

**QUANTIFICAÇÃO DE CÁLCIO, MAGNÉSIO E FERRO EM FOLHAS DE SOJA
ATRAVÉS DA TÉCNICA LIBS UTILIZANDO O ONE-POINT CALIBRATION**L. C. L. Borduchi^{1,2,*}, D.M.B.P Milori², P. R. Villas-Boas²

¹ Departamento de Física – Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luiz, 235, 13565-905, São Carlos, SP

² Embrapa Instrumentação, XV de Novembro, 1452, 13560-970

* Autor correspondente, e-mail: luislewa@df.ufscar.br

Resumo: O monitoramento de nutrientes na produção de soja por meio da análise foliar é essencial para a identificação de carências nutricionais e no diagnóstico de doenças que promovem perdas na produtividade da cultura. Atualmente, o diagnóstico em larga escala é impossibilitado devido ao alto custo das medidas e a geração de resíduos químicos que as técnicas quantitativas convencionais produzem, como a espectrometria de absorção de atômica (AAS). Uma alternativa a essas técnicas é a espectroscopia de emissão de plasma induzido por laser (LIBS) – uma técnica espectro-analítica que proporciona análises multielementares de maneira rápida, com baixo custo e sem gerar resíduos químicos. A técnica se baseia no estudo da emissão óptica de um plasma formado a partir da interação de um laser de alta intensidade com a amostra. Apesar das vantagens da técnica, a análise quantitativa pode ser comprometida por causa de flutuações do laser, reprodutibilidade das condições do plasma e efeitos de matriz. Neste trabalho, propomos o uso do modelo *calibration free* (CF) corrigido pelo método *one point-calibration* (OPC) para quantificar ferro, cálcio e magnésio em folhas de soja de diferentes cultivares. Com o uso do OPC foi obtido uma validação de 92% em relação aos resultados obtidos através do AAS para 30 amostras de folha de soja, mesmo quando a variação de matriz foi evidente. Assim, demonstramos que o OPC-LIBS possui grande potencial para realizar análise foliar nutricional da soja de diferentes cultivares em larga escala, por não depender da matriz e ser de baixo custo, rápido e acurado. Com poucas modificações, os resultados deste trabalho podem ainda ser expandidos para outras culturas e outros elementos, permitindo assim uma análise foliar nutricional completa da cultura de interesse.

Palavras-chave: LIBS, *one-point calibration*, *calibration-free*, análise foliar nutricional, soja.

***CALCIUM, MAGNESIUM AND IRON QUANTIFICATION IN SOY LEAVES WITH LIBS
TECHNIQUE USING ONE-POINT CALIBRATION***

Abstract: Nutrient monitoring in soybean production through leaf analysis is essential for the identification of nutritional deficiencies and diagnosis of diseases that cause losses in crop yield. Large-scale diagnosis is currently impossible due to the high cost of measurements and the generation of chemical waste that conventional quantitative techniques produce, such as atomic absorption spectrometry (AAS). An alternative to these techniques is Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) - a spectrum-analytical technique that provides fast, low cost multielemental analysis without generating chemical residues. The technique is based on the study of the optical emission of a plasma formed from the interaction of a high intensity laser with the sample. Despite the advantages of the technique, quantitative analysis can be compromised because of laser fluctuations, reproducibility of plasma conditions, and matrix effects. In this work, we propose the use of the calibration free (CF) model corrected by one point-calibration (OPC) method to quantify iron, calcium and magnesium in soybean leaves of different cultivars. With the use of OPC a 92% validation was obtained in relation to the results obtained through the AAS for 30 soybean leaf samples, even when the matrix effect was evident. Thus, we demonstrated that OPC-LIBS has great potential to perform nutritional leaf analysis of soybeans of different cultivars on a large scale, since it does not depend on the matrix and is low cost, fast and accurate. With few modifications, the results of this work can be further expanded to other crops and other elements, thus allowing a

complete nutritional leaf analysis of the crop of interest.

Keywords: LIBS, one-point calibration, calibration-free, leaf nutritional analysis, soybean.

1. Introdução

O monitoramento nutricional na produção de soja através da análise foliar é essencial para a identificação de carências nutricionais e no diagnóstico de doenças que promovem perdas na produtividade da cultura. As principais técnicas utilizadas atualmente para se realizar a análise são o analisador elementar CHN, a espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) e a espectrometria de absorção atômica (AAS). Entretanto, estas técnicas possuem um alto custo de execução e geram resíduos químicos, dificultando sua utilização em larga escala.

