial. Condições experimentais: feixe de raios X de 4,5 mm de diâmetro, 60 s de irradiação, 45 kV e 30  $\mu$ A de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh

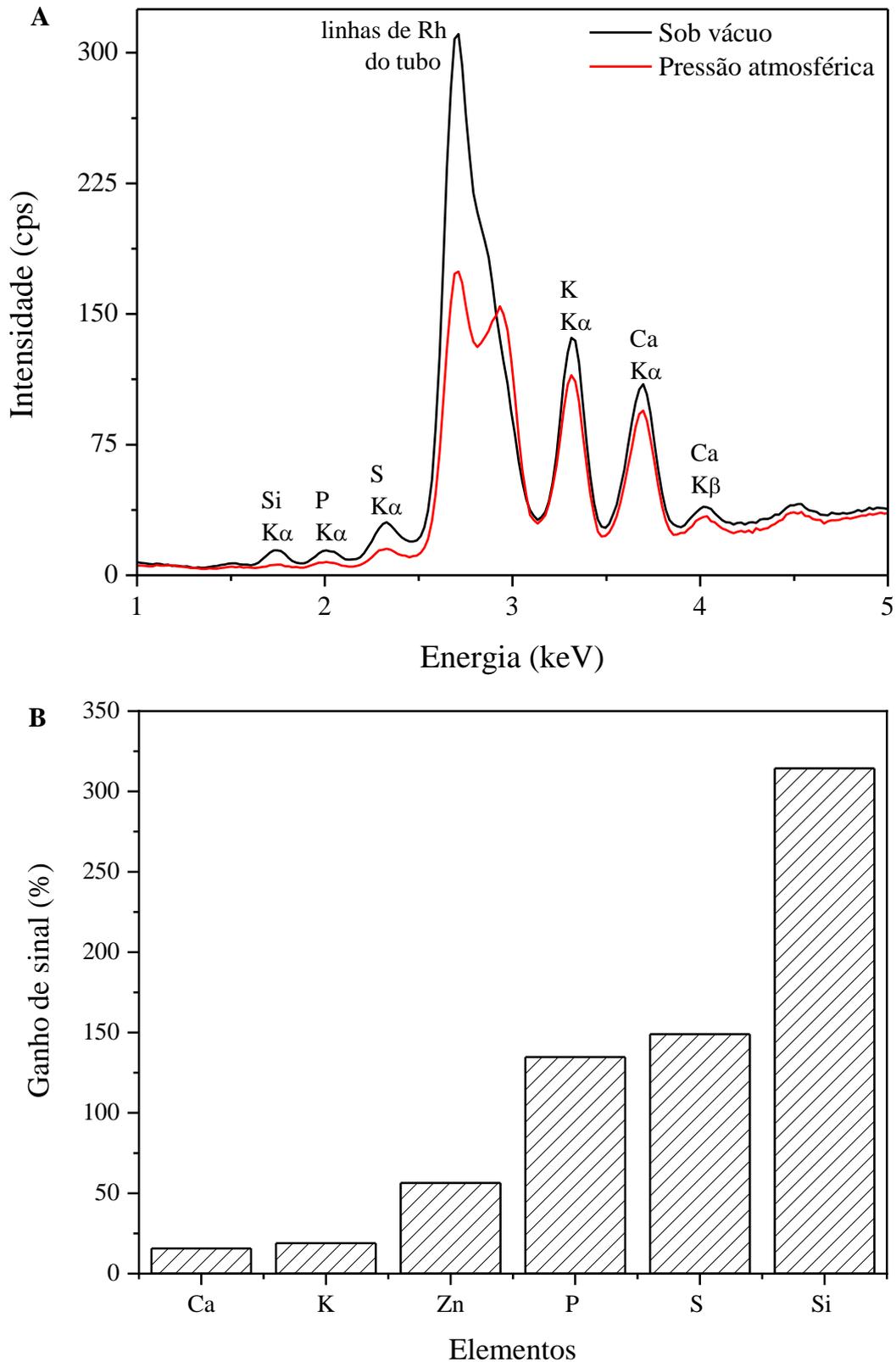


O uso de filtros (azul, amarelo, vermelho e verde) foi avaliado a fim de se verificar uma possível melhora na sensibilidade analítica. Para isso, selecionou-se um ponto aleatório de um folíolo de uma planta de soja do tratamento controle e este foi irradiado por 60 s, fazendo-se as medidas em triplicata ( $n = 3$ ). Os resultados mostram que o sinal líquido, representado pela intensidade de fluorescência em contagens por segundo, foi maior para a condição sem filtro do que se empregando os filtros (Figura 41).

A atmosfera das análises foi avaliada com o objetivo de se verificar a influência do vácuo sobre as medidas. Para isso, selecionou-se um ponto aleatório de um folíolo de uma planta de soja do tratamento controle e irradiou-se o mesmo por 60 s em ambas as condições, sob vácuo e pressão atmosférica. As medidas foram feitas em triplicata ( $n = 3$ ) e os resultados obtidos (Figura 42) mostram que, para as medidas realizadas sob vácuo, há um ganho de sinal expressivo ( $> 100\%$ ), principalmente para os elementos de menor número atômico ( $Z$ ) como P, S e Si.



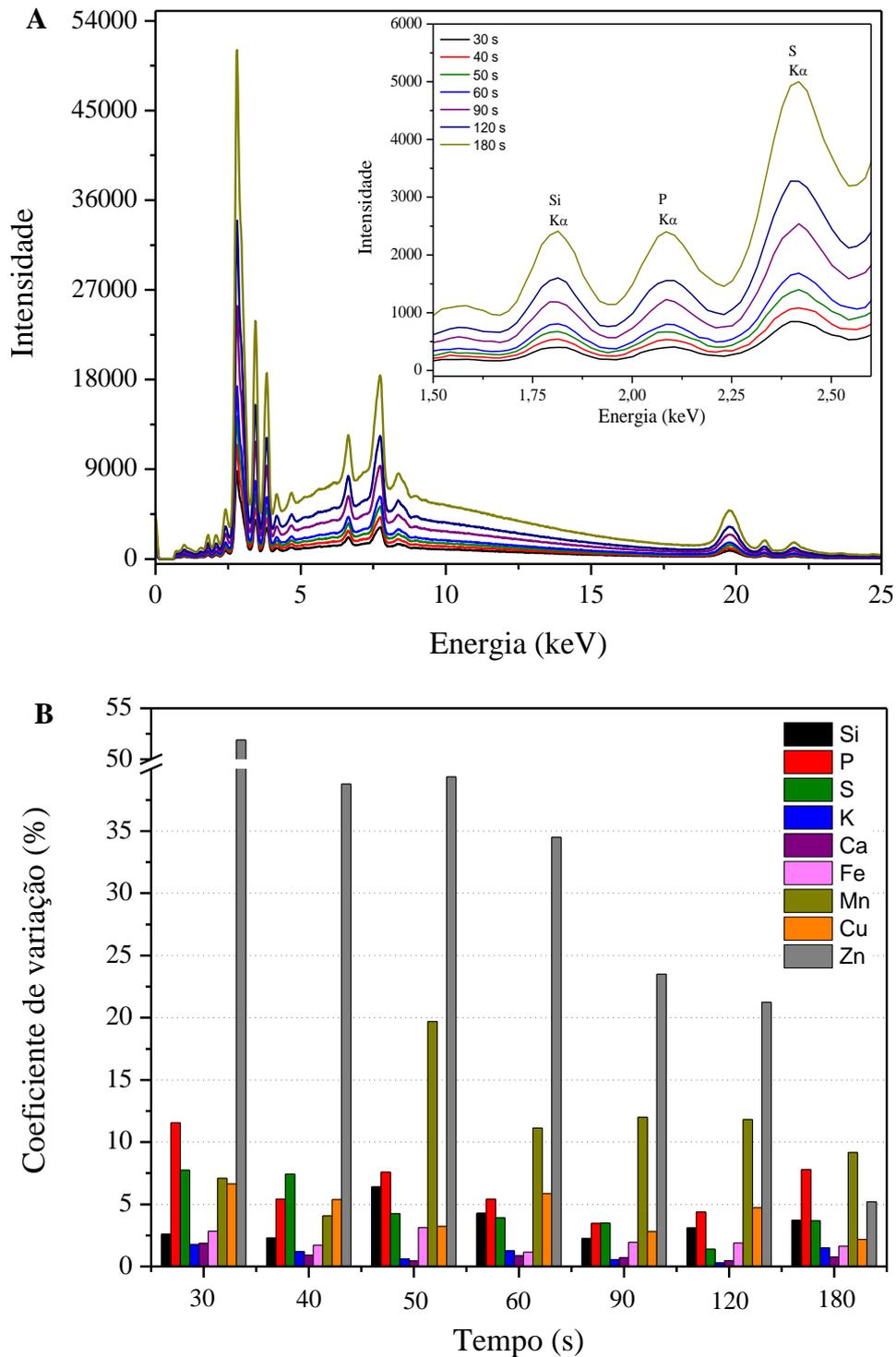
Figura 42 – Efeito da atmosfera de análise sobre o sinal analítico: (A) espectros médios ( $n = 3$ ) irradiando-se um ponto aleatório da amostra sob vácuo e pressão atmosférica; (B) ganho de sinal para os elementos de interesse. Condições experimentais: feixe de raios X de 4,5 mm de diâmetro, 60 s de irradiação, 45 kV e 30  $\mu$ A de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh



O tempo de irradiação por ponto também foi avaliado. Para isso, um ponto aleatório de um folíolo de uma planta de soja do tratamento controle foi selecionado e irradiado, variando-se os tempos de irradiação entre 30 e 180 s. As medidas foram feitas em quintuplicata ( $n = 5$ ). A partir dos resultados obtidos (Figura 43A) foi possível verificar os sinais de emissão aumentaram 30 %, em média, quando se variou o tempo de irradiação de 30 para 40 s, por exemplo, chegando até a 500 % de ganho de sinal com 180 s de irradiação. Em seguida, os coeficientes de variação foram estimados e os resultados (Figura 43B) mostraram que não houve uma correlação direta entre os tempos de irradiação e os coeficientes de variação estimados. Assim, a fim de satisfazer uma condição de compromisso entre o máximo sinal analítico e a frequência analítica, em condições experimentais com coeficientes de variação menores que 10 % para os elementos de interesse, selecionou-se o tempo de irradiação de 40 s. Esse tempo satisfaz a condição inicial entre sinal, frequência analítica e precisão. Os coeficientes de variação das medidas de intensidade de emissão de K, Ca, Si e P, foram menores que 6 %; para o S foi menor que 8%. Os dados para Zn não estão representados no gráfico, mas com 40 s de irradiação o coeficiente de variação foi estimado em 35 %.

Assim, definiram-se as condições experimentais mais adequadas para as análises posteriores: amostragem na face adaxial dos folíolos, irradiando-se cada ponto por 40 s, sem filtros e sob vácuo.

Figura 43 – Avaliação do tempo de irradiação por ponto analisado: (A) espectros médios ( $n = 5$ ) irradiando-se um ponto aleatório da amostra por 30, 40, 50, 60, 90, 120 e 180 s, respectivamente e (B) coeficientes de variação das medidas de intensidade de emissão dos elementos de interesse, exceto para o Zn. Condições experimentais: feixe de raios X de 4,5 mm de diâmetro, 45 kV e 30  $\mu$ A de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh



O número de pontos de amostragem foi avaliado a fim de se obter o número mínimo de pontos cujo coeficiente de variação (CV) das medidas de intensidade fosse inferior a 20 %

para a maioria dos elementos de interesse. Para isso, foram avaliados 6, 8, 10, 12 e 16 pontos aleatórios de três amostras de plantas do tratamento controle e três amostras de plantas do tratamento com deficiência induzida de fósforo. A partir dos resultados desse estudo, definiu-se que 12 pontos de amostragem eram suficientes para alcançar um CV menor que 20 % entre pontos de um mesmo folíolo para a maioria dos elementos. Embora tenham sido obtidos 36 espectros por folha, o processamento dos dados foi feito de forma a se obter um espectro médio por folíolo ( $n = 12$ ) e, em seguida, obteve-se um espectro médio por folha (espectro médio dos três folíolos). Esta estratégia de combinar os espectros individuais tem por objetivo minimizar os efeitos da falta de homogeneidade da distribuição espacial dos analitos de interesse nas folhas de soja, permitindo contornar os efeitos indesejados e obter um espectro mais representativo da amostra.

Com a estratégia de amostragem e as melhores condições experimentais definidas, 74 amostras de folhas de soja das duas cultivares, submetidas aos dois tratamentos, foram analisadas conforme o procedimento em 4.4.4.1. Os sinais de Ca, Cu, Fe, K, Mn, P, S, Si, Zn e espalhamento Compton foram detectados e a deconvolução dos picos foi feita e os dados obtidos foram corrigidos pelo tempo de análise (40 s) e pela corrente aplicada ao tubo de raios X (30  $\mu$ A). Após as análises por PXRF, as amostras foram secas e analisadas pelo método de referência, conforme 0. Para garantir a qualidade dos resultados, utilizou-se o CRM *NIST 1570a Spinach Leaves*, cujas frações de massa estão descritas na Tabela 7.

