

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ANIELLE COELHO RANULFI

LIBS como ferramenta diagnóstica em plantas:
um estudo nutricional de folhas de soja na busca pelos efeitos da infestação
por *Aphelenchoides besseyi*

São Carlos
2019

ANIELLE COELHO RANULFI

LIBS como ferramenta diagnóstica em plantas:
um estudo nutricional de folhas de soja na busca pelos efeitos da infestação
por *Aphelenchoides besseyi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2019

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

Ranulfi, Anielle Coelho

LIBS como ferramenta diagnóstica em plantas: um estudo nutricional de folhas de soja na busca pelos efeitos da infestação por *Aphelenchoides besseyi* / Anielle Coelho Ranulfi; orientadora Debora Marcondes Bastos Pereira Milori -- São Carlos, 2019.
147 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Soja. 2. LIBS. 3. Perfil nutricional. 4. Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser. 5. Calibration free. I. Milori, Debora Marcondes Bastos Pereira, orient. II. Título.

À minha base: família e amigos.

Sem o apoio deles, com absoluta certeza, as batalhas do caminho teriam sido mais duras, e o sabor da vitória não seria o mesmo. Afinal, a felicidade multiplica quando compartilhada! Em especial aos que deixaram saudades: meu fã e padrinho José Roberto Girardi (in memoriam), e à pessoa mais intensa que eu já conheci, meu primo Maurício Fabiano Pereira (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, meu Pai e mentor...

...por ter a mim confiado o dom da vida, e me fazer perfeitamente capaz para trilhar esse caminho na busca por sabedoria!

Agradeço aos meus pais Maria José e Luiz Antônio, meu alicerce...

...por todo suporte durante a busca de mais esse sonho!

Agradeço ao meu irmão Guilherme, minha melhor metade...

...por apoiar minha loucura, me incentivar no exercício da paciência e me ajudar quando eu mais precisei!

Agradeço aos meus afilhados Matheus e Júlia, meus anjinhos...

...por me mostrarem, da maneira mais difícil, que viver é para os fortes, e que desistir não é uma opção! Eles não sabem, mas durante esse período de doutorado, me proporcionaram muitos dos meus maiores ensinamentos de vida, e grande parte do meu combustível pra levantar e lutar todas as manhãs!

Agradeço aos meus familiares: avós, tios e tias, primos e primas, minha história...

...por toda torcida, orações, e desejos de sucesso!

Agradeço aos velhos amigos de longe, meu refúgio...

...por estarem sempre comigo no coração, por compartilhar os raros, porém intensos finais de semana que pudemos estar juntos ao longo dessa trajetória, e por sonhar o meu sonho sem que eu precise explicar nadinha!

Agradeço aos meus amigos de todos os dias, meus companheiros de estrada...

...por toda força e incentivo, por serem e me fazerem uma boa ouvinte, pela colaboração e boa vontade sempre, pelas experiências compartilhadas, por sanar minhas dúvidas criando outras, e pelo cafezinho com risos diário!

Agradeço à toda experiência e desafios proporcionados por este doutorado, minhas escolhas...

...pela possibilidade de expandir horizontes, conhecer pessoas e culturas, estabelecer novas conexões e aprender mesmo nas adversidades!

Agradeço à minha orientadora Dra. Débora Milori, meu exemplo profissional...

...pela confiança depositada e inspiração ao longo do caminho, pela história que escrevemos juntas e por todos os frutos colhidos, mesmo em tempos de grandes dificuldades!

Agradeço ao meu co-orientador e amigo Dr. Giorgio Senesi...

...pela oportunidade de encarar o novo, pela possibilidade de novos aprendizados e desafios, por todo ensinamento, e pela hospitalidade!

Agradeço ao amigo, pós doutorando e agora professor Dr. Gustavo Nicolodelli...

...por todas as discussões extremamente importantes acerca do trabalho desenvolvido, por todas as dicas dadas e por todos os momentos compartilhados!

Agradeço aos técnicos da Embrapa Instrumentação e pesquisadores parceiros, nas pessoas do Dr. Maurício Meyer e Dra. Edilene Ferreira...

...por todo apoio dispendido, amostras fornecidas, laboratório cedido, pelo trabalho executado e conhecimento dividido!

Agradeço à Embrapa Instrumentação, meu local de trabalho...

...pela infraestrutura de excelência fornecida à execução deste trabalho!

Agradeço ao CNR de Bari, na Itália...

...pela oportunidade, receptividade e infraestrutura! E ainda agradeço a todos os novos amigos que esse país me ajudou a encontrar!

Agradeço ao Instituto de Física de São Carlos...

...por todo suporte intelectual e financeiro, por me proporcionar ensino de excelência e infraestrutura de primeira!

Agradeço ao CNPq e CAPES...

... pela concessão da bolsa no início desse estudo e também pelo financiamento do meu doutorado sanduíche na Itália!

Agradeço, por fim, à Brasil Agritest, meu time...

...pela oportunidade de liderar uma equipe de pesquisa, por auxiliar meu desenvolvimento profissional em setores desafiadores, por me fazer sonhar um novo sonho, por acreditarem na minha capacidade e, por toda compreensão e incentivo para que esse doutorado fosse concluído com excelência e sucesso!

"Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir".

Cora Coralina

RESUMO

RANULFI, A.C. **LIBS como ferramenta diagnóstica em plantas:** um estudo nutricional de folhas de soja na busca pelos efeitos da infestação por *Aphelenchoides besseyi*. 2019. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

A soja e os seus derivados são uma das mercadorias agrícolas mais valiosas e comercializadas no mundo. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, cujo complexo é o principal gerador de divisas cambiais para o país. Porém, um dos principais fatores que podem limitar os rendimentos da cultura e a qualidade dos produtos é a presença de doenças. Para evitar maiores prejuízos é importante identificar rapidamente qual doença acomete a planta e determinar o método mais eficaz de manejo. Atualmente, uma doença recém descoberta que causa preocupação aos produtores é a infestação pelo nematoide *Aphelenchoides besseyi*, causador da, popularmente conhecida, Soja louca II. Ainda não existem métodos que proporcionem um diagnóstico preciso para a doença, sendo este realizado por inspeção visual da plantação. Sabendo que plantas saudáveis e doentes apresentam perfis nutricionais diferentes, este trabalho vem propor o uso da técnica analítica LIBS, associada ao método livre de calibração (CF), como uma ferramenta alternativa para diagnóstico da doença. A técnica LIBS permite análises multielementares simultâneas, de maneira rápida e de baixo custo. Já o método CF tem por principal vantagem dispensar o emprego de qualquer padrão de matriz compatível, ou material de referência, para as quantificações em LIBS, fazendo-o com base nas características físicas do plasma formado. Assim, a associação de ambos se torna absolutamente adequada para determinações analíticas em amostras desconhecidas. Neste trabalho, foram conduzidos estudos de caracterização qualitativos, por meio de um sistema LIBS de baixa resolução, e avaliações semiquantitativa e quantitativa por meio de medidas LIBS em um sistema com detecção de alta resolução (DP LIBS). O primeiro estudo demonstrou que, qualitativamente, as variações nos macroelementos Ca, Mg e K presentes nas folhas de soja, permitiu alcançar, em média, 90% de acurácia na diferenciação entre amostras doentes e saudáveis, e inferir que a doença provoca relativa diminuição da concentração de Ca e Mg, e um pequeno aumento nos níveis de K. As quantificações obtidas pelo método CF foram consideradas satisfatórias, além de pioneiras nas análises de amostras de folhas de soja puras. A partir dos perfis nutricionais quantificados foram construídos classificadores (classificação via regressão associada à regressão por mínimos quadrados parciais), cuja acurácia alcançada foi de 94%, 92% e 90%, respectivamente para os dados de concentração

obtidos pela técnica de referência, e DP LIBS+CF nas geometrias colinear e ortogonal. Na tentativa de eliminar o emprego de qualquer reagente, e ainda assim obter uma ferramenta diagnóstica precisa, foi conduzido um estudo semiquantitativo, também a partir da associação DP LIBS+CF. Baseado nas relações elementares entre os analitos que compõem a amostra, este apresentou acurácia diagnóstica superior a 90% para a geometria ortogonal. Portanto, este estudo permitiu o desenvolvimento de uma metodologia para diagnóstico que respeita 100% dos preceitos da Química Verde, e agrega muito ao sistema atual, quando o que se deseja é uma avaliação diagnóstica rápida para tomada de decisão imediata no campo.

Palavras-chave: Soja. LIBS. Perfil nutricional. Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser. Calibration free.

ABSTRACT

RANULFI, A.C. **LIBS as a diagnostic tool in plants:** a nutritional study of soybean leaves in the search for the infestation effects by *Aphelenchoides besseyi*. 2019. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Soybeans and their by-products are one of the most valuable and traded commodities in the world. Brazil is the second largest soybean producer in the world, whose soy complex is the main generator of foreign exchange for the country. However, one of the main factors that can limit crop yields and product quality is the occurrence of disease. To avoid further damage, it is important to quickly identify which disease affects the plant and determine the most effective method of management. Currently, a disease newly discovered and of concern to producers is the infestation by the nematode *Aphelenchoides besseyi*, which causes the disease known as GSFR (Green Steam and Foliar Retention). There are still no methods to provide a precise diagnosis for the disease, which is, nowadays, performed by visual inspection of the plantation. Knowing that healthy and diseased plants have different nutrient profiles, this work proposes the use of the LIBS technique, associated with the calibration free method (CF), as an alternative tool for the disease detection. The LIBS technique allows simultaneous multi-element analysis, quickly and inexpensively. The CF method has the main advantage of avoiding the use of any compatible standard matrix, or reference material, for LIBS quantifications, based on the physical characteristics of the plasma formed. Thus, the association of both becomes absolutely suitable for the analytical determination of unknown samples. Qualitative characterization studies using a low-resolution LIBS system, and semiquantitative and quantitative analysis using LIBS measurements in a high-resolution detection system (DP LIBS), were performed. The first study showed that it was possible to achieve, on average, 90% accuracy in the differentiation between diseased and healthy samples, and to infer that the disease provokes relative decrease in Ca and Mg concentration, and a small increase in K levels. Quantifications achieved by the CF method were considered satisfactory since it is a pioneer study in the analysis of pure soybean leaves. Classifiers were constructed from the nutritional profiles quantified by CF, applying classification via regression associated with partial least square regression, with accuracy of 94%, 92% and 90%, respectively, for the concentration data obtained by the reference technique, and DP LIBS + CF colinear and orthogonal. In attempt to eliminate the use of any chemical reagent and still obtain an efficient diagnostic tool, a semiquantitative study was conducted, also from

the DP LIBS + CF association and based on the elementary relations between the analytes that make up the sample, with accuracy diagnosis greater than 90% for DP LIBS in orthogonal geometry. Therefore, this study allowed the development of a diagnostic methodology that respects 100% of green chemistry principles, and adds a lot to the current system, if the desire is a rapid diagnostic evaluation for immediate decision making in the field.