Uma alternativa a estas técnicas, é a espectroscopia de emissão de plasma induzida por laser (LIBS) (CREMERS; RADZIEMSKI, 2013). É uma técnica espectro-analítica rápida e de baixo custo que requer pouco preparo de amostra, não gera resíduos químicos e pode ser utilizada diretamente no campo (LAXMIPRASAD et al, 2013). A técnica LIBS se baseia no estudo da emissão do plasma gerado na superfície da amostra através de um laser de alta intensidade. O sinal é coletado por uma fibra ótica e resolvido por um espectrômetro que fornece o espectro contendo as emissões dos elementos presentes na amostra (ZOROV et al, 2015).

O modelo de quantificação mais simples em LIBS é a curva de calibração (CC), que se baseia na correlação entre a concentração de um certo elemento com a intensidade da emissão de uma de suas linhas de transição atômica ou iônica no espectro LIBS. Através deste modelo é possível prever a concentração do elemento de maneira rápida e fácil, mas sua eficácia pode ser prejudicada devido ao efeito de matriz (diferentes tipos de amostras resultam em diferentes curvas), que é provocado pela interação laser amostra e causa flutuações na intensidade das linhas de emissão e nos parâmetros do plasma (SEGNINI et al., 2014). Outra limitação do modelo é a necessidade de ter um conjunto de calibração, em que as amostras são medidas por uma técnica de referência. Visando aprimorar as análises quantitativas em LIBS, esta trabalho usou um recente método de correção chamado de *one-point calibration* (OPC) (CAVALCANTI et al., 2013) para realizar a quantificação de nutrientes na folha de soja. OPC é um método de correção empírico aplicado ao modelo *calibration free* (CF) (CIUCCI et al, 1999) que tem o propósito de corrigir alguns problemas relacionados ao uso do modelo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Confeção das amostras e coleta dos espectros

As amostras foram coletadas e levadas ao laboratório, onde elas foram limpas e submetidas ao processo de secagem em estufa a 30°C durante 72 h. Após a secagem as amostras foram trituradas com auxílio de nitrogênio líquido e peneiradas a 32 mesh. Para facilitar os cálculos do método OPC, foi adicionado nas amostras 0,5% de dióxido de titânio; a mistura foi homogeneizada e prensada a 3 ton, resultando em *pellets* de 300 mg. Foram utilizadas 30 amostras, divididas em 5 cultivares, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição das amostras de cada conjunto.

Conjunto	Nº Amostras	Cultivar
1	01 – 09	D7712244
2	10 – 18	TMG1182RR
3	19 – 20	P98Y70
4	21 – 25	M9144RR
5	26 – 30	ST820RR

Para a coleta dos espectros, foi utilizado o sistema comercial LIBS2500 da Ocean Optics, composto por um laser de Nd-YAG em 1064 nm, com pulsos de 8 ns de duração e energia máxima de 50 mJ; sete espectrômetros com um detector do tipo CCD com faixa espectral de 188 à 960 nm com resolução de 0,1 nm. As medidas foram realizadas em ar ambiente obtendo 120 espectros por amostra, com um *delay time* de 1 μ s e 1 ms de tempo de integração. As emissões foram identificadas utilizando a base de dados NIST (KRAMIDA et al., 2018) e os dados foram processados utilizando o software R, LibreOffice Calc e OriginLab.

2.2. Calibration free (CF)

O *calibration free* (CF) é um modelo de quantificação em LIBS baseado nos parâmetros físicos do plasma, como temperatura, densidade de elétrons e densidade de emissores, onde não há necessidade da construção de curvas de calibração. Para o cálculo da temperatura e densidade de elétrons, foi utilizado o *plot* de Saha-Boltzmann.

CF consiste em prever a concentração do elemento através da razão de sua densidade de emissores em relação à densidade total presente no plasma. Para facilitar os cálculos, é utilizado um elemento com concentração conhecida. A densidade de emissores é calculada através da distribuição de Boltzmann, onde é levada em conta a área da linha de emissão, temperatura do plasma e parâmetros específicos da linha de emissão disponíveis na base de dados NIST.

Por levar em conta os parâmetros físicos do plasma, o modelo CF acaba sendo menos sensível aos efeitos de matriz como ocorre com os modelos baseados apenas na intensidade das linhas de emissão. Entretanto, sua eficácia pode ainda ser prejudicada por diversos fatores, como o próprio efeito de matriz, cálculo da temperatura do plasma impreciso, erros nos parâmetros das linhas de emissão e outros efeitos não lineares, como a auto absorção e absorção pelo gás ambiente.

2.2.1. One-point calibration (OPC)

One-point calibration (OPC) é um método de correção empírico aplicado no cálculo de CF, onde é realizado uma calibração das intensidades das linhas de emissão (atômicas e iônicas) dos elementos de interesse através das concentrações obtidas por uma técnica de referência. Esta correção tem o objetivo de corrigir alguns problemas relacionados ao cálculo do CF que prejudicam sua eficácia. Para isso, é necessária a calibração dos fatores de correção, a partir de uma amostra de referência do conjunto, que serão aplicados nas demais amostras (BORDUCHI et al, 2019).