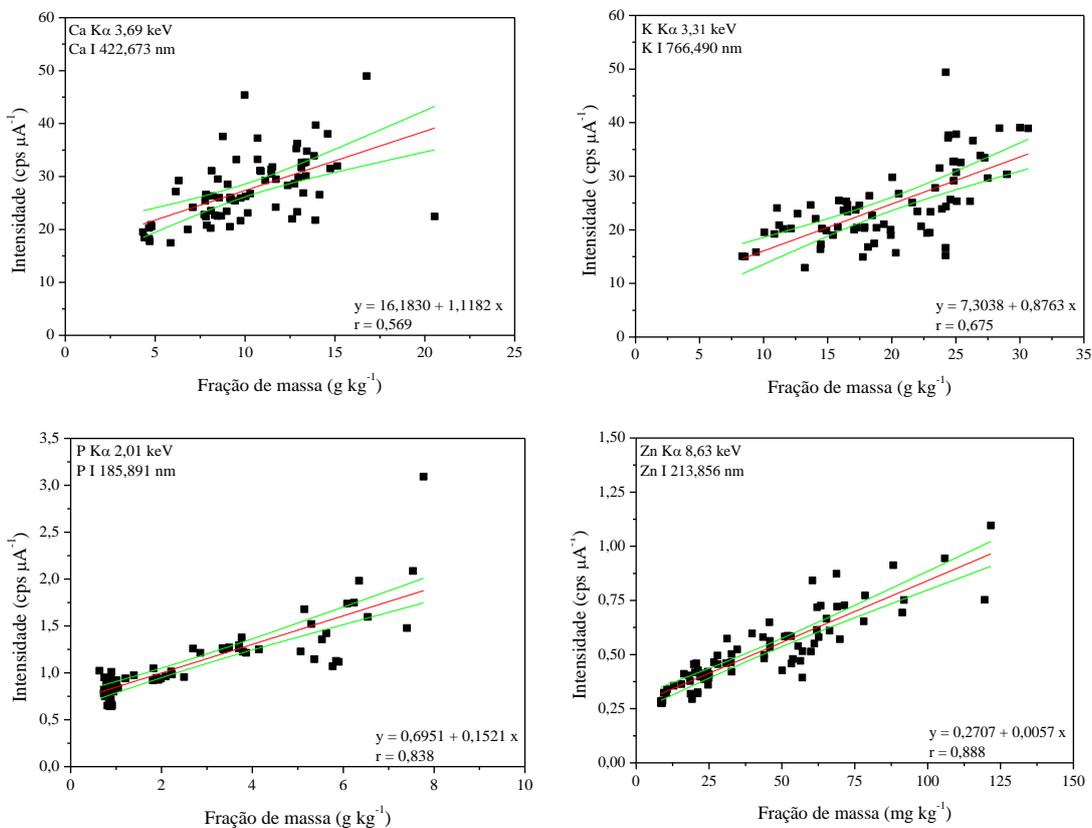
Tabela 7 – Frações de massa dos macro- e micronutrientes certificadas e determinadas pelo método de referência para o CRM *NIST 1570a*

Linhas de emissão (nm)	ICP OES	
	<i>NIST 1570a</i> certificada	<i>NIST 1570a</i> determinada* <sup>1</sup>
	Fração de massa (g kg <sup>-1</sup> )	
Ca I 422,673	15,26 ± 0,66	15,00 ± 0,22
Mg II 279,079	9,0	8,69 ± 0,10
K I 766,490	29,00 ± 0,26	29,29 ± 0,33
P I 185,891	5,187 ± 0,067	5,381 ± 0,262
S I 180,731	5,0	5,43 ± 0,23
	Fração de massa (mg kg <sup>-1</sup> )	
B I 208,957	37,7 ± 1,2	40,61 ± 0,73
Cu I 324,754	12,22 ± 0,86	10,13 ± 0,49
Zn I 213,856	82,3 ± 3,9	84,31 ± 0,80
Fe II 259,940	-	237,53 ± 5,82
Mn II 257,610	76,0 ± 1,2	68,80 ± 1,79

\*(n = 5)

Os gráficos de regressão com as correlações obtidas para Ca, K, P e Zn estão apresentadas na Figura 44. Os valores do coeficiente de correlação linear ( $r$ ) variaram de 0,569 para o Ca até 0,888 para o Zn. No Apêndice D desta tese estão disponíveis os demais gráficos de regressão com as correlações para o S, Fe, Mn e Cu.

Figura 44 – Gráficos de regressão entre as frações de massa obtidas pelo método de referência e as previstas por PXRf, para Ca, K, P e Zn nas amostras de folhas frescas de soja. Condições experimentais: feixe de raios X de 4,5 mm de diâmetro, 40 s de irradiação, 45 kV e 30  $\mu$ A de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh.



É possível observar que boas correlações foram obtidas apenas para P ( $r = 0,838$ ) e Zn ( $r = 0,888$ ). Para avaliar as incertezas nas previsões das frações de massa, foi estimada a raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP). Os valores de RMSEP foram calculados pela equação<sup>139</sup>:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}$$

onde:  $y_i$  é a fração de massa de referência determinada para a  $i$ -ésima amostra pelo método de referência,  $\hat{y}_i$  é o valor associado previsto pelo modelo e  $n$  é o número de amostras.

Os valores de RMSEP foram calculados para os elementos com maiores coeficientes de correlação linear, o P ( $r = 0,838$ ) e o Zn ( $r = 0,888$ ). Primeiramente, os valores de RMSEP foram estimados com os dados obtidos com PXRf corrigidos apenas pelo tempo e pela corrente aplicada ao tubo. Em seguida, fez-se a correção da espessura das amostras, *i.e.* os dados foram normalizados pelo espalhamento Compton (P/Rh e Zn/Rh). As correlações foram novamente estimadas e os valores de RMSEP para os valores corrigidos foram estimados. Os valores calculados de RMSEP são apresentados na Tabela 8. A partir destes valores, pode-se concluir que a correção de espessura diminui o erro de previsão do modelo para o Zn, enquanto que para o P, o valor calculado de RMSEP foi maior, ou seja, o erro do modelo de previsão foi maior após a correção. O P é um elemento de baixo número atômico e a amostra pode ser espessa o suficiente para que se atinja a condição de “espessura infinita”. No caso do Zn, a espessura infinita não é atingida, por isso, há melhora na correlação quando se faz a correção. Dessa forma, esse aumento no erro de previsão no caso do P pode ser devido a uma correção que não era necessária.

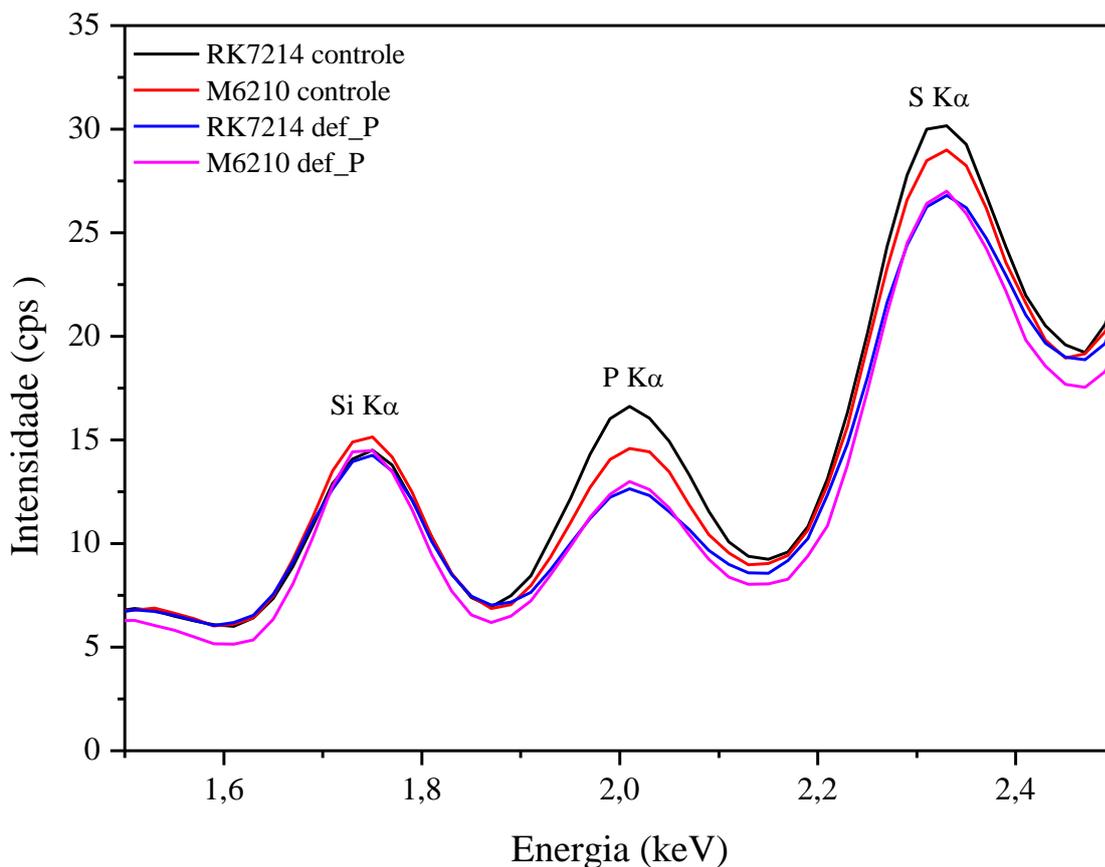
Cabe aqui lembrar que, nos gráficos apresentados, não há barras de erros verticais ou horizontais, pois em ambos os métodos de análises, PXRf e ICP OES, as medidas não foram realizadas com replicatas. No caso do PXRf, cada ponto de análise e/ou folíolo analisado não corresponde a uma réplica autêntica, assim como em Guerra *et al*<sup>49</sup>. Desse modo, não há como estimar desvios-padrão para as medidas. Por outro lado, no caso das análises pelo método de referência, não havia massa suficiente de amostra por folha para que a análise fosse feita com replicatas.

Tabela 8 – Coeficientes de correlação linear ( $r$ ) e raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP) estimados para as regressões com e sem correção de espessura da amostra

Elemento	Sem correção		Espessura corrigida	
	Coefficiente de correlação linear ( $r$ )	RMSEP	Coefficiente de correlação linear ( $r$ )	RMSEP
<b>P</b>	0,838	1,38	0,771	1,78
<b>Zn</b>	0,888	13,80	0,906	12,41

Com referência aos limites de detecção não foi possível estimá-los tomando por base as recomendações da IUPAC<sup>140</sup>. Em contrapartida, a Figura 45 mostra os fragmentos dos espectros obtidos por PXRF, que mostram duas amostras das cultivares RK7214 IPRO e M6210 IPRO com frações de massa de P menores que o nível crítico para soja ( $P \leq 1,6 \text{ g kg}^{-1}$ ), que é uma indicação da capacidade de detecção com sinais de intensidade muito maiores que ruído. Na figura ainda é possível observar as diferenças de intensidade entre as amostras deficientes em P e com fornecimento adequado (tratamento controle).

Figura 45 – Fragmentos dos espectros médios ( $n = 36$ ) de folhas frescas de soja obtidos por PXRF. São apresentadas as intensidades dos sinais de P para as duas amostras com menores frações de massa deste elemento e duas amostras do tratamento controle para fins de comparação. Condições experimentais: feixe de raios X de 4,5 mm de diâmetro, 40 s de irradiação, 45 kV e 30  $\mu\text{A}$  de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh



Cabe aqui destacar ainda que, nas análises por PXRF, os pontos de amostragem compreendiam apenas o limbo dos folíolos de soja, enquanto que nas análises pelo método de referência as amostras foram cominuídas e/ou digeridas completamente, incluindo a nervura

central. Isto pode ser um dos principais fatores das baixas correlações obtidas, principalmente para Ca e K. Outros fatores podem ter contribuído para as baixas correlações dos outros elementos, são eles: i) a distribuição espacial não-homogênea dos elementos na amostra, que foi verificada nos mapas microquímicos construídos; ii) a baixa representatividade da amostragem, em termos de área foliar amostrada (vide Tabela 9); iii) a ausência de métodos de amostragem e calibração apropriados, iv) a influência da umidade nas análises e v) os limites de detecção, eventualmente, não apropriados.

Tabela 9 – Área foliar média das amostras analisadas por PXRF

<b>Cultivar</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Área foliar média (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Área foliar analisada (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>RK7214 IPRO</b>	Controle	50 ± 7	0,54
	Deficiência induzida de P	34 ± 7	0,54
<b>M6210 IPRO</b>	Controle	37 ± 7	0,54
	Deficiência induzida de P	16 ± 4	0,54

Para análises quantitativas, métodos descritos na literatura utilizados com sucesso para análises de materiais vegetais podem, eventualmente, ser avaliados para a diagnose foliar da soja com PXRF, como: i) o método da curva de calibração<sup>49</sup>, ii) o método dos parâmetros fundamentais (FP)<sup>141</sup>, iii) o método de emissão-transmissão<sup>79</sup> e iv) calibrações multivariadas<sup>142</sup>. No entanto, tais métodos não foram avaliados no âmbito desta tese.