Keywords: Soybean. LIBS. Nutritional profile. Laser-induced breakdown spectroscopy. Calibration-free.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Evolução anual da balança comercial brasileira e do agronegócio - 1997 a 2017 - (em US\$ bilhões).	23
Figura 2 -	Fotomicrografia do nematoide <i>Aphelenchoides</i> sp. divulgadas antes do estudo para determinação da espécie.	32
Figura 3 -	Em a) uma plantação de soja com regiões de plantas ainda verdes, doentes com HVRF. Em b) uma planta doente com HVRF (à esquerda) e uma planta sadia (à direita) com o mesmo tempo de plantio. Em c) também uma comparação de uma planta doente com folhas distorcidas e afiladas (à esquerda) e uma planta sadia (à direita) com seu trifólio em desenvolvimento normal. Em d) o detalhe de uma vagem com sinal de necrose e em e) um conjunto de plantas com vagens abortadas e necrosadas.	33
Figura 4 –	Esquema de um aparato geral para medidas LIBS ilustrando os principais componentes da instrumentação.....	36
Figura 5 –	Diagrama esquemático da evolução do plasma iniciado em uma superfície sólida plana.	38
Figura 6 –	Esquema temporal da evolução de um plasma induzido por laser. São mostrados ainda, o tempo de atraso para início das aquisições de emissão (t_d) e também a duração da aquisição, a que denominamos janela de aquisição (t_b).....	40
Figura 7 –	Evolução temporal de um plasma gerado em uma medida DP LIBS. O tempo de atraso entre os pulsos está representado por Δt , o tempo de atraso para início das aquisições está indicado por t_d , e a duração das aquisições por t_b	42
Figura 8 –	Diferentes configurações geométricas possíveis para o modo DP LIBS: Colinear (a), Feixes cruzados (b), Ortogonal com reaquecimento (c) e Ortogonal com pré-ablação (d).	43
Figura 9 -	À esquerda temos um exemplo do que denominamos trifólio conservado, e à direita, o trifólio desmembrado.....	60
Figura 10 –	Em a) saquinho sem ar e com água, em b) saquinho sem ar e sem água, em c) saquinho com ar e água e, em d) saquinho com ar e sem água.	61
Figura 11 –	Em a) é mostrada a folha de soja já triturada criogenicamente, pronta para ser prensada e dentro do porta-amostra (pastilhador). Em b) segue uma foto da prensa hidráulica usada para fornecer 8 toneladas de pressão para confecção da pastilha. E em c) a pastilha de folha de soja recém confeccionada.....	62

Figura 12 – Sistema comercial LIBS da Ocean Optics. Em 1 temos a fonte de energia, em 2 o laser para excitação da amostra, em 3 a câmara de ablação e em 4 o conjunto de 7 mini espectrômetros.	63
Figura 13 - Montagem experimental do sistema LIBS de alta resolução. Este sistema opera no modo SP LIBS (532 nm), DP LIBS colinear (espelho móvel removido) e DP LIBS ortogonal (linha descontínua). Todos os componentes operam em sincronia, controlada pelo gerador de atrasos.	66
Figura 14 – Foto do sistema experimental DP LIBS do Laboratório de Ótica e Fotônica da Embrapa Instrumentação.	67
Figura 15 - Exemplo de um gráfico de Boltzmann feito a partir das linhas de Ca selecionadas previamente. A melhor reta traçada nos pontos do gráfico permite a obtenção do coeficiente angular, a partir do qual se é determinada a temperatura do plasma, em Kelvin.	70
Figura 16 – Matriz de confusão obtida a partir da validação cruzada dos dados para avaliação de modelos de classificação a partir das classes sadia e HVRF, considerando a classe doente como a referência para estabelecimento das métricas.	74
Figura 17 – Tubos de ensaio contendo ácido nítrico em processo de digestão das amostras dentro do bloco digestor aberto aquecido.	75
Figura 18 – Na foto, equipamento Perkin Elmer PinAAcle™ 900T AAS da Embrapa Instrumentação. O equipamento possui um sistema de leitura automática programada para a GFAAS, que pode ser realizado através do posicionamento de várias amostras de uma única vez, no carrossel que pode ser visto à direita.	76
Figura 19 – Comparação de armazenagem das folhas de soja com o trifólio a) íntegro e b) desmembrado, após uma semana sob refrigeração na caixa de isopor com gelo.	78
Figura 20 - Espectro médio obtido para amostras sadias (esquerda) e doentes com soja louca II (direita). No primeiro espectro algumas linhas de emissão apresentam-se já identificadas, a partir da base de dados do NIST (64).	82
Figura 21 - Scree-plot para o conjunto Xingu II (a) e conjunto Parnaíba (b) obtidos a partir da PCA aplicada aos dados LIBS referentes a todo intervalo espectral adquirido.	83
Figura 22 - Gráficos que mostram os p-valores obtidos após aplicação do Teste t ponto a ponto do espectro (eixo da esquerda), na busca por picos de emissão que trouxessem diferença estatística significativa entre as classes sadia e doente. O eixo da direita traz a intensidade dos picos médios normalizados para cada classe. A coluna de gráficos da esquerda traz os dados do conjunto Xingu II, e a da direita, do conjunto Parnaíba. Em a) são mostrados um pico de Ca em cada um dos gráficos, em b) a região que contém dois picos de emissão do K, e em c) uma região que contém picos de Mg.	84

Figura 23 – Correlação entre as áreas dos picos obtidas por LIBS para Ca (422,67 nm), K (766,49 nm) and Mg (518,36 nm), e sua respectiva concentração elementar medida pela técnica de referência para os conjuntos Xingú II (esquerda) e Parnaíba (direita).	86
Figura 24 - Gráficos que mostram o comportamento dos loadings para as duas primeiras componentes principais. Em a) temos a análise para o conjunto Xingu II e em b) a análise para o conjunto Parnaíba.	88
Figura 25 – Gráfico de pontos (score-plot) e resultado da interpretação dos loadings para os dois conjuntos de amostras estudados. A partir da figura e da análise de loadings feita anteriormente, foi possível associar um aumento da concentração de K e uma diminuição da concentração de Ca e Mg nas amostras, à doença HVRF.	89
Figura 26 – Área dos picos avaliados em função dos diferentes atrasos do espectrômetro testados (a) e, gráfico dos espectros (b) contendo picos de Ca, em que pode ser observado o comportamento e evolução do mesmo de acordo com os tempos de atraso. O gráfico (c) apresenta a razão pico/linha base para os casos do Ca e Mg. E em (d) tem-se o gráfico da temperatura média em função dos atrasos do espectrômetro testados durante as medidas.	92
Figura 27 – Evolução das áreas dos picos de Ca e Mg em função da energia do pulso de excitação (a) e em (b) tem-se a evolução das razões de Intensidade do pico, pela linha de base próxima a ele também em função das variações de energia do pulso de laser de excitação. temperatura do plasma de acordo com as diversas energias do laser.	94
Figura 28 – Variação da área dos picos de Ca e Mg em função do intervalo de aquisição do sinal LIBS (a), perfil de um intervalo do espectro LIBS contendo picos de Mg I para cada intervalo de aquisição avaliado (b), variação da temperatura (c) e densidade de elétrons (d) com a largura da janela de aquisição.	96
Figura 29 – Variações nas áreas dos picos de Ca (a) e Mg (b) de acordo com os diferentes atrasos do espectrômetro (250 ns – preto, 500 ns – vermelho, 750 ns – azul) e diferentes tempos de atraso entre os pulsos. Em (c) é mostrado uma parte do espectro que contém linhas de Ca para valores de atraso entre os pulsos fixos em 500 ns e três diferentes tempos de atraso do espectrômetro. O gráfico em (d) mostra como ocorre a variação de temperatura, calculada a partir do gráfico de Boltzmann, para todos os tempos de atraso avaliados.	97
Figura 30 – Comparação das intensidades dos picos de emissão do Ca (a), Mg (b), K (c), Fe (d), Al (e) e Ti (f) presentes no espectro LIBS a partir das medidas SP e DP LIBS. Foram notados aumentos de intensidade de até 400% nas linhas.	99
Figura 31 – Microscopia eletrônica de varredura de uma pastilha de folhas de soja secas e moídas manualmente após uma medida com 3 pulsos acumulados	

	SP LIBS (a) e DP LIBS colinear (b). O diâmetro aproximado da cratera em (a) foi de 422 μm , e da cratera em (b), foi em média 940 μm	100
Figura 32 –	Gráficos da intensidade dos picos de C I e Ca II em função do tempo de atraso entre os pulsos para cinco diferentes energias de excitação do primeiro laser na medida DP LIBS ortogonal (a). E em (b), o mesmo gráfico anterior para o caso do Ca II, separado de acordo com os regimes de baixa ou alta energia do laser 1 de medida, evidenciando a diferença de comportamento.	101
Figura 33 –	Em a) temos o perfil de variação das temperaturas, calculadas pelo gráfico de Boltzmann a partir de picos de Ca, em b) a densidade de elétrons obtida para o regime de altas energias, bem como o critério de McWhirter para a energia de 16 mJ, e, em c) temos a razão entre o sinal DP/SP LIBS para um pico de Ca. Todos os gráficos em função do tempo de atraso entre os pulsos que foi variado na otimização do sistema.....	103
Figura 34 –	Gráficos de caixa para os valores de temperatura encontrados no conjunto Xingu II avaliado por LIBS na geometria colinear (esquerda) e ortogonal (direita).	105
Figura 35 –	Gráfico de densidade eletrônica do plasma gerado pela medida DP LIBS na geometria colinear (barra cinza) e os valores de densidade mínimos (linhas) necessários para a assunção do equilíbrio termodinâmico local do plasma, segundo o critério de McWhirter, para cada um dos elementos Al, Ca, Fe, K, Mg e Mn que serão utilizados nas próximas etapas para quantificação nutricional das amostras de folhas de soja. Em a) temos uma visão geral e em b) uma ampliação da região do gráfico que contém as densidades mínimas. A legenda em a) é a mesma para ambos os gráficos.	107
Figura 36 -	Gráfico da densidade eletrônica do plasma gerado pela medida DP LIBS na geometria ortogonal modo aquecimento (barra preta) e os valores de densidade mínimos (linhas) necessários para a assunção do equilíbrio termodinâmico local do plasma, segundo o critério de McWhirter, para cada um dos elementos Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg e Mn que serão utilizados nas próximas etapas para quantificação nutricional das amostras de folhas de soja.	108
Figura 37 –	Gráficos de correlação direta entra a área do pico LIBS no sistema de geometria colinear, e a concentração obtida pela medida da técnica de referência (AAS) para os elementos Al, Ca, Fe, K Mg e Mn.....	111
Figura 38 -	Gráficos de correlação direta entra a área do pico LIBS no sistema de geometria ortogonal, e a concentração obtida pela medida da técnica de referência (AAS) para os elementos Al, Ca, Fe, K Mg e Mn.....	112
Figura 39 –	Curvas de calibração geradas para o Fe. Em a) temos a curva para o sistema de geometria colinear, e em b) dados para o sistema em geometria ortogonal.....	113

- Figura 40 – Curvas de validação obtidas a partir de amostras externas para os elementos indicados e concentração predita a partir dos dados DP LIBS operando com geometria colinear. 115
- Figura 41 - Curvas de validação obtidas a partir de amostras externas para os elementos indicados e concentração predita a partir dos dados DP LIBS operando com geometria ortogonal. 116
- Figura 42 – Os gráficos a, c e e apresentam a correlação entre os valores de concentração obtidos através dos cálculos pelo método CF, e medidos pela técnica de referência para as aquisições do conjunto Xingu II pelo DP LIBS na geometria colinear, para os elementos Al, Fe, e Mg. A coluna da direita mostra, para os mesmos elementos, um gráfico de linhas e símbolo, evidenciando as concentrações AAS (preta) e CF (azul), obtidas para cada amostra representada no eixo X (1 a 71). As setas em vermelho indicam as amostras que não passaram pelo critério de McWhirter para possibilidade de assunção de LTE. A divisão em magenta aponta de 0-35 amostras sadias e 36-71 amostras doentes. 119
- Figura 43 - Os gráficos a e c apresentam a correlação entre os valores de concentração obtidos através dos cálculos pelo método CF, e medidos pela técnica de referência para as aquisições do conjunto Xingu II pelo DP LIBS na geometria colinear para os elementos K e Mn. A coluna da direita mostra, para os mesmos elementos, um gráfico de linhas e símbolo, evidenciando as concentrações AAS (preta) e CF (azul), obtidas para cada amostra representada no eixo X (1 a 71). As setas em vermelho indicam as amostras que não passaram pelo critério de McWhirter para possibilidade de assunção de LTE. A seta em verde indica um intervalo de 4 outliers excluídos do gráfico, cujos erros de ajuste da curva Lorentziana no pico superaram os 10% aceitáveis. A divisão em magenta aponta de 0-35 amostras sadias e 36-71 amostras doentes. 120
- Figura 44 – Na coluna da esquerda vemos os gráficos de correlação entre os valores de concentração obtidos através dos cálculos pelo método CF, e medidos pela técnica de referência para as aquisições do conjunto Xingu II pelo DP LIBS na geometria ortogonal, para os elementos Al, Fe, e Mg. A coluna da direita mostra, para os mesmos elementos, um gráfico de linhas e símbolo, evidenciando as concentrações AAS (preta) e CF (azul), obtidas para cada amostra representada no eixo X (1 a 71). A divisão em magenta aponta de 0-35 amostras sadias e 36-71 amostras doentes. 122
- Figura 45 – Na coluna da esquerda vemos os gráficos de correlação entre os valores de concentração obtidos através dos cálculos pelo método CF, e medidos pela técnica de referência para as aquisições do conjunto Xingu II pelo DP LIBS na geometria ortogonal para os elementos Mn, Cu e K. A coluna da direita mostra, para os mesmos elementos, um gráfico de linhas e símbolo, evidenciando as concentrações AAS (preta) e CF (azul), obtidas para cada amostra representada no eixo X (1 a 71). A divisão em magenta aponta de 0-35 amostras sadias e 36-71 amostras doentes. As setas em verde indicam 2 amostras excluídas como outliers das medidas de AAS por apresentarem valores muito altos e discrepantes das demais. 123