3. Resultados e Discussão

Inicialmente, fizemos os gráficos da relação entre as áreas das linhas de emissão de magnésio (Mg), cálcio (Ca) e ferro (Fe) e suas respectivas concentrações obtidas pela espectrometria de absorção atômica (AAS) (Figura 1).

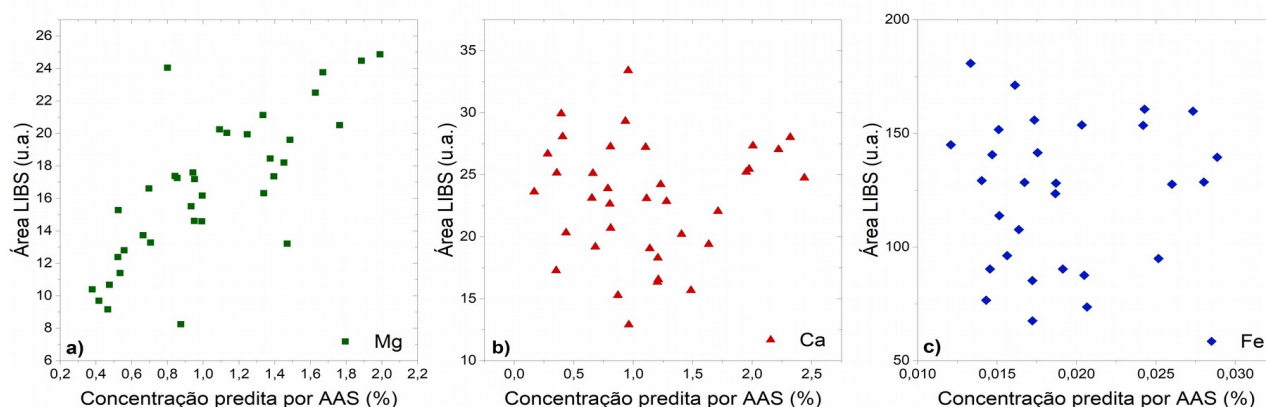


Figura 1: Curvas de calibração para a) magnésio (quadrados verdes), b) cálcio (triângulos vermelhos) e c) ferro (losangos azuis).

Não há uma relação clara entre as áreas LIBS e as concentrações dos elementos na Figura 1, exceto para Mg, que parece uma relação não linear. É provável que a falta de relação entre a área e a concentração dos elementos seja causada pelo efeito de matriz, por se tratar de amostras de diferentes cultivares. Sendo assim, não é possível construir as curvas de calibração para quantificar esses elementos nestas amostras.

O titânio (Ti) proveniente do dióxido de titânio, adicionado nas amostras, foi usado como referência interna para os cálculos do método OPC (BORDUCHI et al., 2019). Esse elemento foi usado ainda para calcular a temperatura do plasma e a densidade de elétrons, por possuir diversas emissões no espectro LIBS.

Para realizar a calibração do OPC, foi utilizado a amostra n°1, contendo 1,38% de Mg, 1,66% de Ca, 0,02% de Fe e 0,29% de Ti. Com essa amostra foi obtido os fatores de correção do OPC, que foram aplicados nas demais amostras sem realizar outra calibração ou ajuste.

A validação entre os valores preditos pelo OPC e a concentração predita pela AAS pode ser visualizada na Figura 2.

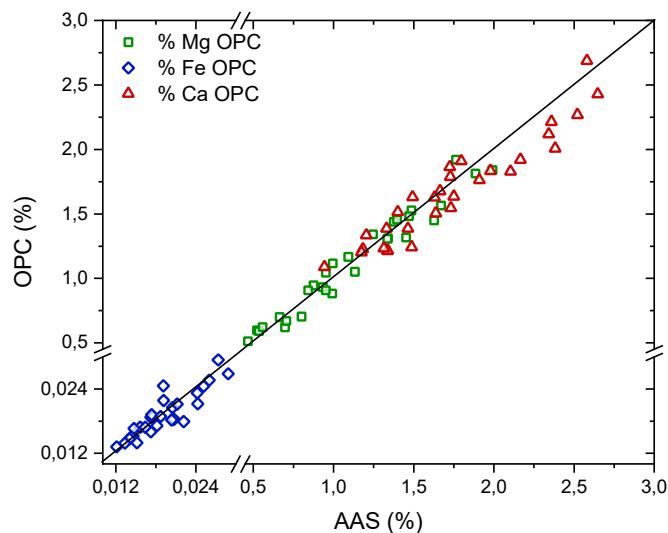


Figura 2: Validação dos valores preditos pelo OPC em relação a AAS, para o Mg (quadrados verdes), Ca (triângulos vermelhos) e Fe (losangulos azuis) .