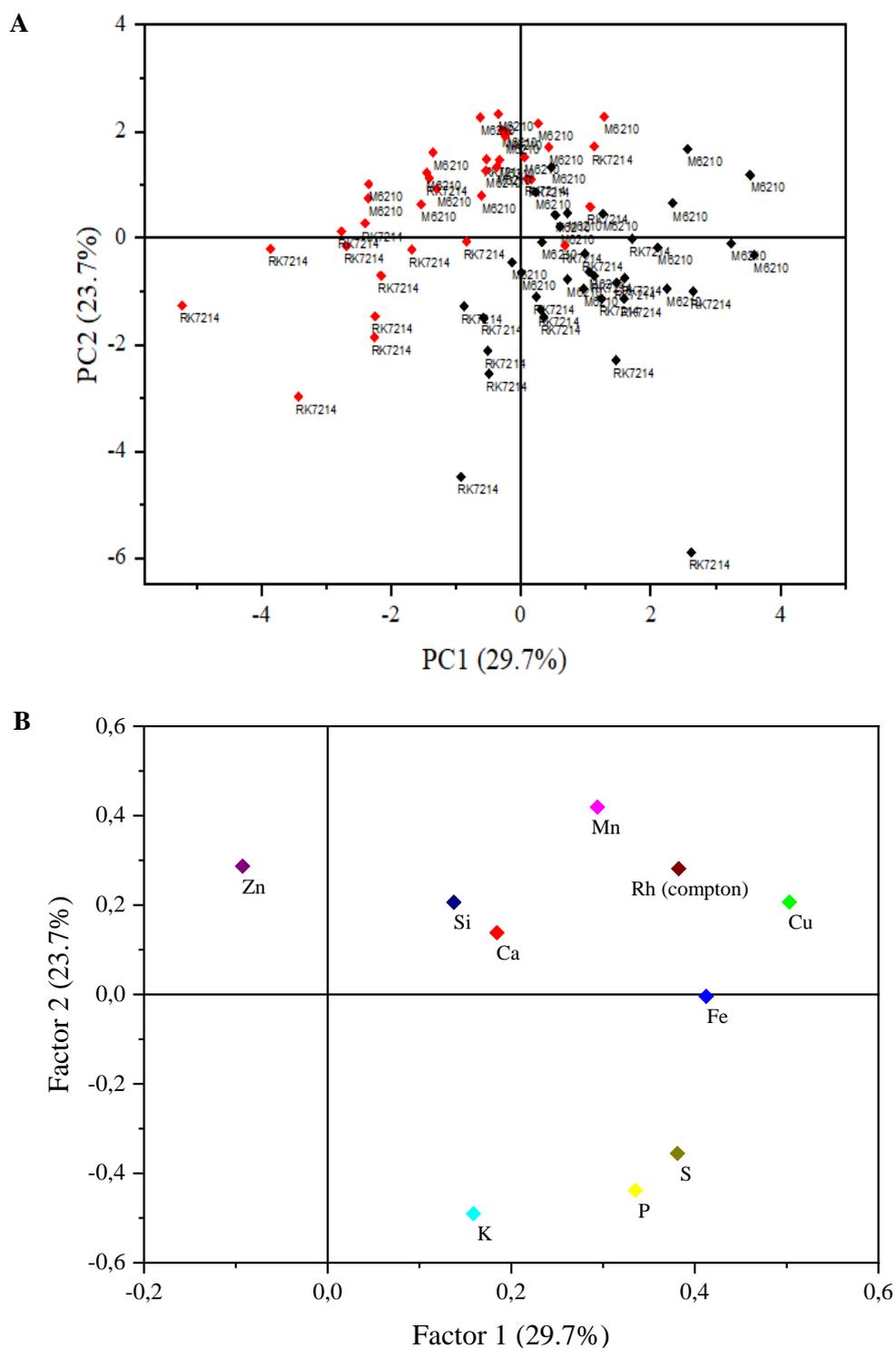
Métodos quimiométricos de classificação também têm sido empregados nas análises de plantas a fim de utilizar as informações obtidas, sem a necessidade de se ter um resultado quantitativo. Dois métodos quimiométricos foram utilizados apenas para mostrar a possibilidade de classificar, ou separar, as amostras com base na composição elementar, foram eles: a análise de componentes principais (PCA) e a modelagem independente por analogia de classes (SIMCA). Esses métodos foram escolhidos porque estão bem estabelecidos, disponíveis comercialmente em softwares utilizados para análises estatísticas (Pirouette<sup>®</sup>) e têm sido utilizados com sucesso em modelos de classificação.

PCA é um método multivariado não-supervisionado que leva em consideração a variação dos valores dos atributos (contagens líquidas). Isso permite verificar a existência de padrões e possibilita agrupá-los em diferentes clusters. Os sinais detectados de Ca, Cu, Fe, K,

Mn, P, S, Si, Zn e Rh (espalhamento Compton) foram utilizados na análise de componentes principais e permitiram a classificação das amostras em grupos. A Figura 46 mostra os gráficos de *scores* e *loadings* da PCA realizada para as amostras analisadas por PXRF.

O gráfico de *scores* da PCA mostra a separação entre os dois grupos de amostras: o grupo controle e as amostras obtidas a partir das plantas deficientes em P. O gráfico de *loadings* explica quais foram os elementos responsáveis por esta separação e como esses elementos interagem entre si. A primeira componente principal explica cerca de 29,7 % da variância total e, mais de 90 % da variância é explicada pelas primeiras 5 componentes principais. Dessa forma, pode-se concluir que a PCA pode ser utilizada em conjunto com EDXRF para identificar e classificar as amostras de soja como saudáveis ou deficientes em P.

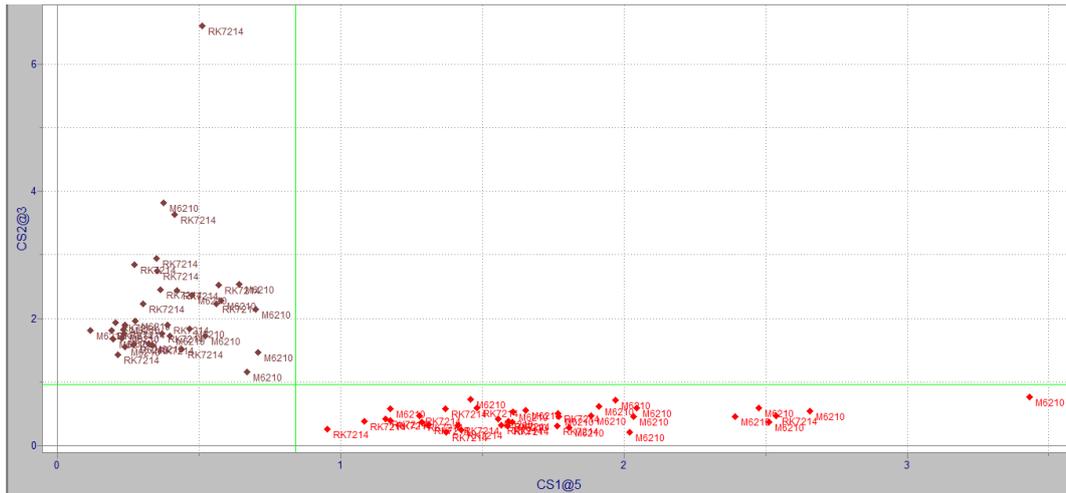
Figura 46 – Gráficos de *scores* (A) e *loadings* (B) para a primeira e segunda componentes principais da PCA



SIMCA é um algoritmo que permite construir modelos que classificam amostras em grupos discretos. Este método se baseia no conceito de proximidade, a suposição de que, se um conjunto de medições para uma amostra desconhecida é muito semelhante à de um grupo

específico, então a amostra desconhecida provavelmente será um membro desse grupo. O método SIMCA encontra eixos de componentes principais no espaço de medição multivariado para cada categoria. Uma amostra desconhecida é classificada como pertencente a um grupo específico se estiver “mais próxima” do grupo e dentro do limite permitido. A Figura 47 mostra o gráfico das análises de SIMCA.

Figura 47 – Gráfico de SIMCA para duas classes



Os resultados obtidos permitem concluir que ferramentas quimiométricas de classificação multivariada, tanto a PCA como o SIMCA, podem ser utilizadas em conjunto com os métodos de análise direta por PXRf e constituir alternativas às análises quantitativas, a fim de avaliar o estado nutricional das culturas de interesse econômico. Essas ferramentas podem auxiliar nas tomadas de decisão em relação à uma amostragem mais detalhada de uma determinada área plantada ou até mesmo sobre a aplicação de fertilizantes, por apresentarem confiabilidade e rapidez na obtenção de resultados.

De forma geral, pode-se concluir que os resultados obtidos nas análises diretas de folhas frescas de soja com PXRf, mostram que esta técnica tem potencial para avaliar o estado nutricional da soja. Embora os resultados das análises quantitativas não tenham sido satisfatórios, as correlações obtidas para P e Zn indicam que PXRf poderá ser apropriada para a determinação desses elementos em campo. Para isso, estratégias de amostragem e métodos de calibração devem ser avaliados para que os efeitos de matriz sejam contornados e as diferenças de espessura e umidade das amostras não interfiram nos resultados.

## 6. CONCLUSÕES

Tanto a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) como a espectrometria de fluorescência de raios X dispersiva em energia (EDXRF), apresentaram resultados promissores que permitem inferir que, se forem definidas estratégias de amostragem e métodos de calibração apropriados, as duas técnicas podem ser utilizadas para acessar o status nutricional da soja em tempo real.

LIBS mostrou ser uma técnica capaz de produzir mapas microquímicos com boa resolução espacial, rapidez e com relativa facilidade para cobrir áreas grandes (cm x cm). Mapas microquímicos de Ca e Mg em folhas frescas de soja foram construídos, mas não forneceram as informações esperadas sobre a distribuição elementar dos nutrientes na amostra, uma vez que, a partir deles, não foi possível definir uma estratégia de amostragem para estudos posteriores. Além disso, nenhuma abordagem quantitativa foi feita, pois há vários fatores que devem ser levados em consideração antes de qualquer tentativa de quantificação, tais como a influência da umidade no processo de ablação e na formação do plasma, as estratégias de amostragem e de calibração mais apropriadas.

A prova de conceito com LIBS para diagnose foliar da soja apresentou resultados igualmente promissores. Os resultados obtidos indicam que LIBS pode ser uma ferramenta muito útil na determinação de macro- (Ca, Mg, P) e micronutrientes (Fe, Mn) em folhas frescas de soja, por sua rapidez e versatilidade. Ainda que resultados quantitativos não tenham sido obtidos nas condições experimentais empregadas, estas podem ser um ponto de partida para estudos mais aprofundados de amostragem e de calibração buscando resultados que orientem o uso de fertilizantes de maneira mais eficiente e que permitam tomar decisões em tempo real.

De um modo geral, os resultados obtidos com LIBS mostram avanços realizados tanto na parte de construção de mapas microquímicos como na diagnose foliar em si.

Os mapas obtidos por  $\mu$ -EDXRF também forneceram informações muito valiosas e que possibilitaram a definição de uma estratégia de amostragem para as análises diretas por PXRF. Os mapas construídos para Ca, K, P e S indicaram que a distribuição desses elementos não é homogênea e, além disso, há variações na composição tanto entre folíolos de uma mesma planta quanto entre plantas de um mesmo tratamento. Assim, a estratégia de amostragem definida foi amostrar todos os folíolos, de forma a cobrir toda a sua área, sem privilegiar nenhuma região específica da folha.

Com a estratégia definida, as análises diretas de folhas frescas de soja por PXRF foram realizadas, e, a partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que esta técnica tem potencial para avaliar o estado nutricional da soja em tempo real e *in situ*. Embora a análise quantitativa tenha boas correlações apenas para P e Zn, os resultados indicam que PXRF pode ser apropriada para a determinação desses elementos em campo. Para isso, estratégias de amostragem e métodos de calibração devem ser avaliados a fim de minimizar ou contornar os efeitos de matriz assim como as diferenças de espessura e umidade das amostras.

Ferramentas quimiométricas de classificação multivariada, como PCA e SIMCA, foram avaliadas e os resultados mostraram a possibilidade de utilizá-las em conjunto com os métodos de análise direta por PXRF. Esta associação é uma alternativa às análises quantitativas, podendo auxiliar nas tomadas de decisão em relação à uma amostragem mais apropriada de uma determinada área plantada ou até mesmo sobre a aplicação ou não de fertilizantes.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Cabe aqui fazer algumas considerações sobre o trabalho desenvolvido no âmbito do projeto de tese de doutorado e também sobre algumas perspectivas futuras.

Começando com LIBS, o primeiro grande desafio a ser superado neste trabalho foi a baixa (ou nenhuma) resistência mecânica das folhas secas de soja aos pulsos do laser. Nos primeiros estudos com LIBS, apenas 1 pulso de laser (Nd:YAG @1064 nm, 5 ns, 10 Hz) com baixa fluência ( $15 \text{ J cm}^{-2}$ ) já era suficiente para causar fragmentação da amostra e tornar a tarefa de incidir o próximo pulso de laser sobre a mesma impossível. A partir disso, decidiu-se trabalhar com folhas frescas de soja, as quais apresentavam alguma resistência mecânica: os pulsos de laser perfuravam-nas, mas não as fragmentavam mais, sendo possível analisar pontos subsequentes na mesma amostra.

Uma vez superado este desafio, as análises de folhas frescas de soja empregando LIBS mostraram o potencial e a versatilidade da técnica, que pode ser utilizada tanto para análises exploratórias (*screening*), quanto para mapeamento e análises quantitativas, desde que haja métodos de calibração apropriados para quantificação dos elementos de interesse na amostra. Os resultados obtidos no mapeamento das folhas frescas de soja mostram que LIBS é apropriada para mapear áreas grandes (cm x cm), de forma rápida e com boa resolução. Entretanto, devido à baixa resistência da folha de soja, apenas Ca e K foram mapeados. Isto porque, com um pulso de laser por ponto de amostragem, estes foram os únicos elementos que apresentaram intensidade de emissão suficientes para determinação da área do pico. Para fins de exemplo e comparação, cabe aqui mencionar que, em estudos prévios do grupo, folhas secas de cana-açúcar foram mapeadas incidindo-se 5 pulsos de laser (Nd:YAG @1064 nm, 5 ns, 10 Hz,  $50 \text{ J cm}^{-2}$ ) por ponto de amostragem, sem que a amostra fosse perfurada. Nas condições experimentais mencionadas, mapas microquímicos de P, Ca, Mg, Fe, Mn, B e Si foram construídos. Assim, pode-se concluir que a resistência mecânica da amostra é um fator importante e que pode determinar o sucesso do emprego de LIBS para fins de mapeamento.

Uma característica interessante desta técnica, que não foi discutida nesta tese, é a possibilidade de se fazer análises em profundidade, além das análises superficiais. Assim, LIBS pode ser usada na construção de mapas em três dimensões (x-y-z, 3D) além dos mapas construídos em duas dimensões (x-y, 2D).

Na prova de conceito realizada com folhas frescas de soja e LIBS (laser de Nd:YAG @1064 nm, 5 ns, 5 Hz, 50 J cm<sup>-2</sup>, 25 pulsos acumulados por linha, 12 linhas por folíolo, 3 folíolos por planta, 30 plantas = 1 espectro médio), os resultados mostram que o acúmulo de pulsos é uma estratégia que pode contornar, de certa forma, os efeitos da microheterogeneidade intrínseca dos elementos na amostra e aumentar a sensibilidade no que diz respeito à detecção de mais elementos. Com essa estratégia, foi possível detectar P, Fe, Mn, Zn e Si, além do Ca e Mg. Além disso, os espectros obtidos mostram que há uma variabilidade muito grande na distribuição espacial dos elementos nas amostras. Há grande variação entre linhas amostradas de um mesmo folíolo, entre folíolos de uma mesma planta e entre plantas. Espera-se que esses resultados possam, não apenas comprovar a variabilidade entre plantas que já era esperada, mas também fomentar a discussão sobre a quebra de paradigma da amostragem no campo. Os protocolos de amostragem das grandes culturas de interesse econômico brasileiras foram propostos há muitos anos e precisam ser revistos. Os resultados apresentados nesta tese, em conjunto com as informações que ainda podem ser extraídas dos dados obtidos, podem contribuir de forma significativa, tanto para a discussão quanto para a mudança efetiva desses protocolos. Neste momento, no entanto, pode-se afirmar que a estratégia de se misturar as amostras é ainda a melhor opção para se obter um diagnóstico mais preciso e confiável para a cultura da soja.