- Figura 46 – Gráficos de coeficiente de correlação de Pearson (linha espessa em preto) entre os valores de intensidade e a concentração do K obtida pela técnica de referência, para cada um dos comprimentos de onda possíveis de medir através do espectrômetro Echelle, para o caso das avaliações DP LIBS colinear, em a), e ortogonal, em b). O eixo y à direita é referente aos valores de intensidade do espectro LIBS, para que fosse possível a visualização do perfil do pico no intervalo de estudo, após correção da linha de base. 125
- Figura 47 - Espectro médio das amostras sadias do conjunto Xingu II medidas no sistema DP LIBS colinear (em vermelho) e ortogonal (em preto). 126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Informações dos conjuntos de amostras de folhas de soja.	59
Tabela 2 –	Linhas de Cálcio I, e os parâmetros envolvidos na transição, selecionadas para o cálculo da temperatura do plasma a partir do método de Boltzmann ao longo do trabalho. Além dos comprimentos de onda são mostrados na tabela o coeficiente de Einstein para emissão espontânea, as energias inferior e superior envolvidas na transição, e a degenerescência do nível superior de energia.	69
Tabela 3 –	Dados referentes às linhas selecionadas para o cálculo da densidade de elétrons através do método de Saha-Boltzmann.	71
Tabela 4 –	Especificação dos comprimentos de onda dos picos usados na quantificação elementar das amostras de folhas de soja, tanto pelo método convencional de curvas de calibração, quanto pelo método CF.	72
Tabela 5 –	As concentrações obtidas para diferentes elementos dos conjuntos Xingu II e Parnaíba obtidos pela técnica de referência. Os valores estão em mg/Kg.....	80
Tabela 6 –	Intervalos do espectro LIBS que apresentaram diferença estatística entre as classes sadia e doente com soja louca II, e que compreendem picos de emissão dos elementos Ca, K e Mg.....	85
Tabela 7 –	Concentrações médias por classe de Ca, K e Mg, obtidas por FAAS.....	90
Tabela 8 –	Matrizes de confusão para o conjunto Xingu II e Parnaíba obtidas através do modelo de classificação gerado a partir dos intervalos do espectro LIBS pré-selecionados.	90
Tabela 9 –	Números de emissores médios encontrados nas amostras do conjunto Xingu II medidas pelo sistema DP LIBS colinear e ortogonal, bem como a massa atômica utilizada para cada elemento nas quantificações por CF.	117
Tabela 10 –	Matriz de confusão obtida na validação cruzada durante a avaliação dos modelos de classificação via regressão, associado ao método dos mínimos quadrados parciais, para os dados de quantificação pela técnica de referência (coluna 1: AAS), pelas concentrações elementares obtidas através do CF para os dados do DP LIBS colinear (coluna 2) e ortogonal (coluna 3).....	129
Tabela 11 –	Métricas de avaliação dos modelos de classificação gerados para os dados de quantificação por AAS (coluna 1), pelas concentrações elementares obtidas através do CF para os dados do DP LIBS colinear (coluna 2) e ortogonal (coluna 3).	129

- Tabela 12 – Matriz de confusão obtida na validação cruzada durante a avaliação dos modelos de classificação via regressão, associado ao método dos mínimos quadrados parciais, para as razões das concentrações obtidas pela técnica de referência (coluna 1: AAS), e pelos dados semiquantitativos obtidos por CF para os dados do DP LIBS colinear (coluna 2) e ortogonal (coluna 3)..... 133
- Tabela 13 – Métricas de avaliação dos modelos de classificação gerados para as razões dos dados de quantificação por AAS (coluna 1), e pelas avaliações semiquantitativas obtidas por CF para os dados do DP LIBS colinear (coluna 2) e ortogonal (coluna 3)..... 133

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Contextualização do problema.....	23
1.2	Hipótese.....	26
1.3	Objetivos	27
1.3.1	Objetivo geral.....	27
1.3.2	Objetivos específicos	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1	Fotônica e agricultura: estado da arte.....	29
2.2	A síndrome: HVRF ou Soja Louca II	31
3	REVISÃO TEÓRICA	34
3.1	Configuração de um sistema LIBS	35
3.2	Ablação a laser, formação e evolução do plasma	36
3.3	LIBS com pulso duplo: um avanço da técnica.....	41
3.4	Características dos plasmas induzidos por laser: das amostras às análises quantitativas.....	44
3.4.1	Função de interação: absorção de energia e ablação estequiométrica	47
3.4.2	Função de excitação/ionização: o comportamento das emissões das espécies e descrição do plasma pela temperatura e densidade de elétrons	48
3.4.3	Função de detecção: uma dependência da eficiência da instrumentação.....	54
3.5	LIBS quantitativo	54
3.5.1	Curvas de calibração: Análises univariadas e multivariadas	55
3.5.2	Método livre de calibração (CF)	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1	Amostras de soja	59
4.2	Armazenamento, transporte e preparo de amostras	59
4.3	Medidas LIBS: equipamentos e parâmetros utilizados.....	62
4.3.1	LIBS pulso único: sistema comercial Ocean Optics	62
4.3.1.1	Tratamento dos dados LIBS: sistema comercial Ocean Optics.....	63
4.3.2	LIBS com sistema de detecção de alta resolução (sistema de bancada).....	65
4.3.2.1	Tratamento dos dados LIBS: sistema de bancada	67

4.4	Ferramenta de classificação: geração de modelos a partir de CVR + PLSR.....	72
4.5	Técnica de referência: AAS (Atomic Absorption Spectrometry)	74
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	77
5.1	Armazenamento de amostras.....	77
5.2	Concentrações elementares de referência: uma avaliação dos dados de AAS	78
5.3	Sistema comercial LIBS	81
5.3.1	Avaliação inicial dos dados	81
5.3.2	Perfil nutricional de amostras sadias e doentes: uma análise do espectro LIBS	82
5.3.3	Área do pico LIBS <i>versus</i> concentração obtida por AAS: uma análise univariada dos dados	85
5.3.4	Métodos quimiométricos aplicados aos intervalos de interesse	86
5.4	Otimização de parâmetros: SP LIBS	91
5.5	Otimização de parâmetros: DP LIBS Colinear.....	96
5.6	Comparação: SP LIBS x DP LIBS colinear	98
5.7	Nova configuração: DP LIBS Ortogonal modo reaquecimento	100
5.8	Avaliação quantitativa	104
5.8.1	Análise univariada	109
5.8.2	Método Livre de calibração.....	117
5.9	Avaliação diagnóstica.....	126
5.9.1	Quantitativa: perfil nutricional	126
5.9.2	Semiquantitativa: uma relação entre os nutrientes presentes na planta.....	131
6	CONCLUSÃO.....	135
	REFERÊNCIAS.....	139

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização do problema

A saga brasileira de crescimento do agronegócio nas últimas décadas é motivo de orgulho para todos os brasileiros. E neste contexto o Brasil se desenvolveu e consolidou uma das agropecuárias mais eficientes do mundo. (1) O setor do agronegócio tem fundamental importância para a economia do nosso país. Seu PIB representou 21,58% do PIB total do Brasil em 2017, (2) ano em que o PIB brasileiro avançou 1% em relação a 2016, após dois anos consecutivos de queda de 3,5%, em 2015 e 2016. (3) A principal atividade que alavancou o PIB foi a agropecuária, que tem um peso de apenas 5,3% na composição deste, porém respondeu com 0,7% do valor total adicionado ao PIB brasileiro. Esse valor se deu pelo excelente desempenho da agricultura, com destaque para as lavouras do milho e da soja, que tiveram safra recorde e cresceram respectivamente 55,2% e 19,4% em relação à safra anterior. (4) O saldo de outros segmentos da economia apresentara resultados negativos ao longo dos últimos anos, e o agronegócio tem sido responsável por manter o superávit da balança comercial brasileira. Em 2017, a balança comercial do país fechou com um superávit de quase 67 bilhões de dólares, sendo o melhor resultado da série histórica iniciada em 1989, como pode ser observado na Figura 1. Se não fosse o agronegócio, a balança passaria a um déficit de quase 15 bilhões de dólares, reforçando a importância do setor para a economia. (5)

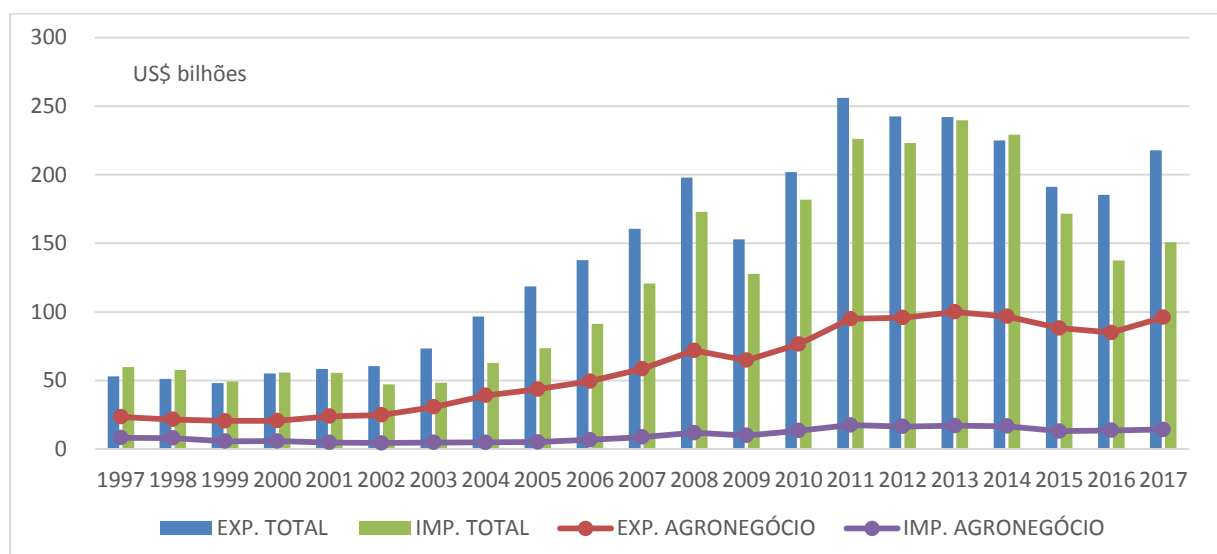


Figura 1 -Evolução anual da balança comercial brasileira e do agronegócio - 1997 a 2017 - (em US\$ bilhões).