Na Figura 2, vemos que os valores preditos pelo OPC estão muito próximos aos preditos pela AAS, resultando em uma validação de 92% e uma incerteza por volta de 6% para ambas as técnicas.

Este resultado mostra que o método OPC conseguiu superar problemas como o efeito de matriz, evidente na Figura 1. Por levar em conta parâmetros do plasma e a calibração com uma amostra do conjunto, o método se mostrou pouco susceptível aos efeitos de matriz e mais reprodutível aos métodos convencionais de calibração.

A adição do Ti para ser o parâmetro interno se mostrou eficiente, visto que se usássemos um valor de uma técnica de referência para ser o parâmetro interno o erro da medida seria maior. Além disso, o Ti foi essencial para garantir um cálculo acurado da temperatura do plasma, dando mais robustez e estabilidade para o modelo.

4. Conclusões

O uso do método OPC em LIBS foi eficiente para predizer os valores de concentração do Mg, Ca e Fe em amostras de folha de soja de diferentes cultivares, em relação aos valores obtidos pela técnica AAS. O modelo foi ainda robusto para realizar análises quantitativas mesmo quando

efeitos de matriz foram evidentes, o que não seria alcançado utilizando modelos de calibração convencionais.

A adição de um parâmetro interno contribuiu para os resultados obtidos, visto que permitiu o cálculo da temperatura do plasma de forma precisa e acurada, além de ter sido usado para os cálculos do método OPC.

Neste trabalho, foi mostrado que o uso da técnica OPC-LIBS para realizar a análise foliar de soja possui grande potencial para a agricultura de precisão, por se tratar de uma análise rápida e de menor custo que as técnicas convencionais. Ainda precisa ser investigada a extensão dos resultados deste estudo para outros nutrientes e outras culturas.

Agradecimentos

Agradeço a Anielle Ranulfi, Aida Bebechibuli e Mauricio Meyer pelo fornecimento de amostras. Alice Raabe pela realização das análises de absorção atômica. A Embrapa Instrumentação e ao Laboratório de Óptica e Fotônica pelo fornecimento da infraestrutura na realização do trabalho. Ao CNPq (projetos nº 403405/2013 e 479994/2013-7), à Fapesp (CEPOF – projeto nº2013/07276-1), à Embrapa (projetos 03.11.09.013.00.00 e 04.11.10.004.00.06.02) pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa.

Referências

- CREMERS, David A. e RADZIEMSKI, Leon J. Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. Oxford, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2013.
- Laxmiprasad, A. S., Raja, V. L. N. S., Menon, S., Goswami, A., Rao, M. V. H., & Lohar, K. A. (2013). An in situ laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) for Chandrayaan-2 rover : Ablation kinetics and emissivity estimations. *Advances in Space Research*, 52(2), 332–341.
- Zorov, N. B., Popov, A. M., Zaytsev, S. M., & Labutin, T. A. (2015). Qualitative and quantitative analysis of environmental samples by laser-induced breakdown spectrometry. *Russian Chemical Reviews*, 84(10), 1021–1050.
- Segnini, A. ; Xavier, A. A. P. ; OTAVIANI-JUNIOR, P. L. ; FERREIRA, E. C. ; Watanabe, A. M. ; Sperança, M. A. ; NICOLODELLI, G. ; VILLAS-BOAS, P. R. ; OLIVEIRA, P. P. A. ; MILORI, Débora Marcondes Bastos Pereira . Physical and Chemical Matrix Effects in Soil Carbon Quantification Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *American Journal of Analytical Chemistry*, v. 5, p. 722-729, 2014.
- Cavalcanti, G. H., Teixeira, D. V., Legnaioli, S., Lorenzetti, G., Pardini, L., & Palleschi. One-point calibration for calibration-free laser-induced breakdown spectroscopy quantitative analysis. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. v. 87, p. 51–56, 2013.
- CIUCCI A., CORSI M., PALLESCHI V., RASTELLI S., SALVETTI A., TOGNONI E.. New Procedure for Quantitative Elemental Analysis by Laser-Induced Plasma Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, v. 53, n. 8, p. 960–964, 1999.
- Kramida, A., Ralchenko, Yu., Reader, J. and NIST ASD Team (2018). NIST Atomic Spectra Database (version 5.6.1), <https://physics.nist.gov/asd> [Mon Sep 09 2019]. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD.
- BORDUCHI, Luís Carlos Leva e MILORI, Débora Marcondes Bastos Pereira e VILLAS-BOAS, Paulino Ribeiro. One-point calibration of Saha-Boltzmann plot to improve accuracy and precision of quantitative analysis using laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 160, p. 105692, Oct 2019.