Outro ponto que deve ser mencionado é a baixa disponibilidade comercial de equipamentos LIBS portáteis visando às análises em campo. Os equipamentos disponíveis hoje no mercado não atendem às necessidades e às demandas das análises diretas de plantas *in situ*, seja pelas baixas energias dos *lasers* empregados (~50 mJ) ou pelos espectrômetros, que apresentam baixa resolução ou faixa espectral limitada. Desse modo, é necessário que esses equipamentos sejam aprimorados a fim de atingir um desempenho analítico mínimo para que seja enfim levado a campo. Por outro lado, a espectrometria de fluorescência de raios X já está mais avançada em termos de instrumentação portátil. Nesta tese, um equipamento portátil (Tracer III-SD, alvo de Rh, 4 W, 45 kV, 30 µA, SDD) foi empregado para análise direta de folhas frescas de soja). O desempenho analítico desse equipamento é comparável aos instrumentos de EDXRF de bancada.

Previamente às análises com o equipamento portátil, folhas secas de soja foram mapeadas por µ-EDXRF (Orbis PC, 50 W, 50 kV, SDD) e mapas microquímicos de P, S, Ca e K foram construídos com sucesso. Como os elementos não são distribuídos homogeneamente nos folíolos e a distribuição dos elementos varia entre folíolos

de uma mesma planta, definiu-se amostrar os três folíolos de forma a cobrir toda a área, sem privilegiar uma determinada região da folha. Aqui, cabe mencionar a facilidade e rapidez que os mapas são obtidos. Além disso, o equipamento mostra a construção dos mapas em tempo real. As amostras foram analisadas sob vácuo, a fim de aumentar a sensibilidade para os elementos de menor número atômico (P e S, por exemplo). Entretanto, no procedimento de secagem, os elementos podem ter sofrido migração e/ou redistribuição, o que pode ter alterado a distribuição original. Esse é um ponto que deve ser analisado e, seguindo-se as recomendações, novos mapas devem ser construídos empregando-se outros métodos de preparo de amostra que preservem a distribuição elementar espacial original. Há possibilidade, ainda, de se fazer o mapeamento de folhas frescas de soja, ou seja, um mapeamento *in vivo*, empregando-se esse equipamento com atmosfera de He, a fim de minimizar os efeitos dos gases atmosféricos sobre os sinais dos elementos mais leves.

As análises diretas de folhas frescas de soja empregando PXRF (feixe de raios X de 2 mm, 40 s de irradiação por ponto, 12 pontos por folíolo, 36 pontos de amostragem por planta, 74 plantas) mostraram a relativa facilidade e rapidez em se obter informação analítica de boa qualidade. As intensidades de fluorescência (cps) foram correlacionadas às frações de massa obtidas pelo método de referência (decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas seguida da determinação dos elementos por ICP OES) e boas correlações foram obtidas para P (0,838) e Zn (0,888). Esses resultados permitem inferir que a XRF pode ser adequada para a quantificação/determinação desses elementos no campo. Os sinais de S, Ca, K, Fe, Mn e Cu foram identificados, entretanto não houve boa correlação com os valores determinados pelo método de referência. Isso pode ser devido a diversos fatores, como i) baixa representatividade da amostragem, ii) método de calibração não apropriado ou ausente; iii) limites de detecção, eventualmente, não apropriados e iv) amostragem realizada por PXRF somente no limbo dos folíolos (no método de referência foram analisadas folhas inteiras).

Embora as correlações tenham sido baixas do ponto de vista analítico, elas são aceitáveis do ponto de vista agrônomo. Segundo especialistas em Agricultura de Precisão, correlações acima de 0,70 já são suficientes para uma tomada de decisão sobre uma amostragem mais detalhada da área avaliada, ou até mesmo sobre a aplicação ou não de fertilizantes na área em questão.

Por fim, pode-se afirmar que os resultados obtidos nesta tese indicam a viabilidade prática e técnica do uso de ambas as técnicas, LIBS e EDXRF, para fins de diagnose da cultura da soja. Pode-se afirmar também que os resultados apresentados são promissores, em termos de análise qualitativa, e em termos de análise quantitativa, tanto a instrumentação como os parâmetros experimentais aqui descritos, podem servir como ponto de partida para estudos mais aprofundados de amostragem e também de calibração.

**REFERÊNCIAS**

- 1 MALAVOLTA, E.; VITTI, G.; OLIVEIRA, S. **Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios, métodos e técnicas de avaliação do estado nutricional**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997.
- 2 MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2006.
- 3 ARRUDA, M. A. Z. **Trends in sample preparation**. New York: Nova Publishers, 2007.
- 4 KRUG, F.; ROCHA, F. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2016. 572 p.
- 5 NOMURA, C. S.; SILVA, C. S. D.; OLIVEIRA, P. V. Solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry: a review. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 104-113, 2008.
- 6 LIU, Y. et al. In situ analysis of major and trace elements of anhydrous minerals by LA-ICP-MS without applying an internal standard. **Chemical Geology**, Amsterdam, v. 257, n. 1-2, p. 34-43, 2008.
- 7 GUERRA, M. B. et al. Biomonitoring of lead in Antarctic lichens using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 26, n. 11, p. 2238-2246, 2011.
- 8 COMPERNOLLE, S. et al. Direct determination of Pd, Pt and Rh in fire assay lead buttons by laser ablation-ICP-OES: automotive exhaust catalysts as an example. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 26, n. 8, p. 1679-1684, 2011.
- 9 GILON, N. et al. A matrix effect and accuracy evaluation for the determination of elements in milk powder LIBS and laser ablation/ICP-OES spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 401, n. 9, p. 2681-2689, 2011.
- 10 JANTZI, S. C.; ALMIRALL, J. R. Characterization and forensic analysis of soil samples using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 400, n. 10, p. 3341-3351, 2011.
- 11 MARGUI, E.; QUERALT, I.; HIDALGO, M. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 362-372, 2009. Disponível em: <Go to ISI>://000264429400016>.
- 12 LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. **Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 46 p.
- 13 COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Safra 2017/18. Sétimo levantamento Abril, 2018. v. 5, n. 7. Brasília, DF: CONAB, 2018. ISSN 2318-6852.
- 14 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. São Paulo, Disponível em: <<http://www.abiove.org.br/>>. Acesso em: 13 out. 2018.
- 15 SINGH, J. P.; THAKUR, S. N. **Laser-induced breakdown spectroscopy**. Amsterdam: Elsevier, 2007.
- 16 RADZIEMSKI, L.; CREMERS, D. **Handbook of Laser Induced Breakdown Spectroscopy**. New York: Wiley, 2006.

- 17 PENG, J. et al. Challenging applications for multi-element analysis by laser-induced breakdown spectroscopy in agriculture: A review. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 85, p. 260-272, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993615301278>>.
- 18 MIZIOLEK, A. W.; PALLESCHI, V.; SCHECHTER, I. **Laser induced breakdown spectroscopy**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. ISBN 1139458310.
- 19 TOGNONI, E. et al. Quantitative micro-analysis by laser-induced breakdown spectroscopy: a review of the experimental approaches. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 57, n. 7, p. 1115-1130, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854702000538>>.
- 20 STAVROPOULOS, P. et al. Calibration Measurements in laser-induced breakdown spectroscopy using nanosecond and picosecond lasers. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 59, n. 12, p. 1885-1892, 2004/12/01/ 2004. ISSN 0584-8547. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854704002538>>.
- 21 HAHN, D. W.; OMENETTO, N. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). Part I: Review of Basic Diagnostics and Plasma-Particle Interactions: Still-Challenging Issues within the Analytical Plasma Community. **Applied Spectroscopy**, Painfield, v. 64, n. 12, p. 335A-336A, 2010. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1366/000370210793561691>>.
- 22 CREMERS, D. A.; CHINNI, R. C. Laser-induced breakdown spectroscopy-capabilities and limitations. **Applied Spectroscopy Reviews**, New York, v. 44, n. 6, p. 457-506, 2009.
- 23 SEZER, B.; BILGE, G.; BOYACI, I. H. Capabilities and limitations of LIBS in food analysis. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 97, p. 345-353, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993617302753>>.
- 24 MARKIEWICZ-KESZYCKA, M. et al. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for food analysis: A review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 65, p. 80-93, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224417300377>>.
- 25 POŘÍZKA, P. et al. On the utilization of principal component analysis in laser-induced breakdown spectroscopy data analysis, a review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 148, p. 65-82, 2018/10/01/ 2018. ISSN 0584-8547. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854718301526>>.
- 26 KAISER, J. et al. Trace elemental analysis by laser-induced breakdown spectroscopy—Biological applications. **Surface Science Reports**, Amsterdam, v. 67, n. 11, p. 233-243, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167572912000416>>.
- 27 SANTOS, D. et al. Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: A review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 71-72, p. 3-13, May-Jun 2012. ISSN 0584-8547. Disponível em: <<Go to ISI>://000307923500002 >.
- 28 ZHAO, Y. et al. Review of methodological and experimental LIBS techniques for coal analysis and their application in power plants in China. **Frontiers of Physics**, Lausanne, v. 11, n. 6, p. 114211, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11467-016-0600-7>>.
- 29 LI, C. et al. Review of LIBS application in nuclear fusion technology. **Frontiers of Physics**, Lausanne, v. 11, n. 6, p. 114214, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11467-016-0606-1>>.

- 30 BAUER, A. J. R.; BUCKLEY, S. G. Novel Applications of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, Painfield, v. 71, n. 4, p. 553-566, 2017. Disponível em: < <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0003702817691527> >.
- 31 BURAKOV, V. S. et al. Development of a laser-induced breakdown spectroscopy method for soil and ecological analysis (review). **Journal of Applied Spectroscopy**, New York, v. 77, n. 5, p. 595-608, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10812-010-9374-9> >.
- 32 HARMON, R. S.; RUSSO, R. E.; HARK, R. R. Applications of laser-induced breakdown spectroscopy for geochemical and environmental analysis: A comprehensive review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 87, p. 11-26, 2013. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854713001201> >.
- 33 GAUDIUSO, R. et al. Laser Induced Breakdown Spectroscopy for Elemental Analysis in Environmental, Cultural Heritage and Space Applications: A Review of Methods and Results. **Sensors**, Basel, v. 10, n. 8, p. 7434-7468, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3231154/>>.
- 34 MICHEL, A. P. M. Review: Applications of single-shot laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 65, n. 3, p. 185-191, 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854710000078> >.
- 35 TOGNONI, E. et al. Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: State of the art. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 1-14, 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854709003553> >.
- 36 SINGH, V. K.; RAI, A. K. J. L. I. M. S. Prospects for laser-induced breakdown spectroscopy for biomedical applications: a review. **Lasers in Medical Science**, London, v. 26, n. 5, p. 673-687, 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10103-011-0921-2> >.
- 37 SPIZZICHINO, V.; FANTONI, R. Laser Induced Breakdown Spectroscopy in archeometry: A review of its application and future perspectives. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 99, p. 201-209, 2014. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854714001438> >.
- 38 HAHN, D. W.; OMENETTO, N. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). Part II: Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and Applications to Different Fields. **Applied Spectroscopy**, Painfield, v. 66, n. 4, p. 347-419, 2012. Disponível em: < <http://as.osa.org/abstract.cfm?URI=as-66-4-347> >.
- 39 EL HADDAD, J.; CANIONI, L.; BOUSQUET, B. J. S. A. P. B. A. S. Good practices in LIBS analysis: Review and advices. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 101, p. 171-182, 2014.
- 40 RAKOVSKÝ, J. et al. A review of the development of portable laser induced breakdown spectroscopy and its applications. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 101, p. 269-287, 2014/11/01/ 2014. ISSN 0584-8547. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854714002663> >.
- 41 GALBÁCS, G. J. A.; CHEMISTRY, B. A critical review of recent progress in analytical laser-induced breakdown spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 407, n. 25, p. 7537-7562, 2015.
- 42 JENKINS, R. **X-Ray Fluorescence Spectrometry**. New York: Wiley Online, 2000. ISBN 9783527303854. Disponível em: < [https://doi.org/10.1002/14356007.b05\\_675](https://doi.org/10.1002/14356007.b05_675) >.

- 43 MARKOWICZ, A.; VAN GRIEKEN, R. X-ray physics. In: VAN GRIEKEN, R. (Ed.). **Handbook of X-ray spectrometry**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 14-107.
- 44 SHORT, M. A.; JENKINS, R.; GOULD, R. W.; GEDCKE, D. **Quantitative x-ray spectrometry**. New York: Marcel Dekker, 1981. 586 p. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/xrs.1300110214>>.
- 45 ARANTES DE CARVALHO, G. G. et al. Recent advances in LIBS and XRF for the analysis of plants. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 33, n. 6, p. 919-944, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C7JA00293A>>.
- 46 TEZOTTO, T. et al. Simple procedure for nutrient analysis of coffee plant with energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 4, p. 263-267, 2013. Disponível em: <Go to ISI>://000323586500007>.
- 47 DE SOUZA, P. F. et al. Determination of silicon in plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 83-84, p. 61-65, 2013. Disponível em: <<Go to ISI>://000319238000008 >.
- 48 GUERRA, M. B. B. et al. 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. Disponível em: <Go to ISI>://000356971900020 >.
- 49 GUERRA, M. B. B. et al. In situ Determination of K, Ca, S and Si in Fresh Sugar Cane Leaves by Handheld Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society, São Paulo**, v. 29, n. 5, p. 1086-1093, 2018. Disponível em: <<Go to ISI>://000427641700015 >.
- 50 GALLARDO, H. et al. Possibilities of low-power X-ray fluorescence spectrometry methods for rapid multielemental analysis and imaging of vegetal foodstuffs. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 50, p. 1-9, 2016. Disponível em: <<Go to ISI>://000380621600001 >.
- 51 EKINCI, N. et al. Analysis of trace elements in medicinal plants with energy dispersive X-ray fluorescence. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Lausanne, v. 260, n. 1, p. 127-131, 2004. Disponível em: <<Go to ISI>://000221298200019 >.
- 52 KALCSITS, L. A. Non-destructive Measurement of Calcium and Potassium in Apple and Pear Using Handheld X-ray Fluorescence. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, n. 442, 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.00442>>.
- 53 PERUCHI, L. C. et al. Determination of inorganic nutrients in wheat flour by laser-induced breakdown spectroscopy and energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 100, p. 129-136, 2014. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000343853400021 >.
- 54 MAGGETTI, M. Archaeometric Analyses of European 18th–20th Century White Earthenware - A Review. **Minerals**, Basel, v. 8, n. 7, p. 269, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2075-163X/8/7/269>>.
- 55 TROJEK, T.; MUSÍLEK, L.; ČECHÁK, T. X-ray fluorescence analysis of cultural artefacts - Applications to the Czech heritage. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 95, p. 381-384, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969806X13000509>>.