Fonte: BRASIL ... (5)

Neste cenário, o cultivo de grãos, sendo a soja o principal deles, ganhou destaque, sendo um dos principais motores para o crescimento do setor. Em 2017 o segmento de grãos foi o principal item da pauta de exportações do agronegócio com quase 26 bilhões de dólares em venda contra um total de 96 bilhões em exportação brasileira. (6) Em 2018, a estimativa é que a safra de grãos seja a segunda maior da história, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), e a produção de soja é a primeira grande responsável por este bom desempenho do setor. Só a leguminosa deve apresentar uma produção em 2017/2018 de 117 milhões de toneladas, registrando um aumento de 2,7% em relação à safra anterior, contra uma estimativa de produção total para a safra de grãos de 232,6 milhões de toneladas no mesmo período. (7)

Em relação à soja, esta é a cultura brasileira que mais cresceu nas últimas décadas e representa mais da metade da área plantada em grãos no Brasil. (7) O denominado complexo de soja, que compreende a produção de grão, farelo e óleo, é o principal gerador de divisas cambiais para o país. (8) No ano de 2017 o Brasil se manteve como o segundo colocado em produção de soja no mundo, detendo aproximadamente 32% desta, o que corresponde a cerca de 114 milhões de toneladas. Os Estados Unidos mantiveram a liderança com uma produção de 117 milhões de toneladas. Logo após o Brasil no ranking, segue a Argentina. A produtividade nacional de soja atingiu 3362 kg/hectare em uma área plantada de quase 34 milhões de hectares segundo dados divulgados pela Conab. (9) De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) a produtividade dos EUA chegou a 3501 kg/ha, ou seja, uma produção maior do que a do Brasil, em uma menor área plantada. (9) Dessa maneira, para continuar progredindo em produtividade, disputar a primeira colocação no ranking dos maiores produtores de soja do mundo e, principalmente garantir o fornecimento de grãos para suprir a demanda crescente por alimento no planeta, são necessários esforços na busca por alternativas que permitam melhorar as condições do setor produtivo. Promovendo ainda aumento da produção sem a necessidade de grande expansão das áreas plantadas. Segundo dados divulgados pela USDA, a previsão é que o Brasil supere os EUA em 500 mil toneladas a produção de soja na safra 2018/2019, o que seria um feito bastante importante. Claro que inúmeros fatores influenciam nessa estimativa e podem fazê-la mudar, porém o Brasil encontra-se em uma posição bastante privilegiada e confortável diante do cenário mundial como grande concorrente à maior produtor e exportador do grão. (10)

Porém, uma das principais causas que podem limitar os rendimentos das culturas e a qualidade dos produtos são as doenças e pragas que afetam as lavouras. Para a soja há mais de 40 doenças causadas por fungos, bactérias e vírus já identificados no Brasil. A monocultura e a

adoção de manejos inadequados têm favorecido o surgimento de novas doenças e agravou as de menor importância. (11) Para evitar maiores prejuízos é importante identificar rapidamente qual doença acomete a planta e determinar o método mais eficaz no manejo, reduzindo o risco de danos. Sendo assim, vale salientar a necessidade cada vez mais pungente de métodos que auxiliem a compreensão das doenças, e possam corroborar no diagnóstico das mesmas valendo-se de técnicas que permitam respostas cada vez mais rápidas e economicamente viáveis, dada à necessidade competitiva do setor.

Além disso, atualmente é preciso associar à agricultura os compromissos internacionais assumidos pelo Brasil e relacionados à sustentabilidade ambiental. E para avançar no desenvolvimento agropecuário e acompanhar a demanda de forma sustentável, não há como prescindir de tecnologias e conhecimentos que otimizem e tornem o processo de produção no campo mais eficiente. Uma alternativa para melhoria do processo de produção agrícola é a agricultura de precisão, que é uma prática de gestão e de gerenciamento de produção agrícola, na qual se utiliza a tecnologia da informação e o conhecimento da variabilidade espacial de vários fatores, como: o solo, a disponibilidade de água, o clima, a distribuição de patógenos, etc., para otimização da produção. O grande marco para o início da agricultura de precisão foi o desenvolvimento do GPS (Global Position System), uma tecnologia que permitiu associar determinados parâmetros, como fertilidade do solo ou taxa de produção, à uma localização exata. (12) A partir de dados específicos de áreas georreferenciadas, implanta-se o processo de manejo localizado, aumentando a eficiência destes. Além disso, a agricultura de precisão traz tecnologias que vêm proporcionar grande economia e redução de impactos ambientais, permitindo, por exemplo, a aplicação da dosagem correta de adubos e agrotóxicos para cada região da cultura, o planejamento da reposição de nutrientes do solo a partir de mapas de fertilidade construídos, entre outras inúmeras possibilidades, evitando desperdícios e contaminações desnecessárias.

Relativo à área fitopatológica, o real desafio para a sua aplicação está na compreensão das doenças, seu desenvolvimento e sintomas, e disponibilização de sensores e equipamentos que permitam avaliações mais rápidas, efetivas, sem a necessidade de grande preparo de amostra e sem a geração de resíduos.

Atualmente, uma doença que preocupa os produtores de algumas das principais regiões produtoras de grãos do país, é a haste verde e retenção foliar (HVERF), fazendo referência a um dos principais sintomas causados pela doença. A ocorrência de HVERF é observada desde as primeiras plantações comerciais de soja no Brasil, (13) e associada com severos ataques de percevejos às plantações (14) e também à desordens nutricionais. (15) Porém, nos últimos dez

anos, a incidência de HVRF sem a associação com os motivos acima mencionados, vem atingindo níveis epidêmicos, principalmente nas regiões quentes e úmidas dos estados do Maranhão, Tocantins, Pará e norte do Mato Grosso, causando perdas de até 100% da produção. (16) Números alarmantes como estes ressaltam a necessidade de técnicas que possam auxiliar na compreensão, diagnóstico e, posteriormente, métodos alternativos de manejo da mesma.

A doença é popularmente conhecida por Soja louca II entre os produtores e pesquisadores. Ela impede a formação de vagens e a finalização do ciclo reprodutivo. Os sintomas observados são mais evidentes após a floração e até o período de colheita, quando as plantas doentes permanecem verdes (hastes, pecíolos, folhas e vagens). (17) Recentemente, pesquisadores da EMBRAPA e EPAMIG apontaram o nematoide *Aphelenchoides besseyi*, como o agente causador da doença. (17) Infelizmente ainda não existem métodos que proporcionem um diagnóstico assertivo, viável e precoce, tratamentos eficazes para a doença, ou manejo adequado para controle. Atualmente, a identificação de HVRF é feita por inspeção visual da plantação, levando ao diagnóstico tardio e muitas vezes a erros.

Assim, devido à crescente demanda de instrumentação para análises mais rápidas e precisas, que se adequem aos compromissos relacionados à sustentabilidade, objetivando o aumento da produtividade que deve acompanhar o rápido crescimento populacional, o presente estudo busca a caracterização, no âmbito nutricional, de uma das principais culturas do país, a soja, relacionada a uma das principais doenças que afetam essa cultura, a HVRF ou Soja Louca II, por meio da técnica de espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS, acrônimo do inglês, Laser-Induced Breakdown Spectroscopy) associada ao método livre de calibração (CF, acrônimo do inglês, Calibration-free). O LIBS é uma técnica óptica de análise multielementar que possui características particulares, como a rapidez na medida e a pouca ou nenhuma necessidade de preparo da amostra, que fazem dela uma excelente candidata a aplicações na agricultura. A possibilidade de avaliações quantitativas dos analitos para fins diagnósticos por meio do método CF também foi exaustivamente explorado neste trabalho e traz como principal vantagem a não necessidade de prévia calibração do sistema por meio de matrizes de padrões compatíveis ou materiais de referência certificados. A associação de ambos pode, portanto, ser muito eficiente no que diz respeito a avaliações analíticas de amostras desconhecidas. É importante mencionar o pioneirismo e importância desse estudo, que pode ser estendido a posteriori a diversas outras culturas e doenças de interesse nacional, e até global, para a agricultura.

1.2 Hipótese

As plantas em geral podem sofrer estresses bióticos e abióticos, levando a alterações em seu metabolismo. Elas são capazes de detectar a presença de patógenos invasores, por exemplo, e responder à presença deles ativando seu sistema de defesa, que por sua vez provoca uma reação em cadeia no combate ao invasor. (18) Deficiências nutricionais do solo ou ainda estresse hídrico, são exemplos de perturbações abióticas que desencadeiam também, em maiores ou menores proporções, alterações metabólicas na planta (19) Tais processos levam a alterações na composição química da célula e, conseqüentemente, da planta como um todo. Assim, entende-se que as alterações desencadeadas resultem em diferentes concentrações elementares nas diferentes partes da planta. Sabendo que diferentes tipos de estresses acarretam diferentes respostas metabólicas, acredita-se que o perfil de alterações nutricionais pode ser associado a diferentes doenças ou distúrbios da planta e, portanto, pode servir como fonte de informação diagnóstica para a lavoura.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

Tendo clara a hipótese em que se baseia o trabalho, e sendo a cultura da soja um dos principais motores do agronegócio, com este trabalho pretendeu-se avaliar a possibilidade do uso da técnica LIBS, associada também ao método CF, como uma ferramenta de investigação nutricional em folhas de soja de maneira rápida e sem geração de resíduos que auxilie por fim, no diagnóstico de uma das doenças que mais causam perdas para os produtores de soja, a conhecida Soja Louca II, ou HVRF, como chamaremos daqui em diante.

1.3.2 Objetivos específicos

O estudo abordado foi conduzido em algumas etapas. Cada uma delas contou com um desafio na busca por uma série de objetivos específicos que serão listados a seguir e foram essenciais nas tomadas de decisão dos passos seguintes do trabalho, bem como para a conclusão do mesmo. Assim, os objetivos específicos foram:

- Avaliar qualitativamente os dados LIBS obtidos através de um sistema comercial, de relativa baixa resolução, quanto às alterações nutricionais encontradas ao comparar um grupo de amostras sadias com um grupo de amostras HVRF;

- Verificar possibilidade de diferenciação de amostras sadias e HVRF por meio dos dados LIBS qualitativos;
- Otimizar o sinal LIBS para a matriz do tipo pastilhas de folhas de planta (soja), no sistema de bancada, operando no modo de Pulso Duplo (DP, acrônimo do inglês Double Pulse) em duas diferentes geometrias: colinear e ortogonal, com a finalidade de se aumentar a sensibilidade das medidas;
- Executar a digestão ácida das amostras para que pudessem ser medidas pela a técnica de referência escolhida: Espectroscopia de Absorção Atômica (AAS, acrônimo do inglês Atomic Absorption Spectroscopy), objetivando uma base de comparação satisfatória para os dados LIBS;
- Avaliar os dados do sistema DP LIBS e aplicar, por fim, métodos de quantificação dos analitos nos dados LIBS: calibração convencional e CF;
- Propor uma metodologia semiquantitativa de análise dos dados LIBS por meio do CF em amostras de plantas de soja;
- Compreender as alterações nutricionais proporcionadas pela doença HVRF em plantas de soja;
- Construir e validar modelos de classificação na tentativa de alcançar o diagnóstico da HVRF através dos dados LIBS submetidos ao CF, tanto quantitativo quanto semiquantitativo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fotônica e agricultura: estado da arte

As técnicas fotônicas são largamente aplicadas em diferentes áreas da ciência por apresentarem características como alta sensibilidade, grande precisão e potencial de portabilidade. Na agricultura sua utilização vem ganhando atenção nos últimos anos. Estudos em diferentes setores vêm demonstrando a potencialidade destas técnicas, bem como a alta capacidade de, a partir delas, se desenvolver ferramentas interessantes para análises ambientais. (20-34) O fato de as técnicas requererem pouco ou nenhum preparo da amostra, as colocam como grandes indicadas para aplicações em larga escala, promovendo o advento da agricultura de precisão. Além disso, as técnicas ópticas em sua grande maioria, seguem os preceitos da Química Verde, ou seja, métodos em que são reduzidos ou eliminados o uso e a geração de resíduos químicos nocivos à saúde humana e ao ambiente. (35)

Nesse contexto, as características comuns às técnicas fotônicas fazem delas ferramentas valiosas para aplicações na agricultura, sendo a técnica LIBS uma delas. Nesta área, é crescente o número de trabalhos que demonstram a potencialidade da técnica na investigação de macronutrientes, micronutrientes e contaminantes em plantas, (36–44) em solos, (27,31,45–47) em sedimentos, água e também fertilizantes.

Pereira e Milori (22) ressaltaram em 2010 a importância da avaliação da composição mineral de plantas para compreensão de doenças. No caso, investigaram a doença Huanglongbing (HLB) em plantas de citros e, para isso, utilizaram da Fluorescência de Raio-X e ferramentas quimiométricas para identificação de alguns elementos essenciais para a diferenciação de três classes de plantas: Sadias, HLB Sintomáticas e HLB Assintomáticas. O estudo evidenciou as alterações na composição dos macro e micronutrientes em plantas de citros, e ainda, demonstrou a possibilidade de prever a fase de infecção através da composição mineral. Mais tarde, utilizando mudas controladas e inoculadas com a mesma doença, Pereira e colaboradores (21) verificaram que os dados LIBS, juntamente com ferramentas quimiométricas, foram extremamente eficazes na investigação da composição mineral de plantas saudáveis e doentes, demonstrando o sucesso da técnica. Mais recentemente, utilizando LIBS e diferentes doenças e deficiências nutricionais, Sankaran e colaboradores (42) mostraram a capacidade da técnica em distinguir entre doenças com sintomas similares através do perfil espectral. Focando nas variações elementares, Ranulfi e colaboradores (20,48) conseguiram diferenciar folhas de plantas sadias e doentes em dois diferentes estágios,

sintomático e assintomático também através da técnica LIBS, com modelos de classificação de amostras que alcançaram 74% de acerto.

Trabalhos desenvolvidos por Trevizan e colaboradores, (38,41) e Santos e colaboradores, (49) contribuíram ainda para a demonstração da possibilidade de análises não apenas qualitativas em plantas, mas também quanto a determinação elementar quantitativa. Através de amostras de materiais de referência certificados foram construídas curvas de calibração de diferentes elementos, baseados na altura do pico de emissão LIBS do nutriente a ser avaliado. É importante mencionar que os autores destacaram a dificuldade de se obter sinal LIBS com baixo desvio para uma mesma amostra, relatando dificuldades com a influência do tamanho e distribuição das partículas, e tipo de amostra, resultando em diferentes porosidades de superfície, ou seja, o efeito provocado pelo tipo de matriz.

Assim, obter materiais certificados para a referência quantitativa dos dados LIBS que sejam matricialmente compatíveis com as amostras a serem avaliadas é essencial. Ao mesmo tempo, é desafiador, já que materiais desse tipo são poucos e dispendiosos. Portanto, fica evidente um dos grandes desafios intrínsecos à técnica LIBS, o tratamento de dados, de maneira a superar os desafios relacionados aos efeitos de matriz e quaisquer outros que possam interferir na qualidade das análises, e ainda o desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos para quantificação elementar precisa.

Além disso, um outro desafio também relacionado à técnica encontra-se no limite de detecção, ou seja, elementos com baixa concentração na amostra podem não apresentar linhas de emissão no espectro LIBS, não sendo possível avaliá-los. Na busca por aumento de sensibilidade da técnica LIBS alguns avanços foram propostos ao longo do tempo, um deles relacionado ao uso de múltiplos pulsos de laser para se obter aumento da excitação do plasma induzido pelo laser e conseqüente melhoria do sinal aqüisionado. Os primeiros trabalhos empregando sistemas DP LIBS, ou seja, com dois pulsos de laser em seqüência, foram sugeridos nos anos de 1969 e 1970, respectivamente por Piepmeier e Malmstadt, (50) e Scott e Strasheim, (51) aplicados a ligas de alumínio e medidos em atmosfera ambiente.

Inicialmente, esse modo de operação do sistema foi abordado a partir de um único laser que pudesse gerar dois pulsos, e logo foi observado que o uso de um único laser trazia problemas relacionados à dificuldade de obtenção de dois pulsos em seqüência, de estabilidade e energia comparáveis, e ainda a impossibilidade de mudança de comprimento de onda dos pulsos, bem como sua duração. Dessa maneira, foram realizados os primeiros experimentos a partir do que se chamou configuração colinear. Ou seja, dois pulsos de laser percorrendo o mesmo caminho óptico pouco antes de atingir a amostra, com um tempo de atraso entre eles.

Analiticamente, em 1984 Cremers e colaboradores (52) empregaram o DP LIBS na tentativa de melhorar o limite de detecção de um conjunto de analitos, como lítio, potássio, cálcio, magnésio, alumínio e boro, de amostra em solução aquosa. Recentemente, DP LIBS foi aplicado em amostras de solo na tentativa de investigar o aumento na sensibilidade do sinal ao comparar com os espectros obtidos pelo uso do LIBS com pulso único (SP LIBS, acrônimo do inglês *Single Pulse LIBS*), ou seja, o LIBS convencional. Nicolodelli e colaboradores (46) mostraram que algumas linhas de emissão aumentaram de intensidade em aproximadamente 5 vezes. Em um outro trabalho, amostras de fertilizantes foram avaliadas por DP LIBS na configuração colinear e comparadas com os dados obtidos pela técnica de referência (ICP-OES, do inglês *Inductively coupled plasma - optical emission spectroscopy*). Neste estudo, segundo os autores, o limite de detecção aumentou em até sete vezes quando comparados com as avaliações realizadas pelo SP LIBS, e este aumento foi atribuído à maior quantidade de massa ablacionada da amostra. (53)

Portanto, investigações em amostras agroambientais estão começando a ser feitas utilizando a técnica e demonstrando avanços consideráveis de acurácia nas análises por LIBS. Em plantas de soja, este é um trabalho pioneiro, em que se pretendeu avançar e contribuir para a consolidação da técnica como uma alternativa para aplicações na agricultura de maneira qualitativa e também quantitativa, realizado a partir de amostras de campo, ou seja, que levam em consideração um número grande de variáveis que podem influenciar na composição elementar das plantas (como a composição do solo, humidade e temperatura a que estão submetidas as plantas). Assim, este trabalho vem contribuir na busca por uma técnica limpa, rápida e precisa, que possa ser aplicada em larga escala e, através dela, se alcançar um diagnóstico confiável da doença HVRF em amostras de soja por meio de avaliações qualitativas e também quantitativas, e posteriormente abrir portas para novas investigações agronômicas nessa mesma linha.

2.2 A síndrome: HVRF ou Soja Louca II

Conforme mencionado na seção anterior, essa é uma doença que vem incomodando o setor produtivo da soja no Brasil na última década, e causando perdas irreparáveis ao setor. Diversas causas foram investigadas desde o seu aparecimento, porém foram descartadas após um determinado tempo de estudo. Dentre essas, a presença de vírus, danos causados por herbicidas, desordens nutricionais, entre outras. (17) A presença do nematodo *Aphelenchoides* sp. foi apontada inicialmente por Chaves, em 2013 (54) e investigada mais recentemente por Meyer e

colaboradores em um estudo conduzido em amostras coletadas entre 2012 e 2015, e que mostraram a presença dos nematoides na grande maioria das amostras que apresentavam sintomas característicos de HVRF. (17) A Figura 2 mostra uma imagem do nematoide causador da doença. A partir do isolamento dos nematoides, multiplicação dos mesmos em colônias de fungos, e inoculação destes em plantas de soja sadias em ambiente controlado, eles observaram a manifestação dos mesmos sintomas das plantas sintomáticas que haviam localizado em campo. Os nematoides foram, por fim, recuperados das plantas estudadas e, baseado em dados morfológicos e moleculares foi possível a conclusão de que o agente causal da doença se tratava do *Aphelenchoides besseyi*, revelado no estudo publicado por Meyer e colaboradores em meados de 2017. (17)



Figura 2 - Fotomicrografia do nematoide *Aphelenchoides* sp. divulgadas antes do estudo para determinação da espécie.

Fonte: EPAMIG. (55)

Essa doença pode atingir a planta e iniciar a manifestação dos sintomas a partir do estágio vegetativo V5 ou V6 (quando a planta já possui no quinto ou sexto nó, em seu topo, folhas completamente desenvolvidas), porém os sintomas são bem mais facilmente identificáveis a partir da floração até o período de colheita, em que as plantas doentes permanecem verdes e as plantas sadias apresentam-se secas e ideais para a colheita. As flores das plantas de soja doentes normalmente são abortadas. Nas folhas da parte superior da planta sintomas como distorções, afilamentos e engrossamento das nervuras podem ser observados. Em relação aos nós, estes

normalmente apresentam-se mais grossos, e as vagens por sua vez, podem ficar deformadas, geralmente em número reduzido e muitas com sinal de necrose. (17) A Figura 3 a seguir ilustra alguns dos sintomas mencionados.



Figura 3 - Em a) uma plantação de soja com regiões de plantas ainda verdes, doentes com HVRF. Em b) uma planta doente com HVRF (à esquerda) e uma planta sadia (à direita) com o mesmo tempo de plantio. Em c) também uma comparação de uma planta doente com folhas distorcidas e afiladas (à esquerda) e uma planta sadia (à direita) com seu trifólio em desenvolvimento normal. Em d) o detalhe de uma vagem com sinal de necrose e em e) um conjunto de plantas com vagens abortadas e necrosadas.
Fonte: a) e b) NETTO (56); c), d) e e) fotos de Maurício Meyer/Embrapa Soja.

Assim, é possível notar as preocupações relacionadas a essa doença de descoberta tão recente, e todos os desafios relacionados ao manejo do ainda desconhecido. E por estes motivos, este trabalho vem explorar o uso de uma técnica alternativa na agricultura e que possa auxiliar no diagnóstico e compreensão do desenvolvimento da doença, na busca por meios que possam prevenir, e até eliminar a doença do campo, definindo formas de manejo eficazes e sustentáveis.

3 REVISÃO TEÓRICA

O advento das fontes de laser de alta intensidade criou novas possibilidades de análises elementares da matéria em quaisquer dos seus estados físicos: sólido, líquido ou gás. A ideia é que, ao vaporizar e excitar um material que absorva energia, a partir de um pulso de laser, seja possível coletar as emissões espectrais resultantes da excitação, e inferir, a partir delas, a composição da amostra. É daí que vem a noção de LIBS e todas as possibilidades de exploração das propriedades que envolvem a técnica. (57)

O objetivo da técnica LIBS é criar um plasma opticamente fino que esteja em Equilíbrio Termodinâmico Local (LTE) e cuja composição elementar seja como a da amostra. Quando essas condições são satisfeitas, algumas relações conectam a intensidade das linhas espectrais observadas com a temperatura do plasma e ainda, a largura das linhas à densidade de elétrons e temperatura, gerando em última instância a concentração relativa dos elementos contidos no plasma. Tipicamente estas condições são satisfeitas de modo aproximado. (58)

A evolução do material ejetado pela superfície marca a origem de toda a informação LIBS, ou seja, aplicada potência suficiente, o processo de ionização é iniciado e um plasma em expansão é criado. Explorar e buscar as condições favoráveis desse plasma e, a partir daí obter a caracterização analítica quantitativa da amostra nos mais diversos meios é um dos principais desafios da técnica. (57) Para melhor compreender a formação e evolução do plasma, suas propriedades, e ainda o sinal LIBS coletado, as subseções a seguir trarão maiores informações, de maneira que possam auxiliar na compreensão do estudo e resultados obtidos.

3.1 Configuração de um sistema LIBS

LIBS é uma técnica relativamente simples do ponto de vista da instrumentação envolvida, e traz consigo inúmeras vantagens para aplicações agroambientais. Nela, um laser pulsado, de alta energia, é direcionado e focalizado na superfície da amostra que se deseja analisar. Parte da amostra é ablacionada, vaporizada, e assim é gerado um plasma a partir da interação laser-matéria (o que será explicado em mais detalhes posteriormente). Ao se resfriar e decair rapidamente, as espécies presentes no plasma emitem radiação, e esta é característica de cada um dos átomos, íons e moléculas ali presentes. Essa luz é coletada por um conjunto de lentes, e conduzida a um espectrômetro através de fibras ópticas. Este, tem por função difratar a luz

emitida pelos analitos, a qual é analisada pelo detector. Os sinais armazenados são então processados e podem ser visualizados por meio de um software dedicado. Assim, vantagens como rapidez de análise, relativa simplicidade para tal, não necessidade de, ou pouco preparo de amostra, possibilidade de portabilização do equipamento, o que permite análises in situ caso seja necessário, habilidade de análises nos três estados da matéria e avaliações multielementares simultâneas, tornam a técnica bastante atrativa. (59) A Figura 4 mostra os principais componentes ópticos e eletrônicos envolvidos na técnica.