- 56 MUSÍLEK, L.; ČECHÁK, T.; TROJEK, T. X-ray fluorescence in investigations of cultural relics and archaeological finds. **Applied Radiation and Isotopes**, Oxford, v. 70, n. 7, p. 1193-1202, 2012. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096980431100529X> >.
- 57 FONTANA, D. et al. Historical pigments characterisation by quantitative X-ray fluorescence. **Journal of Cultural Heritage**, Paris, v. 15, n. 3, p. 266-274, 2014. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1296207413001556> >.
- 58 COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2017/18. Nono levantamento Junho, 2018. v. 5, n. 9. Brasília, DF: CONAB, 2018. ISSN 2318-6852. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/safra> >.
- 59 SISTEMA DE ESTATÍSTICAS DE COMÉRCIO EXTERIOR DO AGRONEGÓCIO - AGROSTAT Brasil. Brasília, DF, 2018. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/internacional/indicadores-e-estatisticas> >. Acesso em: 10 ago. 2018.
- 60 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio - Brasil 2016/17 a 2026/27 - Projeções de Longo Prazo. Brasília, DF, 2017. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-2017-a-2027-versao-preliminar-25-07-17.pdf> >. Acesso em: 13 out. 2018.
- 61 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Informações de mercado. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado> >. Acesso em: 15 ago. 2018.
- 62 MARSCHNER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. New York: Academic Press, 2011.
- 63 EMBRAPA. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na Região Central do Brasil 2000/01**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 245 p.
- 64 HUSTED, S. et al. Review: The role of atomic spectrometry in plant science. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 26, n. 1, p. 52-79, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C0JA00058B> >.
- 65 HANSEN, T. H. et al. Multielement Plant Tissue Analysis Using ICP Spectrometry. In: MAATHUIS, F. J. M. (Ed.). **Plant mineral nutrients: methods and protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p. 121-141. ISBN 978-1-62703-152-3.
- 66 KALRA, Y. **Handbook of reference methods for plant analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1997. ISBN 1420049399.
- 67 MACDONALD, G. K. et al. Agronomic phosphorus imbalances across the world's croplands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 108, n. 7, p. 3086-3091, 2011. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/pnas/108/7/3086.full.pdf> >.
- 68 GILBERT, N. J. N. N. Environment: the disappearing nutrient. **Nature**, London, v. 461, n. 7265, p. 716-718, 2009.

- 69 EDIXHOVEN, J.; GUPTA, J.; SAVENIJE, H. J. E. S. D. D. Recent revisions of phosphate rock reserves and resources: reassuring or misleading? An in-depth literature review of global estimates of phosphate rock reserves and resources. **Earth System Dynamics Discussions**, New York, v. 4, n. 2, p. 1005-1034, 2013.
- 70 SCHRÖDER, J. J. et al. Improved phosphorus use efficiency in agriculture: a key requirement for its sustainable use. **Chemosphere**, Oxford, v. 84, n. 6, p. 822-831, 2011.
- 71 VENEKLAAS, E. J. et al. Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. **New Phytologist**, London, v. 195, n. 2, p. 306-320, 2012. ISSN 0028-646X.
- 72 MA, S. et al. Analysis of the element content in poplar tree leaves by femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy. **Science China Physics, Mechanics and Astronomy**, Dordrecht, v. 54, n. 11, p. 1953, 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11433-011-4493-8> >.
- 73 ZHANG, D. C. et al. Influence of Laser Wavelength on Laser-induced Breakdown Spectroscopy Applied to Semi-Quantitative Analysis of Trace-Elements in a Plant Sample. **Chinese Physics Letters**, Beijing, v. 27, n. 6, 2010. Disponível em: < <Go to ISI>://000278803400024 >.
- 74 SUN, D. et al. A Semi-Quantitative Analysis of Essential Micronutrient in Folium Lycii Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Technique. **Plasma Science and Technology**, Bristol, v. 12, n. 4, p. 478, 2010. Disponível em: < <http://stacks.iop.org/1009-0630/12/i=4/a=18> >.
- 75 YAO, M. L., MUHUA; ZHAO, JINHUI; HUANG, LIN. Identification of nutrition elements in orange leaves by laser-induced breakdown spectroscopy. In: International Symposium on Intelligent Information Technology and Security Informatics, 3., 2010, Jingtangshan, China. p. 398-401. ISSN 978-0-7695-4020-7/10.
- 76 RANULFI, A. C. et al. Evaluation of the Nutritional Changes Caused by Huanglongbing (HLB) to Citrus Plants Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, Plainfield, v. 71, n. 7, p. 1471-1480, 2017. Disponível em: < <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0003702817701751> >.
- 77 JULL, H.; KÜNNEMEYER, R.; SCHAARE, P. J. P. A. Nutrient quantification in fresh and dried mixtures of ryegrass and clover leaves using laser-induced breakdown spectroscopy. **Precision Agriculture**, Heidelberg, v. 19, n. 5, p. 823-839, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11119-018-9559-4> >.
- 78 FRANK, K. D.; BURCH, J.; DENNING, J. Mineral analysis of corn leaves by x-ray fluorescence on ground versus unground leaf samples. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 23, n. 17-20, p. 2415-2424, 1992. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/00103629209368747> >.
- 79 BLONSKI, M. S. et al. Elementary chemical analysis in leaves infected by fumagina by X-Ray fluorescence technique. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, p. 851-860, 2007. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-89132007000500013&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132007000500013&nrm=iso) >.
- 80 MCLAREN, T. I.; GUPPY, C. N.; TIGHE, M. K. A Rapid and Nondestructive Plant Nutrient Analysis using Portable X-Ray Fluorescence. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 76, n. 4, p. 1446-1453, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2136/sssaj2011.0355> >.

- 81 REIDINGER, S.; RAMSEY, M. H.; HARTLEY, S. E. Rapid and accurate analyses of silicon and phosphorus in plants using a portable X-ray fluorescence spectrometer. **New Phytologist**, London, v. 195, n. 3, p. 699-706, 2012. Disponível em: < <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1469-8137.2012.04179.x> >.
- 82 GUERRA, M. B. B. et al. Comparison of analytical performance of benchtop and handheld energy dispersive X-ray fluorescence systems for the direct analysis of plant materials. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 29, n. 9, p. 1667-1674, 2014. Disponível em: < <Go to ISI>://000341064300013 >.
- 83 TIGHE, M.; FORSTER, N. Rapid, Nondestructive Elemental Analysis of Tree and Shrub Litter. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 45, n. 1, p. 53-60, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/00103624.2013.848878> >.
- 84 TOWETT, E. K.; SHEPHERD, K. D.; LEE DRAKE, B. Plant elemental composition and portable X-ray fluorescence (pXRF) spectroscopy: quantification under different analytical parameters. **X-Ray Spectrometry**, Hoboken, v. 45, n. 2, p. 117-124, 2016. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/xrs.2678> >.
- 85 DAO, T. H. Instantaneous accounting for leaf water in X-ray fluorescence spectra of corn grown in manure- and fertilizer-amended soils. **Computers and Electronics in Agriculture**, Amsterdam, v. 129, p. 84-90, 2016. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816991630816X> >.
- 86 TREVIZAN, L. C. et al. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of macronutrients in plant materials. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 63, n. 10, p. 1151-1158, 2008. Disponível em: < <Go to ISI>://000261523400023 >.
- 87 TREVIZAN, L. C. et al. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of micronutrients in plant materials. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, n. 5, p. 369-377, 2009. Disponível em: < <Go to ISI>://000268046200003 >.
- 88 SANTOS, D. et al. Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: A review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 71-72, p. 3-13, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854712001000>>.
- 89 DE CARVALHO, G. G. A. et al. Direct determination of the nutrient profile in plant materials by femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 876, p. 26-38, 2015. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000354780400003>.
- 90 NUNES, L. C. et al. Simultaneous optimization by neuro-genetic approach for analysis of plant materials by laser induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, n. 6, p. 565-572, 2009. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269417400017 >.
- 91 BRAGA, J. W. B. et al. Comparison of univariate and multivariate calibration for the determination of micronutrients in pellets of plant materials by laser induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 66-74, 2010. Disponível em: < <Go to ISI>://000273865000008 >.
- 92 NUNES, L. C. et al. 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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C003620J>.

- 93 GOMES, M. D. et al. Evaluation of grinding methods for pellets preparation aiming at the analysis of plant materials by laser induced breakdown spectrometry. **Talanta**, Oxford, v. 85, n. 4, p. 1744-1750, 2011. Disponível em: <<Go to ISI>://000295393000008 >.
- 94 DE CARVALHO, G. G. A. et al. Effects of laser focusing and fluence on the analysis of pellets of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 74-75, p. 162-168, 2012. Disponível em: <<Go to ISI>://000308775900026 >.
- 95 LEME, F. O. et al. Effect of pulse repetition rate and number of pulses in the analysis of polypropylene and high density polyethylene by nanosecond infrared laser induced breakdown spectroscopy. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 258, n. 8, p. 3598-3603, 2012. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000300185800041 >.
- 96 GOMES, M. D. et al. A novel strategy for preparing calibration standards for the analysis of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy: A case study with pellets of sugar cane leaves. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 86, p. 137-141, 2013. Disponível em: <<Go to ISI>://000323298400020 >.
- 97 DE CARVALHO, G. G. A. et al. Influence of particle size distribution on the analysis of pellets of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 105, p. 130-135, 2015. Disponível em: <<Go to ISI>://000350611600021 >.
- 98 SANTOS, D. et al. Evaluation of Femtosecond Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Analysis of Animal Tissues. **Applied Spectroscopy**, Painfield, v. 62, n. 10, p. 1137-1143, 2008. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000260024200014 >.
- 99 SANTOS, D. et al. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for cadmium determination in soils. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, n. 10, p. 1073-1078, 2009. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271546700019 >.
- 100 GODOI, Q. et al. Laser-induced breakdown spectroscopy and chemometrics for classification of toys relying on toxic elements. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 66, n. 2, p. 138-143, 2011. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000289328900006 >.
- 101 NUNES, L. C. et al. Determination of Cd, Cr and Pb in phosphate fertilizers by laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 97, p. 42-48, 2014. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000339534100005 >.
- 102 BELLO, L. T. et al. Mercury Amalgam Diffusion in Human Teeth Probed Using Femtosecond LIBS. **Applied Spectroscopy**, Painfield, v. 71, n. 4, p. 659-669, 2017. Disponível em: <<Go to ISI>://000399927700010 >.
- 103 PAPAI, R. et al. Melted Paraffin Wax as an Innovative Liquid and Solid Extractant for Elemental Analysis by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 89, n. 5, p. 2807-2815, 2017. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000395964400022 >.
- 104 GUERRA, M. B. B. et al. Evaluation of micro-energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry for the analysis of plant materials. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 28, n. 7, p. 1096-1101, 2013. Disponível em: <Go to ISI>://000320270000016 >.

- 105 SAMEK, O. et al. Femtosecond laser spectrochemical analysis of plant samples. **Laser Physics Letters**, Berlin, v. 3, n. 1, p. 21-25, 2006. Disponível em: < <Go to ISI>://000234808400003 >.
- 106 KAISER, J. et al. Monitoring of the heavy-metal hyperaccumulation in vegetal tissues by X-ray radiography and by femto-second laser induced breakdown spectroscopy. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 70, n. 2, p. 147-153, 2007. Disponível em: < <Go to ISI>://000245558000006 >.
- 107 GALIOVA, M. et al. Utilization of laser induced breakdown spectroscopy for investigation of the metal accumulation in vegetal tissues. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 62, n. 12, p. 1597-1605, 2007. Disponível em: < <Go to ISI>://000252204500038 >.
- 108 GALIOVA, M. et al. Investigation of heavy-metal accumulation in selected plant samples using laser induced breakdown spectroscopy and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Applied Physics A-Materials Science & Processing**, Berlin, v. 93, n. 4, p. 917-922, 2008. Disponível em: < <Go to ISI>://000260218500017 >.
- 109 KRIZKOVA, S. et al. Multi-instrumental analysis of tissues of sunflower plants treated with silver(I) ions - Plants as bioindicators of environmental pollution. **Sensors**, Basel, v. 8, n. 1, p. 445-463, 2008. Disponível em: < <Go to ISI>://000252628400025 >.
- 110 KAISER, J. et al. Mapping of lead, magnesium and copper accumulation in plant tissues by laser-induced breakdown spectroscopy and laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 67-73, 2009. Disponível em: < <Go to ISI>://000262960000008 >.
- 111 KRYSTOFOVA, O. et al. Sunflower Plants as Bioindicators of Environmental Pollution with Lead (II) Ions. **Sensors**, Basel, v. 9, n. 7, p. 5040-5058, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3274165/> >.
- 112 GALIOVÁ, M. et al. Utilization of laser-assisted analytical methods for monitoring of lead and nutrition elements distribution in fresh and dried Capsicum annum l. leaves. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 74, n. 9, p. 845-852, 2011. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jemt.20967> >.
- 113 OHTA, T. et al. Emission Enhancement of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy by Localized Surface Plasmon Resonance for Analyzing Plant Nutrients. **Applied Spectroscopy**, Painfield, v. 63, n. 5, p. 555-558, 2009. Disponível em: < <Go to ISI>://000266052400011 >.
- 114 FUKUDA, N. et al. Micro X-ray fluorescence imaging and micro X-ray absorption spectroscopy of cadmium hyper-accumulating plant, Arabidopsis halleri ssp gemmifera, using high-energy synchrotron radiation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 23, n. 8, p. 1068-1075, 2008. Disponível em: < <Go to ISI>://000257982600003 >.
- 115 JIMÉNEZ, S. et al. Elemental 2-D mapping and changes in leaf iron and chlorophyll in response to iron re-supply in iron-deficient GF 677 peach-almond hybrid. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 315, n. 1, p. 93, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9735-9> >.
- 116 TOMASI, N. et al. Micro-analytical, physiological and molecular aspects of Fe acquisition in leaves of Fe-deficient tomato plants re-supplied with natural Fe-complexes in nutrient solution. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 325, n. 1, p. 25, 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0069-z> >.