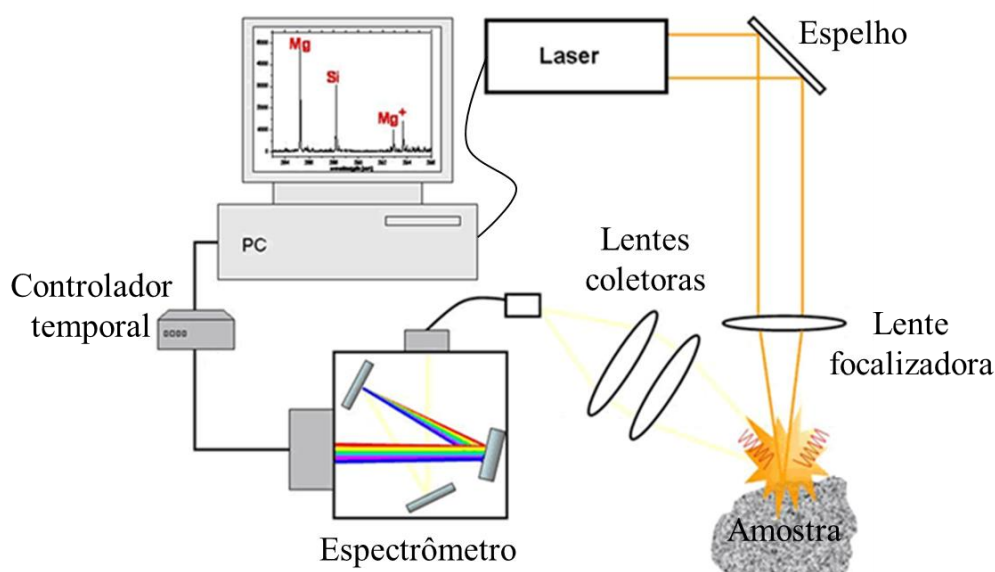


Figura 4 – Esquema de um aparato geral para medidas LIBS ilustrando os principais componentes da instrumentação.

Fonte: Adaptada de LASER-INDUCED... (60)

3.2 Ablação a laser, formação e evolução do plasma

O processo de ablação é regido por fenômenos não lineares, ocorre em diferentes ordens temporais de magnitude que vão desde a absorção eletrônica da energia óptica do laser (10^{-15} segundos) até a condensação das partículas após o término do pulso laser (10^{-3} segundos). Inicialmente, o que ocorre é a interação do laser com o material (e isso depende de fatores como características do laser de excitação e propriedades intrínsecas do material a ser avaliado), promovendo a absorção da luz pelo mesmo, e o que denominamos quebra, ou do inglês, como o próprio nome da técnica diz, *breakdown*. Esta, por sua vez se dá a partir da incidência do pulso de laser de alta energia (com irradiâncias mínimas da ordem de $10^8 - 10^{10}$ W/cm² para sólidos) na superfície da amostra, (58) que absorve a radiação em um curto

intervalo de tempo, da ordem de 10^{-13} s, fazendo com que a temperatura no foco do laser e superfície da amostra ultrapasse 10^4 Kelvins inicialmente.

Essa alta temperatura e o gradiente de campo elétrico ali formados promovem a quebra das ligações químicas do material, resultando na produção de íons e elétrons livres. Para isso, a absorção da luz pelo material, e consequente aquecimento do mesmo, se dá principalmente por dois fenômenos: o *Bremsstrahlung* inverso e a fotoionização, sendo um ou outro favorecido dependendo das condições do ambiente em que a medida acontece (se a pressão for alta, por exemplo, favorece o domínio do efeito do *Bremsstrahlung* inverso. Se a pressão é baixa, e a densidade é menor, favorece a ionização por multifóton). O primeiro deles é definido pela absorção de fótons provenientes do campo do laser pelos elétrons livres de maneira contínua durante o bombeio. Quando estes são acelerados no campo de Coulomb dos íons, emitem fótons – fenômeno conhecido como *Bremsstrahlung* – e, quando sob a ação de um campo externo, eles também passam a absorver fótons do laser - *Bremsstrahlung* inverso. O aquecimento acontece uma vez que, na média de tempo em que esses fenômenos ocorrem, as absorções excedem as emissões. (61) Este é um fenômeno cuja dependência com o comprimento de onda (λ) do laser vai com λ^3 , e é resultado de colisões e troca de momento elétron-íon no plasma que está sendo formado. O efeito de fotoionização, por sua vez, envolve a absorção de energia suficiente por átomos ou íons, que então perdem um, ou mais, elétrons. (59)

Dessa maneira, tanto para o fenômeno de *Bremsstrahlung* inverso quanto o de fotoionização, a energia dos elétrons aumenta, as colisões produzem novos íons e elétrons livres, que por sua vez acabam por absorver mais energia e gerar outros novos íons e elétrons livres, resultando no que denominamos efeito avalanche. (59) No caso deste trabalho foram empregados lasers de nano segundos, e como o tempo de absorção da energia pela amostra é menor do que a duração do pulso de laser, os efeitos térmicos (aquecimento e vaporização) acabam por dominar o processo. (62)

Após as quebras promovidas e formação do plasma, este se expande em todas as direções a partir do volume focal. No entanto, a taxa de expansão é maior em direção à lente de focalização, pois a energia óptica acaba entrando no plasma por esta direção. A taxa inicial de expansão do plasma é da ordem de 10^5 m/s, e o som que se ouve durante uma medida LIBS é causado pela onda de choque avançando a partir do plasma formado no volume focal. (59) Assim, considerando a formação do plasma em uma superfície plana, e ainda a expansão do feixe de laser de excitação e os processos de absorção mencionados, são definidas três zonas importantes de evolução do plasma: a frente de plasma (volume do plasma), a frente de

absorção e a frente de choque (Figura 5). Para diferentes regimes de irradiância, existem modelos diferentes de propagação e expansão do plasma, que serão brevemente mencionados a seguir, e basicamente diferem em suas previsões de opacidade e propriedades de transferência de energia do plasma para a atmosfera ambiente.

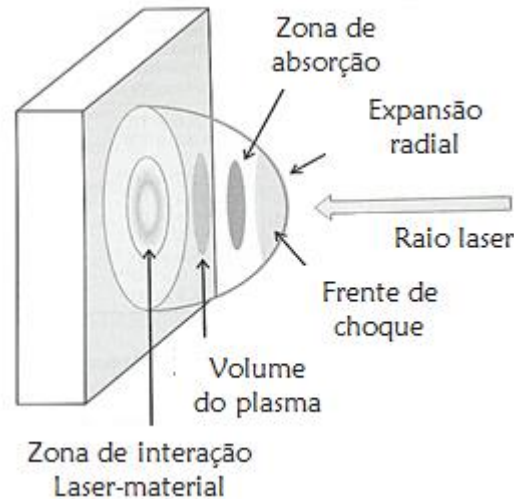


Figura 5 – Diagrama esquemático da evolução do plasma iniciado em uma superfície sólida plana.
Fonte: Adaptada de CREMERS; RADZIEMSKI. (58).

À baixas irradiâncias, a frente de choque precede à frente de absorção, que está acoplada à frente de plasma. Nesta configuração, tanto a energia da frente de choque depositada na atmosfera atrás dela quanto a radiação do plasma, são requeridos para mover a frente de absorção em direção ao feixe de laser, o que é denominado de onda de combustão suportada pelo laser. A irradiâncias maiores, a frente de choque é forte o suficiente para aquecer o gás atrás dela levando à absorção do feixe de laser. Assim, a zona de absorção surge logo atrás da frente de choque, e ambas estão à frente da frente de plasma, condição que chamamos de onda de detonação suportada pelo laser. Nas mais altas irradiâncias, a radiação do próprio plasma é suficiente para aquecer a atmosfera à sua frente ao ponto de se tornar uma zona de absorção, assim, esta fica, por sua vez, ligada à frente de plasma, em uma onda de radiação suportada pelo laser. (58,62) Assim, para os três casos mencionados, entre 10^{-9} s e 10^{-8} s, o plasma se torna opaco pela radiação do laser e, a parte final do mesmo acaba por interagir com a superfície do plasma (frente de absorção), e não ionizará mais material da amostra (já que não atinge mais a superfície da mesma). A este efeito denominamos blindagem do plasma e é fortemente dependente das condições ambientes (pressão atmosférica, gases ou vácuo) e experimentais (irradiância e comprimento de onda do laser de excitação). (62)

Para os experimentos LIBS aqui propostos, os dois primeiros modelos representam bem o que ocorre durante a evolução do plasma. Neste caso, o plasma possui temperatura e densidade não extremas, e condições de fronteira com a atmosfera, que são transmissíveis o suficiente para permitir a penetração e absorção da radiação advinda do laser. A utilização de um laser de nanossegundos permite a absorção da parte final do laser pelo plasma, reaquecendo-o, alongando seu tempo de vida. Isso pode refletir em um aumento das linhas de emissão, porém, ao mesmo tempo, as emissões de fundo também aumentam, o que pode diminuir a sensibilidade de sistemas desse tipo. (62) Uma forma de superar essa dificuldade é empregar dois pulsos de laser, um para ablacionar a amostra, e um segundo para reaquecer o plasma, e a esse método denominamos LIBS com pulso duplo (DP LIBS) sobre o qual comentaremos mais adiante, e que também foi empregado neste trabalho.

Após o fim do pulso de laser e conforme o plasma se expande e resfria, este perde energia por emissão de radiação (a que estamos interessados), devido à recombinação entre elétrons e íons, e até formação de moléculas devido à recombinações no plasma, e assim decai. (59) Quando o elétron absorve um fóton, ele atinge um estado de energia maior - processo que chamamos de excitação do átomo. Porém, elétrons tendem ao estado de menor energia possível. Dessa maneira, durante o processo de decaimento do átomo, os elétrons emitem um fóton. Os diferentes níveis de energia de cada tipo de átomo resultam em diferentes e bem definidos fótons de energia, com bandas de emissão estreitas, regidas pela quantização, e com incerteza definida pelo princípio de incerteza de Heisenberg. Devido a esta propriedade, é possível definir as espécies presentes no plasma, já que as emissões a que nos referimos, são exatamente aquelas que conseguimos observar no espectro LIBS, e seus níveis de energia associados são bem conhecidos para cada átomo.

O espectro resultante de uma medida LIBS, evolui rapidamente no tempo, (59) o que pode ser observado esquematicamente na Figura 6. Inicialmente, as emissões são predominantemente de uma luz branca, ao que denominamos contínuo, ou radiação de fundo. Esta é originada pela emissão de elétrons acelerados, o que ocorre devido ao efeito de *bremstrahlung*, em uma transição designada como livre – livre, já que se origina em partículas carregadas, e que permanecem livres tanto antes quanto após as interações. As transições do tipo livre – ligada, que ocorre devido às recombinações, também são responsáveis pelo contínuo, e acontecem quando um elétron livre é capturado por um íon, emitindo um fóton ao perder energia cinética. Para o plasma induzido por um laser de nanossegundos pulsado, a emissão no contínuo aparece durante o pulso laser e dura até algumas centenas de nanossegundos.

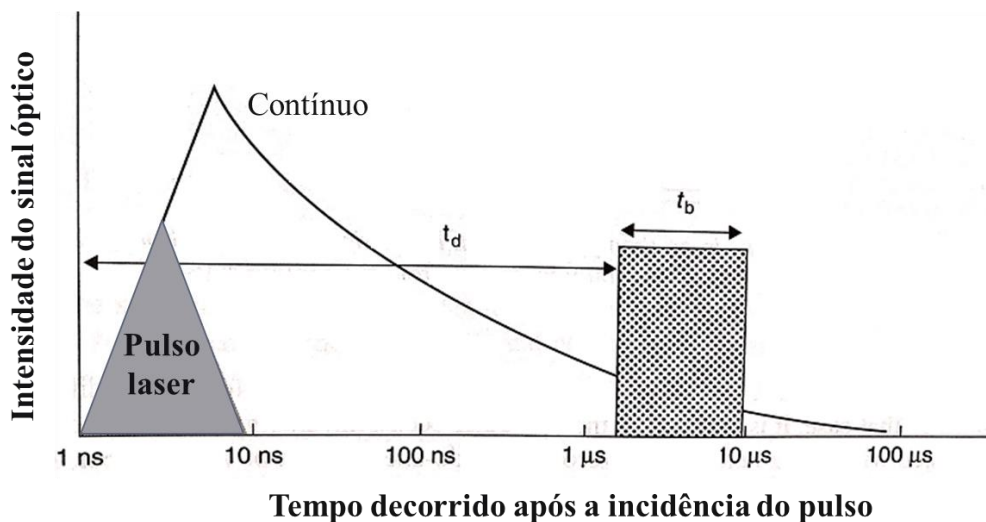


Figura 6 – Esquema temporal da evolução de um plasma induzido por laser. São mostrados ainda, o tempo de atraso para início das aquisições de emissão (t_d) e também a duração da aquisição, a que denominamos janela de aquisição (t_b).