- 117 TIAN, S. et al. Spatial Imaging and Speciation of Lead in the Accumulator Plant *Sedum alfredii* by Microscopically Focused Synchrotron X-ray Investigation. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 44, n. 15, p. 5920-5926, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/es903921t> >.
- 118 TIAN, S. et al. Supplemental macronutrients and microbial fermentation products improve the uptake and transport of foliar applied zinc in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. Studies utilizing micro X-ray fluorescence. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 808, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4300865/> >.
- 119 ZANIN, L. et al. Iron allocation in leaves of Fe-deficient cucumber plants fed with natural Fe complexes. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 154, n. 1, p. 82-94, 2015. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppl.12296> >.
- 120 TREBOLAZABALA, J. et al. Evaluation of metals distribution in *Solanum lycopersicum* plants located in a coastal environment using micro-energy dispersive X-ray fluorescence imaging. **Microchemical Journal**, New York, v. 131, p. 137-144, 2017. Disponível em: < <Go to ISI>://000393009900018 >.
- 121 WU, B.; BECKER, J. S. Imaging techniques for elements and element species in plant science. **Metallomics**, Cambridge, v. 4, n. 5, p. 403-416, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C2MT00002D> >.
- 122 POZEBON, D.; SCHEFFLER, G. L.; DRESSLER, V. L. Recent applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for biological sample analysis: a follow-up review. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 32, n. 5, p. 890-919, 2017. Disponível em: < <Go to ISI>://000401119500002 >.
- 123 SCHMIDT, S. B. et al. Latent manganese deficiency in barley can be diagnosed and remediated on the basis of chlorophyll a fluorescence measurements. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 372, n. 1-2, p. 417-429, 2013.
- 124 FRYDENVANG, J. et al. Sensitive Detection of Phosphorus Deficiency in Plants Using Chlorophyll a Fluorescence. **Plant Physiology**, Rockville, v. 169, n. 1, p. 353-361, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4577418/> >.
- 125 VAN MAARSCHALKERWEERD, M.; HUSTED, S. Recent developments in fast spectroscopy for plant mineral analysis. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 169, 2015. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00169> >.
- 126 JOHNSON, C. M. et al. Comparative chlorine requirements of different plant species. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 8, n. 4, p. 337-353, 1957. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/BF01666323> >.
- 127 HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. 2. ed. Davis: California Agricultural Experiment Station, 1950. (Circular, 347).
- 128 NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **NIST Atomic Spectra Database**. Gaithersburg, MD, 2018. Disponível em: < Atomic Spectra Database Lines Form >. Acesso em: 15 jun. 2018.
- 129 FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, Cooperative Extension Service, 1977. (Special Report, 80).
- 130 SFREDO, G. J. **Soja no Brasil: calagem, adubação e nutrição mineral**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. (Documentos, 305). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/470934>. Acesso em: 03 fev. 2018.

- 131 XRF User guide - Bayesian deconvolution. Disponível em: < <http://www.xrf.guru/styled-2/photos-3/index.html> >.
- 132 JOLLIFFE, I. Principal component analysis. In: LOVRIC, M. (Ed.). **International Encyclopedia Of Statistical Science**. Heidelberg: Springer, 2011. p. 1094-1096.
- 133 ARAUJO, G. C. L. et al. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 57, n. 12, p. 2121-2132, 2002. Disponível em: < <Go to ISI>://000180206700027 >.
- 134 WU, B. et al. Imaging of nutrient elements in the leaves of *Elsholtzia splendens* by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). **Talanta**, Oxford, v. 78, n. 1, p. 132-137, 2009. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914008007947> >.
- 135 KO, J. A.; FURUTA, N.; LIM, H. B. Quantitative mapping of elements in basil leaves (*Ocimum basilicum*) based on cesium concentration and growth period using laser ablation ICP-MS. **Chemosphere**, Oxford, v. 190, p. 368-374, 2018. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653517315771> >.
- 136 WISBRUN, R. et al. Detector for Trace Elemental Analysis of Solid Environmental Samples by Laser Plasma Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 66, n. 18, p. 2964-2975, 1994. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/ac00090a026> >.
- 137 CAMPOS, N. V. et al. Accumulation and spatial distribution of arsenic and phosphorus in the fern *Pityrogramma calomelanos* evaluated by micro X-ray fluorescence spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 30, n. 12, p. 2375-2383, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C5JA00348B> >.
- 138 ENT, A. et al. X-ray elemental mapping techniques for elucidating the ecophysiology of hyperaccumulator plants. **New Phytologist**, London, v. 218, n. 2, p. 432-452, 2018. Disponível em: < <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nph.14810> >.
- 139 BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. J. Q. N. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 1004-1011, 2004.
- 140 CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. Adapted from the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) document **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 391, n. 2, p. 105-126, 1999. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326709900104X> >.
- 141 OMOTE, J.; KOHNO, H.; TODA, K. X-Ray fluorescence analysis utilizing the fundamental parameter method for the determination of the elemental composition in plant samples. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 307, n. 1, p. 117-126, 1995. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000326709500033V> >.
- 142 MELQUIADES, F. et al. Direct determination of sugar cane quality parameters by X-ray spectrometry and multivariate analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 60, n. 43, p. 10755-10761, 2012.



## APÊNDICES



## APÊNDICE A

### 1. Protocolo de preparo das soluções de micronutrientes e Fe-EDTA

#### 1.1. Preparo da solução de micronutrientes

- KCl (3,728 g L<sup>-1</sup>), equivalente à [50 µmol L<sup>-1</sup>];
- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (1,546 g L<sup>-1</sup>), equivalente à [25 µmol L<sup>-1</sup>];
- MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (0,338 g L<sup>-1</sup>), equivalente à [2 µmol L<sup>-1</sup>];
- ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,575 g L<sup>-1</sup>), equivalente à [2 µmol L<sup>-1</sup>];
- CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,125 g L<sup>-1</sup>), equivalente à [0,5 µmol L<sup>-1</sup>];
- H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (85% MoO<sub>3</sub>), equivalente à (0,081) [0,05 µmol L<sup>-1</sup>].

#### 1.2. Preparo da solução de Fe-EDTA

Dissolveu-se 33,2 g de EDTA-Na em 200 mL de água deionizada. Juntou-se, agitando, 89 mL de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> (40 g L<sup>-1</sup>). Dissolveu-se separadamente 24,9 g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O em 200 mL de água deionizada e juntou-se, agitando, à solução de EDTA [53,7 mol L<sup>-1</sup>]. Completou-se o volume para 900 mL com H<sub>2</sub>O deionizada, colocou-se em frasco escuro e manteve o sistema arejando durante uma noite. Em seguida, completou-se o volume a 1L com água deionizada e manteve-se o frasco escuro sob refrigeração.

### 2. Análise dos solos utilizados nos experimentos

Os solos utilizados nos experimentos em casa de vegetação e no campo experimental do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ foram analisados previamente à semeadura da soja, a fim de verificar se os mesmos se encontravam adequados para o plantio. A tabela abaixo apresenta as determinações realizadas e os seus respectivos valores: Solo 1, utilizado nos experimentos realizados em casa de vegetação, conforme descrito no item 4.1.2.2; Solo 2, representa o solo do campo experimental, em que foram coletadas as amostras descritas no item 4.1.3.

Tabela 10 – Resultados das análises dos solos utilizados nos experimentos em casa de vegetação e no campo experimental

Determinações	Amostras	
	Solo 1	Solo 2
<b>pH</b>	5,3	5
<b>Matéria orgânica (g dm<sup>-3</sup>)</b>	24	14
<b>P (mg dm<sup>-3</sup>)</b>	18	20
<b>S (mg dm<sup>-3</sup>)</b>	14	< 6
<b>K (mmolc dm<sup>-3</sup>)</b>	1,9	1,4
<b>Ca (mmolc dm<sup>-3</sup>)</b>	27	17
<b>Mg (mmolc dm<sup>-3</sup>)</b>	8	6
<b>Al (mmolc dm<sup>-3</sup>)</b>	0	< 2
<b>H + Al (mmolc dm<sup>-3</sup>)</b>	28	15
<b>SB (mmolc dm<sup>-3</sup>)</b>	37	24,4
<b>CTC (mmolc dm<sup>-3</sup>)</b>	65	39,4
<b>V (%)</b>	56	62
<b>m (%)</b>	0	4

**Métodos:** pH em CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>; fósforo (P): método colorimétrico, extraído com resina trocadora de íons; enxofre (S): determinação por turbidimetria e extração com fosfato de cálcio 0,01 mol L<sup>-1</sup>; potássio (K): extração com resina trocadora de íons e determinação em espectrofotômetro de emissão atômica; cálcio (Ca) e magnésio (Mg): extração com resina trocadora de íons e determinação em espectrômetro de absorção atômica; alumínio trocável (Al): método colorimétrico, extraído com cloreto de potássio 1 mol L<sup>-1</sup>; acidez potencial (H+Al): extraído com tampão SMP (Manual de análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. IAC, 2001). SB: soma de bases trocáveis; CTC: capacidade de troca de cátions; V: saturação da CTC por bases; m: saturação por alumínio. Observação: (<) menor do que o limite de quantificação.

### 3. Tratamento das sementes utilizadas nos experimentos em casa de vegetação e no campo experimental

As sementes das cultivares de soja RK7214 IPRO e M6210 IPRO, utilizadas nos experimentos em sistema hidropônico em casa de vegetação, não foram tratadas previamente ao plantio com nenhum tipo de insumo comercial. Já para os experimentos em solo em casa de vegetação, foi realizada a aplicação do inoculante comercial Masterfix L<sup>®</sup> (contendo as bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*) nas sementes das cultivares BRS Tianá, BRS 183 e RK7214IPRO, sendo a dose utilizada 2 µL de inoculante por semente, aplicada no sulco.

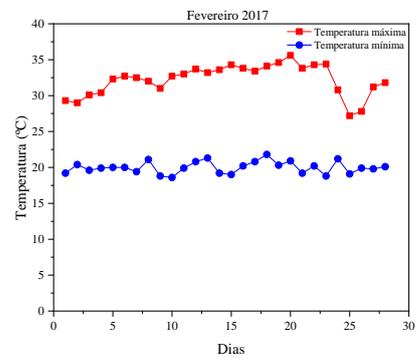
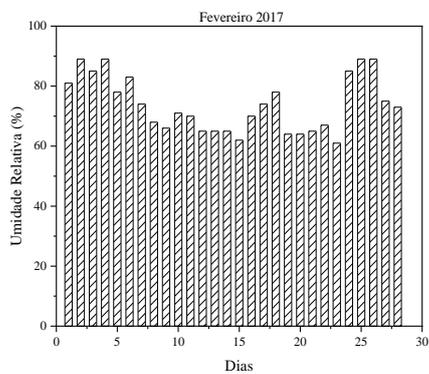
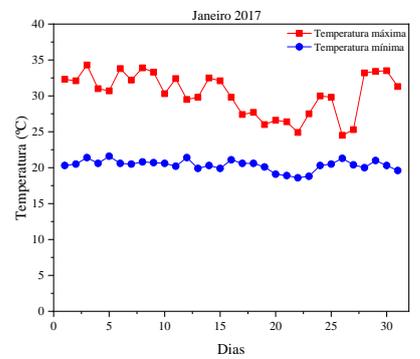
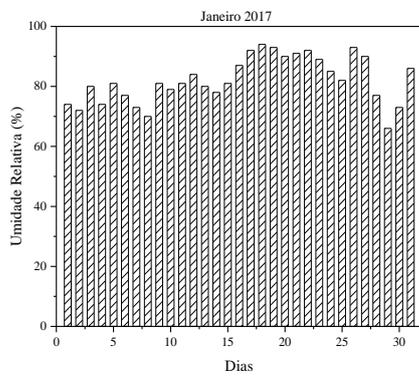
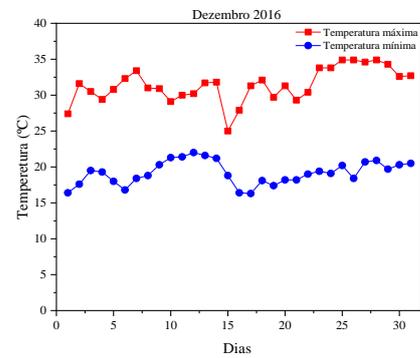
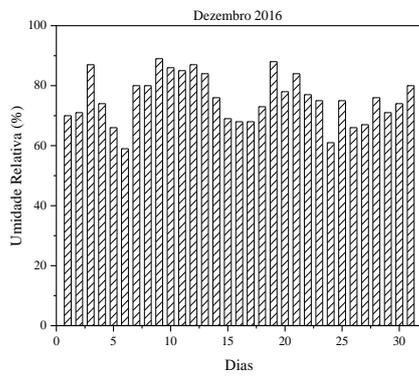
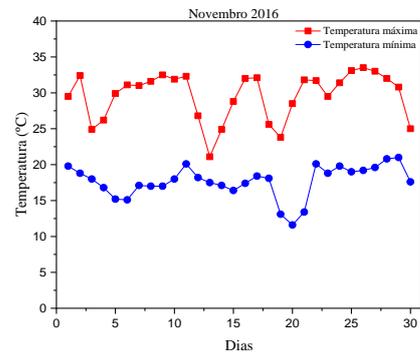
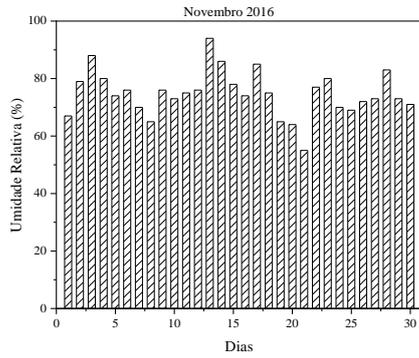
No campo experimental do Departamento de Produção Vegetal, as sementes de soja da cultivar BMX GARRA RR 2/STS foram tratadas industrialmente com o fungicida e inseticida Standak<sup>®</sup> TOP e as sementes da cultivar BMX POTÊNCIA RR foram tratadas no próprio departamento com o fungicida Vitavax<sup>®</sup> e inseticida Cropstar<sup>®</sup>, com as respectivas doses de bula, 0,25 a 0,30 L e 0,5 a 0,7 L p.c. para cada 100 kg de sementes. Uma vez tratadas com fungicida e inseticida, as sementes das duas cultivares foram tratadas com inoculante Masterfix L<sup>®</sup>, que foi aplicado em três doses de 120 mL para cada 50 kg de sementes, totalizando 360 mL para cada 50 kg de sementes. Além do inoculante, foi aplicada uma formulação comercial de Co e Mo, o Co-Mo<sup>®</sup> Platinum, na dose 150 mL para cada 50 kg de sementes. No plantio, realizou-se a adubação com o fertilizante formulado NPK granulado 4-20-20 na dose 300 kg ha<sup>-1</sup>. A Tabela 11 mostra a composição dos insumos comerciais aplicados às sementes utilizadas nos experimentos.