Fonte: Adaptada de CREMERS; RADZIEMSKI. (58)

As emissões iônicas e atômicas prevalecem na escala temporal dos acontecimentos e não acontecem normalmente antes de 1 microssegundo ou mais durante a “história” do plasma, tempo durante o qual o sinal do contínuo diminui drasticamente. (59,63) Esse tipo de emissão tem origem nas transições entre estados ligados, em que há a perda de energia na forma de um fóton, que é característico da diferença de energia entre os dois níveis energéticos envolvidos. Assim, a frequência da linha espectral resultante da transição entre dois níveis de energia é dado pela equação $h\nu_{12} = E_2 - E_1$, em que h é a constante de Planck, ν a frequência, E_1 a energia do estado final e E_2 a energia do estado inicial. A este tipo de emissão chamamos de espontânea. A probabilidade de ocorrência dessa transição por segundo é dada pelo Coeficiente de Einstein para emissão espontânea, conhecido pelo símbolo A_{21} , e é uma propriedade intrínseca da transição. Assim, a espectroscopia envolve a interação da radiação eletromagnética com átomos e moléculas. (59)

Entendendo como os processos acontecem no tempo, fica clara a importância do controle temporal minucioso necessário em um sistema LIBS para que seja possível a visualização das linhas discretas à medida que o plasma expande e resfria, diminuindo bastante as emissões do contínuo. O tempo de atraso de captação do sinal de emissão após o disparo do pulso (t_d) e ablação da amostra, bem como o tamanho da janela de aquisição do sistema (t_b), devem ser otimizados de modo a captar intensamente o sinal das emissões que se deseja observar. (58,59)

Neste trabalho, parâmetros como estes foram avaliados para otimização do sinal LIBS a partir do sistema experimental disponível e do tipo de amostra a ser avaliada.

A intensidade e perfil das linhas de emissão dependem fortemente do ambiente em que o átomo está inserido, ou seja, das condições de excitação. Assim, se o meio é fino opticamente (o que ocorre a baixas concentrações do vapor, ou seja, a plasmas não muito densos, que diminuem as chances de ocorrência de reabsorção), tanto o alargamento natural da linha devido ao princípio da Incerteza de Heisenberg, quanto o alargamento das linhas devido ao Efeito Doppler (que tem perfil gaussiano e surge devido ao movimento dos átomos que estão emitindo os fótons, e cujo efeito é intensificado com aumento da temperatura) dominam o perfil de emissão. Para plasmas relativamente mais densos, os átomos são afetados pelo campo elétrico devido à presença dos íons e elétrons em movimento no mesmo, o que provoca um desdobramento nos níveis de energia dos átomos (em inglês, *splitting* e *shifting*). Como consequência destas perturbações dos níveis, as linhas de emissão são alargadas, alterando seu perfil e intensidade em um efeito conhecido como Stark (de perfil lorentziano). (62) Sabendo disso, é preciso ter o cuidado de levar em consideração o que está ocorrendo no plasma e os possíveis efeitos causados no perfil e intensidade das linhas de emissão a serem estudadas.

Para reconhecimento dos elementos presentes na amostra, ou seja, identificação das linhas de emissão e associação com os mais diversos elementos, a base de dados mais comumente utilizada é a base de dados do National Institute of Standard and Technology, o NIST. (64) Pode parecer simples, mas esta uma etapa do trabalho que demanda inúmeras tomadas de decisão acertadas, definição de parâmetros condizentes com as condições experimentais e, portanto, uma vasta experiência para análise. (65) Informações como o tipo de amostra e a possibilidade de existência de um determinado elemento na mesma, a existência de multipletos, a probabilidade de ocorrência da transição de forma espontânea dada pelo coeficiente de Einstein, e ainda a presença de linhas fortes e persistentes (linhas que são observáveis mesmo à baixas concentrações do elemento na amostra) no espectro, tanto para átomos neutros quanto para átomos ionizados, devem ser levadas em consideração no momento da determinação dos picos de emissão presentes no espectro LIBS.

3.3 LIBS com pulso duplo: um avanço da técnica

Nas últimas décadas o uso da técnica LIBS se tornou bastante atrativa em aplicações nas mais diversas áreas. Apesar do grande potencial, nos últimos anos é crescente e evidente a preocupação em melhorar e otimizar a performance analítica dessa espectroscopia, por

exemplo, diminuindo o limite de detecção (LOD, acrônimo do inglês Limit Of Detection) de alguns elementos e aumentando a intensidade do sinal de emissão das linhas. Ou seja, buscando aumentar a sensibilidade das medidas LIBS. Em um sistema LIBS de pulso único (SP LIBS) a melhoria do sinal pode ser alcançada através da escolha apropriada de parâmetros operacionais como, o comprimento de onda do laser de excitação, a duração do pulso e a energia do mesmo, o número de pulsos acumulados, a atmosfera em que estão sendo realizadas as medidas, o sistema de focalização do laser e o conjunto óptico responsável pela coleta do sinal, e claro, o controle temporal do sistema (tempo de atraso do espectrômetro para início das aquisições e a duração da janela de aquisição). (66–68) Entretanto, uma melhora de sinal pode ser obtida também por meio de novas características no sistema convencional através, por exemplo, do uso de um sistema de excitação ressonante, (69) ou do LIBS com pulso duplo, que chamaremos daqui por diante de DP LIBS. (70–74)

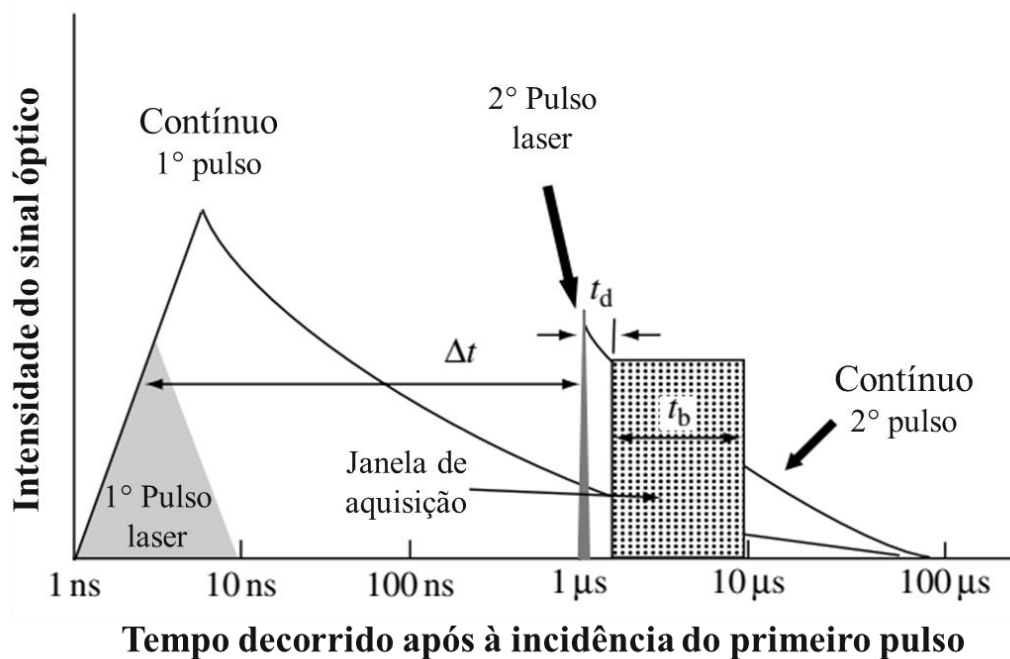


Figura 7 – Evolução temporal de um plasma gerado em uma medida DP LIBS. O tempo de atraso entre os pulsos está representado por Δt , o tempo de atraso para início das aquisições está indicado por t_d , e a duração das aquisições por t_b .

Fonte: Adaptada de CREMERS; RADZIEMSKI. (58)

No DP LIBS, dois pulsos de laser são utilizados para geração e excitação do plasma, e o tempo de atraso entre os dois pulsos (também conhecido por delay interpulse, do inglês) pode variar de nanossegundos a microssegundos. (72,75) A Figura 7 mostra a evolução temporal dos acontecimentos em um sistema desse tipo a fim de esclarecer melhor os parâmetros passíveis

de otimização, por exemplo. Além disso, a técnica pode ser aplicada em diferentes configurações geométricas, cada uma delas alterando o modo de interação do laser com o material. Piepmeier e Malmstadt, (50) e Scott e Strasheim, (51) sugeriram que, uma vez que grande parte da energia do primeiro pulso de laser é absorvida pelo material, o segundo pulso de laser levaria as espécies presentes no plasma a uma excitação adicional, melhorando a intensidade do sinal a ser adquirido.

O sistema operando no modo DP LIBS passa a dar uma maior possibilidade de variação de parâmetros quando comparada com o modo SP LIBS, como por exemplo, o uso de pulsos de laser de diferentes comprimentos de onda, diferentes energias e ainda tempos diferentes de atraso entre os pulsos. Além disso, também podemos citar a maior flexibilidade quanto à geometria do arranjo experimental, que pode operar basicamente em quatro configurações: colinear, feixes cruzados, ortogonal com reaquecimento e ortogonal com pré-ablação, representadas na Figura 8 a, b, c e d, respectivamente.

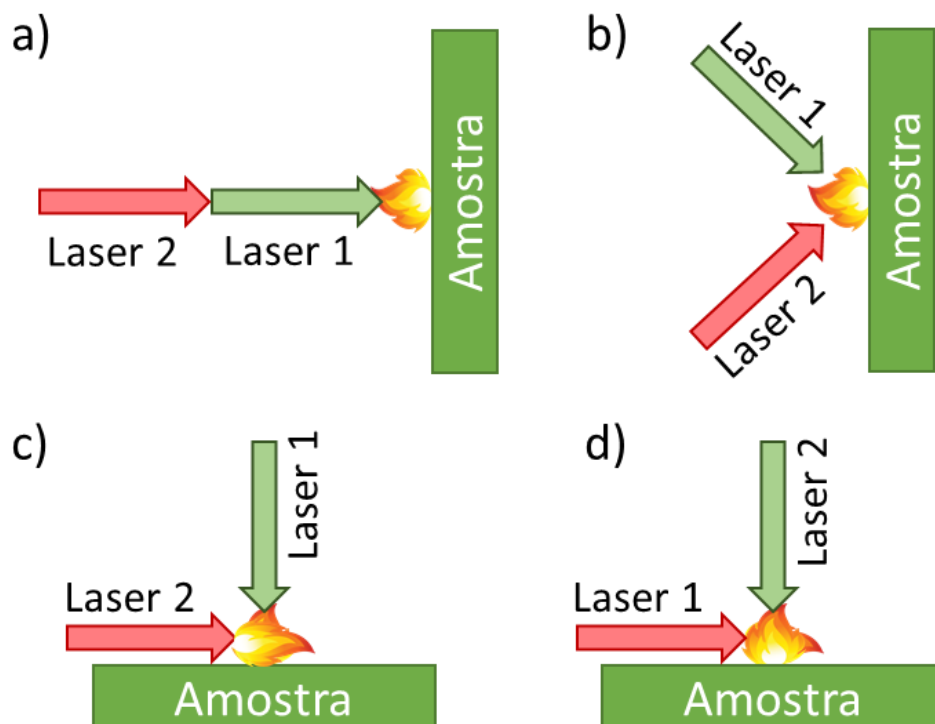


Figura 8 – Diferentes configurações geométricas possíveis para o modo DP LIBS: Colinear (a), Feixes cruzados (b), Ortogonal com reaquecimento (c) e Ortogonal com pré-ablação (d).