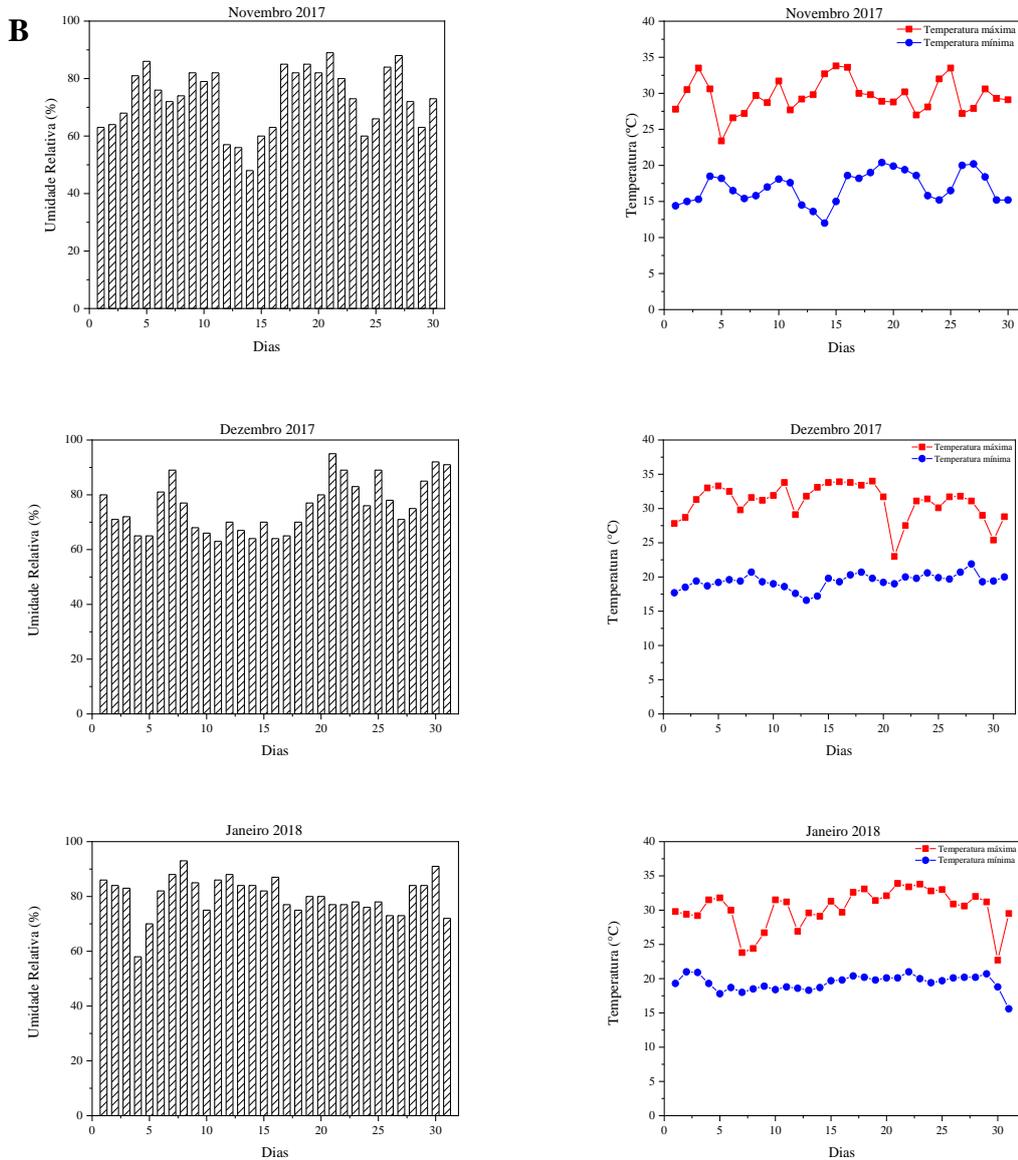
Tabela 11 – Composição dos insumos comerciais aplicados às sementes utilizadas nos experimentos

Produto	Composição	Concentração	
		(g L <sup>-1</sup> )	(% m v <sup>-1</sup> )
Standak <sup>®</sup> Top	Methyl N-2-[[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yloxymethyl]phenyl](N-methoxy)Carbamate (PIRACLOSTROBINA)	25	2,5
	Dimethyl 4,4'-(o-phenylene)bis(3-thioallophanate) (TIOFANATO METÁLICO)	225	22,5
	(RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfanylpyrazole-3-carbonitrile (FIPRONIL)	250	25,0
	E outros ingredientes	713	71,3
Vitavax <sup>®</sup> Thiram 200 SC	5,6-dihydro-2-methyl-1,4-oxathi-ine-3-carboxanilide (CARBOXINA)	200	20,0
	Tetramethylthiuram disulfide (TIRAM)	200	20,0
	Etileno Glicol	249	24,9
	Outros ingredientes	507	50,7
Cropstar <sup>®</sup>	1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine (IMIDACLOPRIDO)	150	15,0
	3,7,9,13-tetramethyl-5,11-dioxa-2,8,14-trithia-4,7,9,12-tetra-azapentadeca-3,12-diene-6,10-dione (TIODICARBE)	450	45,0
	Outros ingredientes	610	61,0
Inoculante Masterfix L <sup>®</sup>	Cepas SEMIA 5079 ( <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ) e SEMIA 5019 ( <i>Bradyrhizobium elkanii</i> )	5,0 x 10 <sup>9</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	

#### 4. Dados meteorológicos dos períodos de cultivo e coleta das amostras

A





Fonte: Série de Dados Climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba, SP. Departamento de Engenharia de Biosistemas. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo LEB - ESALQ – USP.

Figura 48 – Dados meteorológicos do período de plantio e coleta das folhas de soja cultivadas em (A) casa de vegetação em sistema de hidroponia, no período de novembro de 2016 a fevereiro de 2017, e em (B) casa de vegetação com solo e no campo experimental do Grupo de Extensão Pró-Hort da ESALQ, no período de novembro de 2017 a janeiro de 2018.

## APÊNDICE B

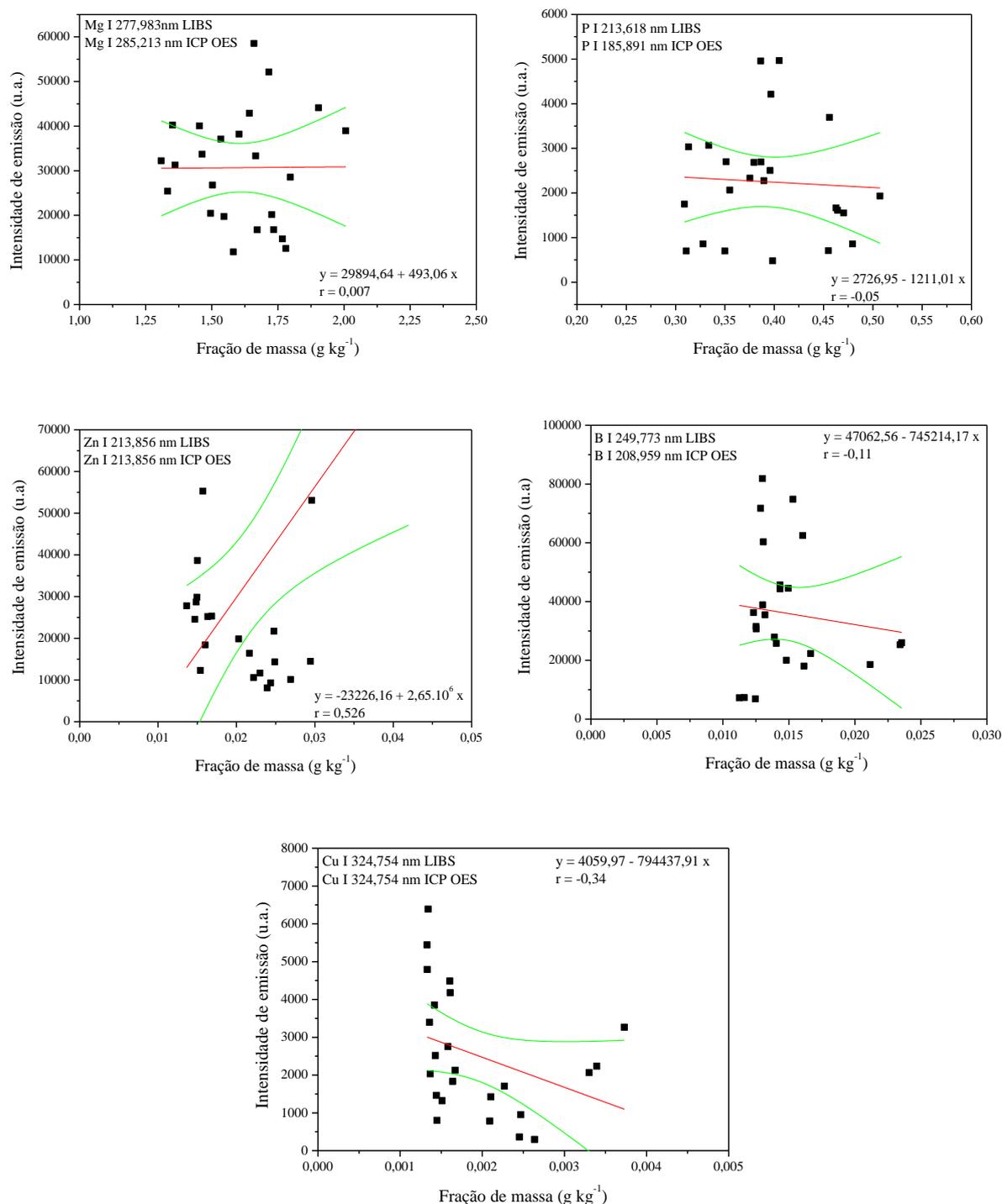


Figura 49 – Representação gráfica dos sinais analíticos *versus* frações de massa obtidas por ICP OES, para os elementos: Mg, P, Zn, B e Cu. Condições experimentais: laser de Nd:YAG @1064 nm, 5 ns, 10 Hz,  $50 \text{ J cm}^{-2}$ , 750  $\mu\text{m}$  de diâmetro, 2  $\mu\text{s}$  de atraso e 5  $\mu\text{s}$  de integração.

## APÊNDICE C

### Mapeamento de folhas frescas de soja por LIBS

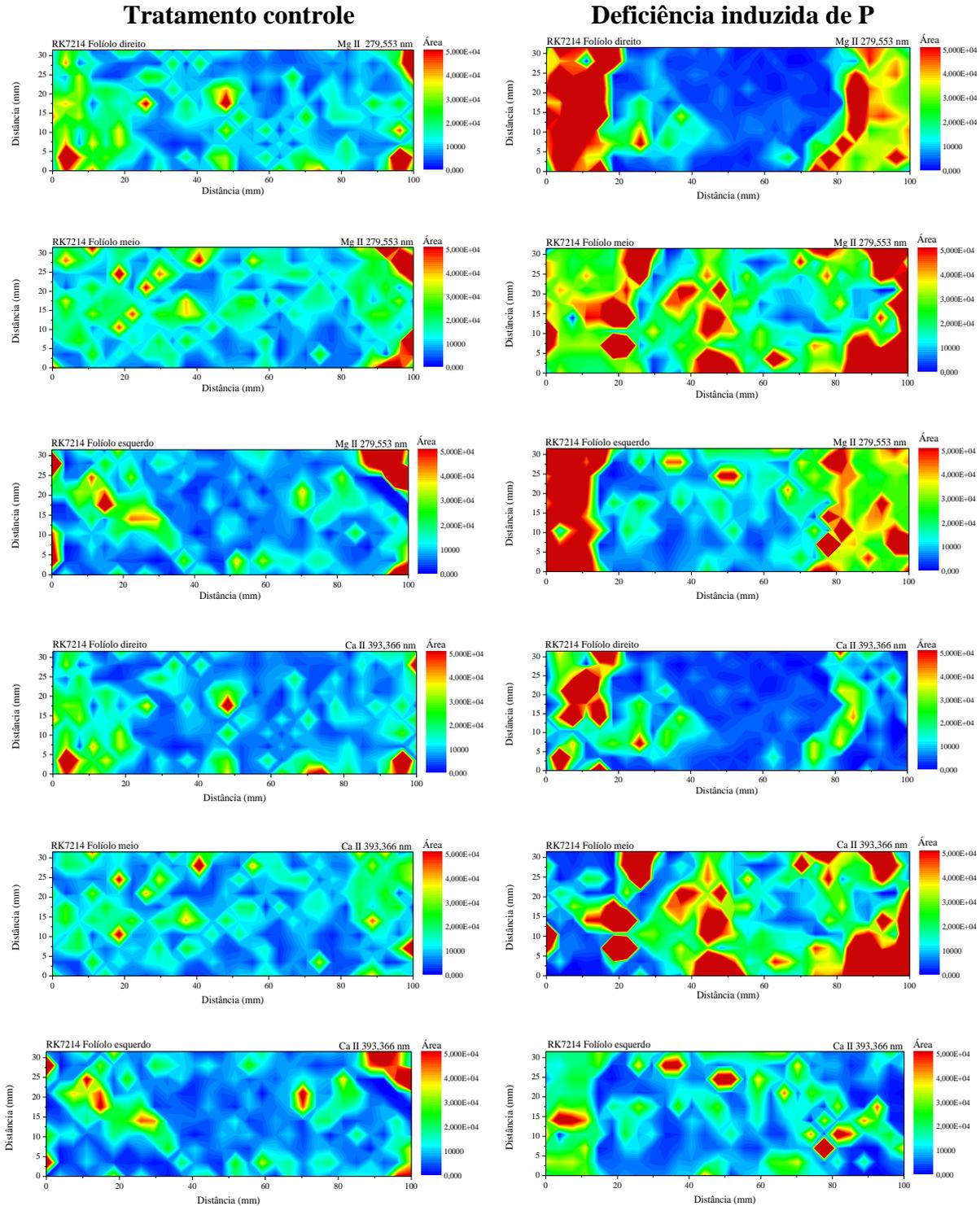


Figura 50 – Mapas de distribuição elementar de Ca e Mg dos folíolos direito, do meio e esquerdo do tratamento controle (esquerda) e dos folíolos do tratamento com deficiência induzida de P (direita) de folhas frescas de soja da cultivar RK7214 IPRO, construídos por LIBS. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 10 Hz), 1 pulso de  $50 \text{ J cm}^{-2}$  por ponto,  $750 \mu\text{m}$  de diâmetro,  $2 \mu\text{s}$  de atraso e  $5 \mu\text{s}$  de integração.

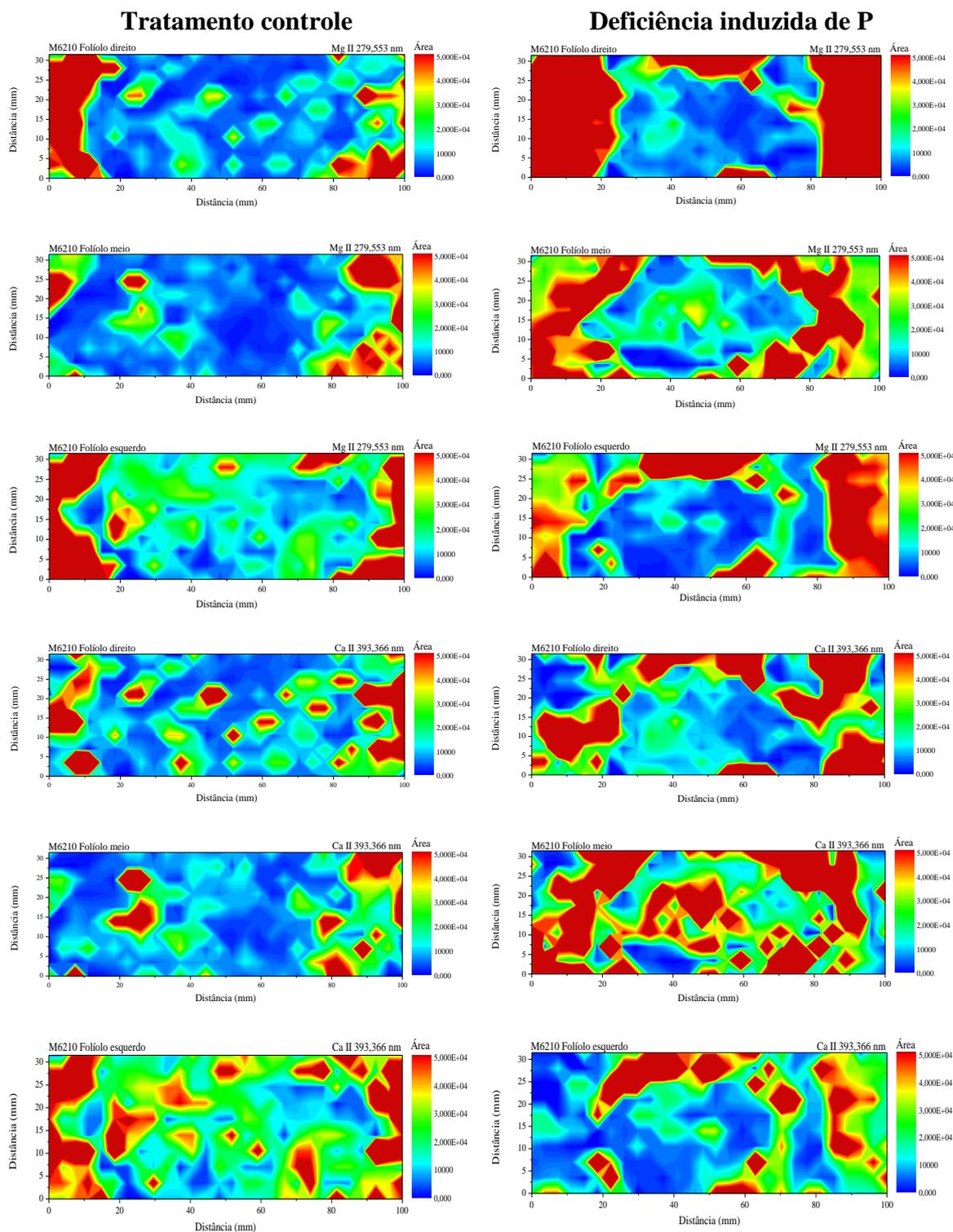


Figura 51 – Mapas de distribuição elementar de Ca e Mg dos folíolos direito, do meio e esquerdo do tratamento controle (esquerda) e dos folíolos do tratamento com deficiência induzida de P (direita) de folhas frescas de soja da cultivar M6210 IPRO, construídos por LIBS. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 10 Hz), 1 pulso de  $50 \text{ J cm}^{-2}$  por ponto, 750  $\mu\text{m}$  de diâmetro, 2  $\mu\text{s}$  de atraso e 5  $\mu\text{s}$  de integração.

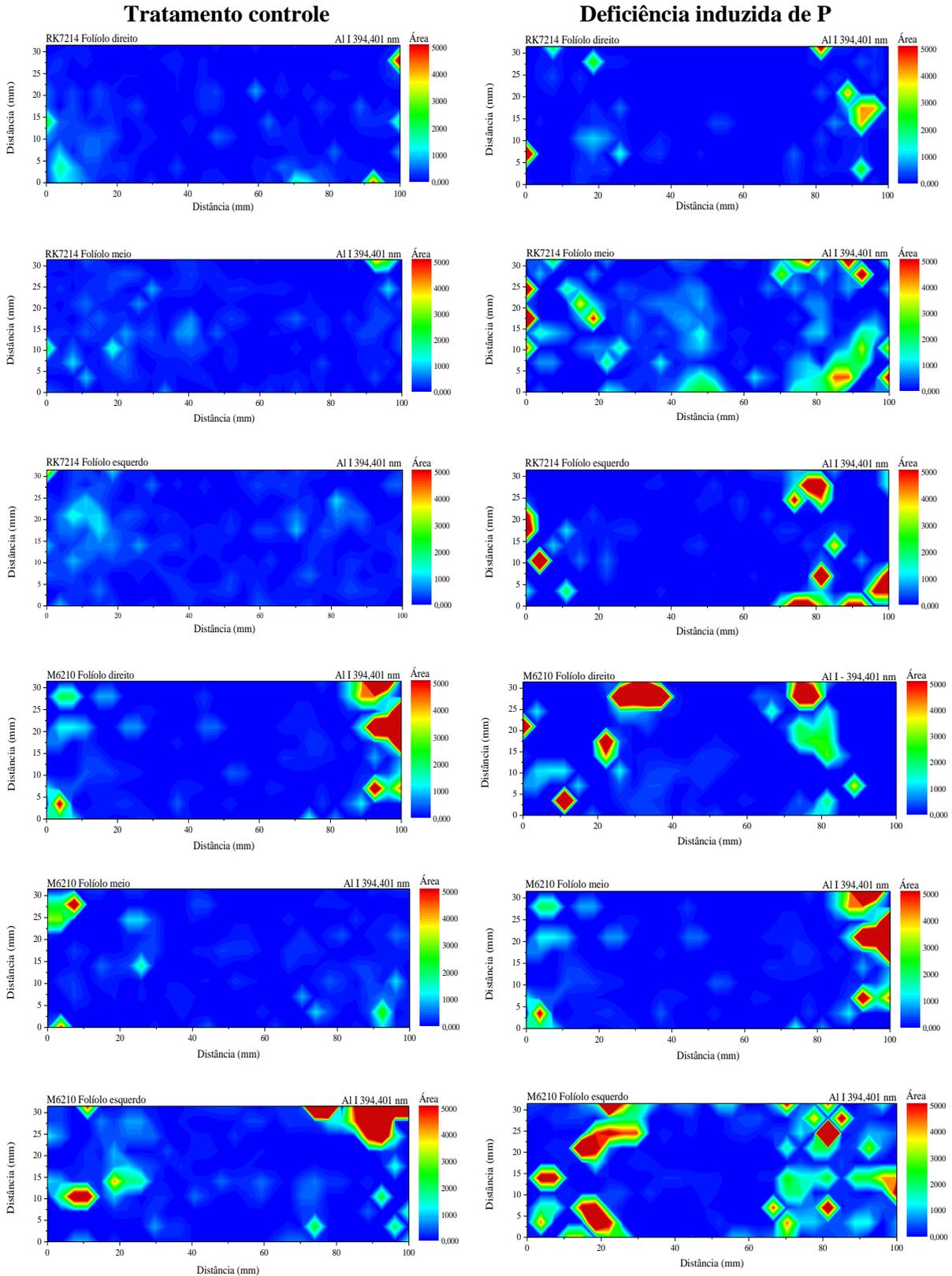


Figura 52 – Mapas de distribuição elementar de Al dos folíolos direito, do meio e esquerdo do tratamento controle (esquerda) e dos folíolos do tratamento com deficiência induzida de P (direita) de folhas frescas de soja, das cultivares RK7214 IPRO e M6210 IPRO, construídos por LIBS. Condições experimentais: laser de Nd:YAG (1064 nm, 5 ns, 10 Hz), 1 pulso de  $50 \text{ J cm}^{-2}$  por ponto,  $750 \mu\text{m}$  de diâmetro,  $2 \mu\text{s}$  de atraso e  $5 \mu\text{s}$  de integração.

## APÊNDICE D

### Correlações obtidas por PXRF

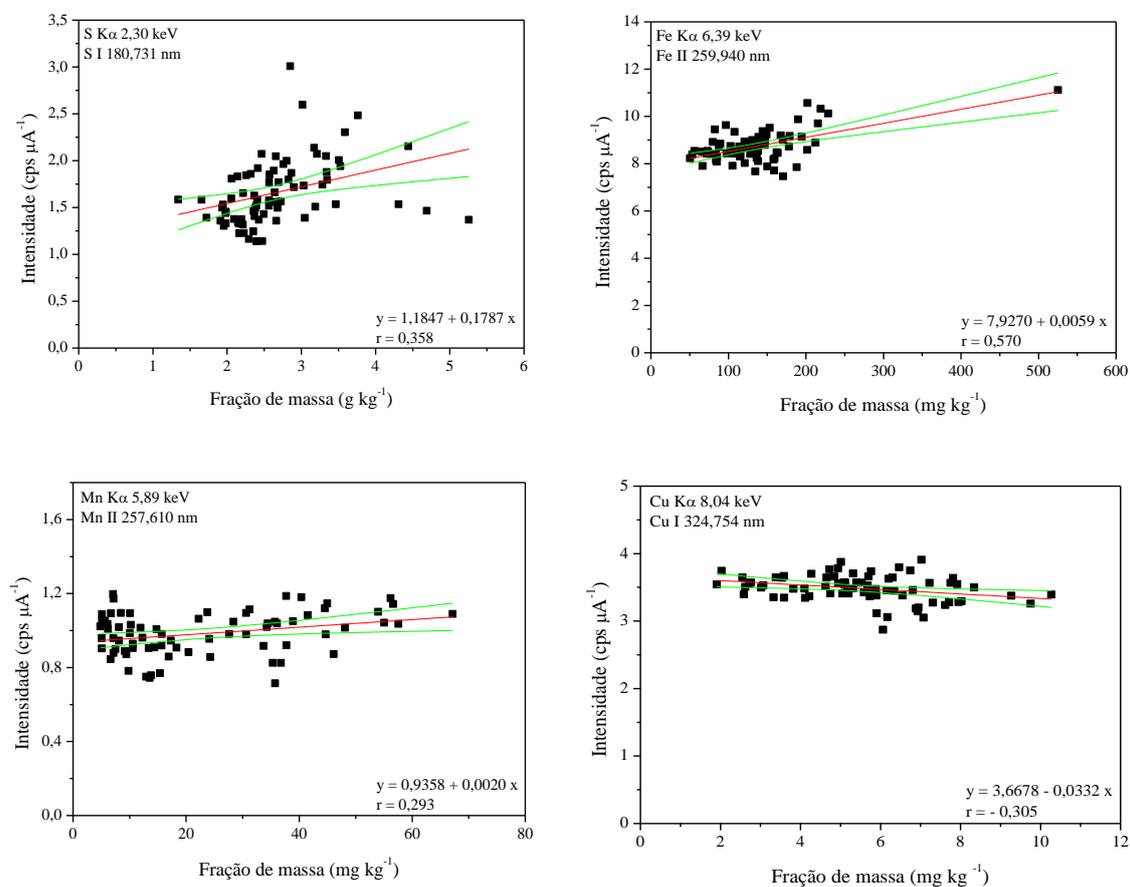


Figura 53 – Gráficos de regressão entre as frações de massa obtidas pelo método de referência e as previstas por PXRF, para S, Fe, Mn e Cu nas amostras de folhas frescas de soja. Condições experimentais: feixe de raios X de 4,5 mm de diâmetro, 40 s de irradiação, 45 kV e 30  $\mu\text{A}$  de tensão e corrente aplicadas ao tubo de Rh.