Fonte: Adaptada de RASHID et al. (76)

A configuração colinear (75-76) é relativamente simples, e com a qual ocorreram os primeiros experimentos de DP LIBS, tanto usando apenas um laser para gerar os dois pulsos,

quanto empregando dois lasers diferentes. Nessa geometria ambos os feixes de laser propagam e atingem a amostra no mesmo eixo, ortogonal à superfície da amostra. E apesar da simplicidade da configuração, o modelo de interação do segundo pulso de laser com a amostra e com o plasma gerado pelo primeiro laser, não é simples. Do ponto de vista do fenômeno, essa configuração é caracterizada pela grande quantidade de massa ablacionada quando comparada com o SP LIBS, já que ambos os lasers podem interagir e remover material da superfície da amostra. (57)

Quando o DP LIBS opera na configuração de feixes cruzados os pulsos de laser atingem a amostra fazendo um certo ângulo entre eles. (79) No caso da configuração ortogonal existe um laser que incide perpendicular à superfície da amostra, e um pulso de laser que incide paralelo à superfície da amostra. Quando o feixe que incide primeiro é o perpendicular à superfície da amostra, chamamos de ortogonal com reaquecimento, (80) já que o segundo pulso reaquece o plasma produzido pelo primeiro. Quando acontece o inverso, ou seja, o primeiro pulso incide paralelo à amostra, chamamos de ortogonal com pré-ablação, (81) pois se diz que, o primeiro pulso promove quebras eletrônicas no ar promovendo um plasma e não interagindo diretamente com a amostra, enquanto o segundo pulso, ortogonal à superfície da amostra, é ali focado para ablação.

Neste trabalho, basicamente duas configurações serão avaliadas, a colinear (75-76), e também a ortogonal com reaquecimento. (57) Além disso, foram otimizados os parâmetros essenciais para as medidas LIBS no modo SP e DP permitidos pelo sistema para as duas configurações citadas e considerando o tipo de matriz, ou seja, amostras de folhas de soja pastilhadas.

3.4 Características dos plasmas induzidos por laser: das amostras às análises quantitativas

Plasmas induzidos por laser apresentam emissões discretas que consistem de linhas espectrais atômicas e iônicas, características das espécies constituintes do plasma formado, e que estão sobrepostas a uma radiação de fundo de banda larga, resultado da recombinação de elétrons livres e de interações do tipo livre-livre, tratadas na seção anterior. A partir da identificação das linhas espectrais e da medida de suas intensidades é possível obter informações qualitativas, semiquantitativas e quantitativas. (82) As análises qualitativas dizem respeito basicamente sobre a caracterização elementar da amostra. Ao realizar uma avaliação semiquantitativa é possível comparar informações de uma amostra em relação a outra, ou o

comportamento de um elemento em relação a outro, e informar quais as variações encontradas, baseadas no fato de que a intensidade das linhas de emissão é proporcional à concentração do elemento na amostra. Sabendo dessa propriedade, é possível ainda avaliar quantitativamente os dados LIBS. No entanto, a avaliação quantitativa de dados LIBS não é uma tarefa simples. Apesar de proporcional, a intensidade das linhas de emissão no plasma não é determinada apenas pela concentração do elemento na amostra, mas também pelas propriedades do próprio plasma. Este, por sua vez, possui propriedades que dependem de fatores como as características da fonte de excitação (energia, comprimento de onda), a própria amostra (compactação, granulometria, cor, entre outros) e o gás ambiente (atmosfera controlada, ambiente ou vácuo). (82) Além disso, o processo de ablação a laser, como também vimos anteriormente, influencia a quantidade e composição da massa ablacionada, já que envolve fenômenos como o processo de vaporização, formação da onda de choque; duração, formação e expansão do plasma, entre outros, que dependem basicamente da duração do pulso. Assim, tal processo deve ser compreendido a fim de se alcançar avaliações quantitativas acuradas e sensíveis. (82-83)

Tognoni e colaboradores, (82) propuseram uma abordagem simplificada e interessante de como apreciar a complexidade dos fenômenos envolvidos em uma medida LIBS a partir de uma derivação simples da dependência do sinal obtido, considerando os vários processos que levam da amostra ao sinal, a partir dos fótons emitidos pelos átomos e íons excitados no volume do plasma. Segundo os autores, os parâmetros fundamentais que governam o processo podem ser explicitamente fatorados. Assim, o sinal S devido à emissão de uma determinada linha atômica ou iônica de um elemento (cuja unidade é apresentada em contagens), é dado pelo produto da densidade da população no estado excitado - n_u (cm^{-3}), da probabilidade de transição espontânea da transição escolhida - A_{ul} (fótons s^{-1}), e de uma função de detecção - f_{det} (cm^3 contagens fótons $^{-1}$ s).

A função de detecção pode, por sua vez, ser definida como o produto do volume ocupado pelos emissores visto pelo detector - V_{exc} (cm^3), de uma eficiência de detecção de maneira geral (que inclui parâmetros como o ganho do detector (contagem fóton $^{-1}$) e tempo de integração (s)) - η_{det} (contagem fótons $^{-1}$ s) e, de uma função de calibração - f_{cal} (sem unidade), que descreve as características do plasma em termos, por exemplo, da probabilidade de ocorrência de efeitos como auto absorção. (82) Assim,

$$S = n_u A_{ul} f_{det} = n_u A_{ul} V_{exc} f_{cal} \eta_{det} \quad (1)$$

Seguindo a abordagem proposta por Tognoni e colaboradores, (82) o número total de espécies emisoras ($\equiv n_u V_{exc}$) deve estar relacionado com o número total de átomos (ou íons) gerados pelo laser e que estão presentes no volume do plasma - $(N_T)_g$, multiplicados por uma função de excitação/ionização - f_{exc} (sem unidade) que fornece portanto, a probabilidade de ocupação deste nível excitado em detrimento dos demais. Por sua vez, o número total de átomos (ou íons) no volume ocupado pelos emissores deve estar relacionado ao número total de átomos na amostra - $(N_T)_s$, a partir de uma função de ablação/vaporização - f_{abl} , que descreve o mecanismo com o qual uma certa fração do material sólido é ablacionada e levada à condição de vapor na pluma do plasma. (82) Então,

$$S = (N_T)_g f_{exc} A_{ul} f_{cal} \eta_{det} = (N_T)_s f_{abl} f_{exc} A_{ul} f_{cal} \eta_{det} \quad (2)$$

Por fim, o fator $(N_T)_s f_{abl}$ também pode ser fatorado e relacionar a massa ablacionada, a fração do peso do elemento na amostra e um fator estequiométrico definido pelo desvio da composição elementar da amostra na pluma do plasma (gás) quando comparado com a fase sólida. Com isso, podemos concluir de forma bastante simplificada que, de modo geral, o sinal é influenciado por três funções inter-relacionadas que descrevem:

- i. a interação inicial entre a amostra e o laser levando à ablação/vaporização do material, f_{int} ,
- ii. o mecanismo de excitação/ionização que leva às emissões atômicas (ou iônicas), f_{exc} ,
- iii. e a caracterização do ambiente que emite radiação, relacionado a plasmas opticamente finos ou não, f_{det} . (82)

Em símbolos:

$$S = A_{ul} f_{int} f_{exc} f_{det}. \quad (3)$$

Na sequência, abordaremos as funções que influenciam o sinal separadamente, como proposto por Tognoni e colaboradores, (82) de modo que seja possível dimensionar a importância de todos os parâmetros considerados durante o desenvolvimento deste trabalho para obtenção de uma análise quantitativa acurada.

3.4.1 Função de interação: absorção de energia e ablação estequiométrica

A maioria dos métodos e trabalhos desenvolvidos para análises quantitativas com LIBS assumem, implícita ou explicitamente, que:

- a. A composição do plasma observado é representativa da composição da amostra (ou seja, a ablação ocorre de forma estequiométrica);
- b. O plasma é opticamente fino para as transições observadas; e
- c. O plasma observado encontra-se em LTE. (82)

Essa abordagem é feita na tentativa de simplificar alguns fenômenos extremamente complexos. O método livre de calibração, com o qual avançaremos nas avaliações quantitativas neste trabalho e sobre o qual abordaremos mais adiante, também faz as mesmas suposições citadas, as quais são importantes para o sucesso da técnica LIBS.

Sabendo que a ablação estequiométrica é a base das análises LIBS, inúmeros trabalhos vêm sendo conduzidos no sentido de melhor compreender essa condição. (82) Russo e colaboradores, avaliaram que para baixas potências fornecidas para geração do plasma em uma medida LIBS, a interação laser-matéria se dá por vaporização, ou seja, a energia é absorvida e rapidamente convertida em calor. Enquanto que, para densidades de potências altas o suficiente, tal interação se dá pelo processo que denominamos de ablação, que causa uma explosão na superfície, e tem comportamento estequiométrico. (83-84) Chan e Russo (84) conseguiram definir esse limiar, que é comumente atingido nos sistemas LIBS, e demonstraram que a ablação a laser é estequiométrica quando a densidade de potência ultrapassa 10^9 W/cm².

Outro fator que é necessário observar para garantir a ablação estequiométrica é a profundidade da cratera gerada pelos tiros. Se o acúmulo de pulsos dados no mesmo lugar for grande, gerando uma cratera profunda o suficiente, é possível que se saia da condição. Borisov e colaboradores (85) concluíram que se a razão profundidade/diâmetro for superior a 6, a composição do material ablacionado divergia da estequiométrica, o que deve ter ocorrido, segundo os autores, por dois motivos: a densidade de potência que atinge o fundo da cratera não é suficiente, ou efeitos térmicos e de blindagem podem ser gerados no interior da mesma, prejudicando a aquisição do sinal.

Além dos fatores mencionados, é importante notar que, devido ao fato de que a técnica LIBS analisa apenas uma pequena quantidade de material, a acurácia e precisão das medidas são extremamente dependentes da homogeneidade da amostra. Assim, para garantir medidas representativas, cuidados com a homogeneidade e um número maior de medidas de uma mesma amostra, devem ser tomados.

3.4.2 Função de excitação/ionização: o comportamento das emissões das espécies e descrição do plasma pela temperatura e densidade de elétrons

A função f_{exc} descreve o mecanismo de excitação/ionização que leva às emissões do plasma. Retomando as suposições apresentadas anteriormente para análises LIBS quantitativas (itens a, b e c), é importante entender cada um dos conceitos, e como eles estão relacionados à abordagem de cada uma das funções inter-relacionadas que influenciam o sinal LIBS. Assim, a seguir serão introduzidos os conceitos de plasma opticamente fino e LTE, necessários para determinação da temperatura e densidade de elétrons que descrevem o plasma LIBS, e cujos cálculos serão expostos na sequência.

Conceito de plasma opticamente fino

Fundamentalmente, um plasma é considerado opticamente fino quando a radiação emitida por ele atravessa e escapa do próprio plasma sem absorção ou espalhamento significativo. Uma maneira de verificar se o plasma está nessa condição é observar linhas de emissão fortes e cujas intensidades relativas são bem conhecidas. Quando os processos de reabsorção se tornam notáveis, as intensidades observadas partem dos valores esperados, saturando as linhas fortes. Começando pelas linhas mais intensas, elas apresentam um perfil reto, ao qual chamamos usualmente de *flat* (do inglês), evidenciando a ocorrência de auto absorção. Em casos mais extremos, a linha pode apresentar um afundamento na frequência central, e quando isso ocorre, diz-se que a linha é auto reversível ou invertível. (58) Assim, a auto absorção é também um problema na conversão das intensidades em concentrações, e é preciso cuidado, tanto na escolha das linhas, quanto na escolha dos parâmetros de aquisição das medidas LIBS para que se trabalhe sempre em condições próximas às ideais de plasma opticamente fino.

Conceito de Equilíbrio Termodinâmico Local em plasmas induzidos por laser

Devido à natureza das partículas que compõem o plasma, espera-se que as energias cinética, de excitação, de ionização e radiativas contribuam para a descrição do sistema e que as distribuições de cada uma das energias mencionadas sejam descritas pelas funções de Maxwell, Boltzmann, Saha e Planck, respectivamente. Por sua vez, o equilíbrio relativo à distribuição de energia sobre os diferentes estados do conjunto de partículas é determinado pela temperatura,

definida para cada uma das distintas formas de energia. O equilíbrio termodinâmico é dito alcançado quando, todas as formas de distribuição de energia são descritas pela mesma temperatura. (82) Porém, em plasmas induzidos por laser há perda de energia na forma de radiação, afetando o balanceamento energético entre elétrons, átomos e íons. (58) Assim, na prática, essa é uma condição que não existe completamente em plasmas LIBS, e é por isso que algumas aproximações precisam ser adotadas para que se possa descrever o estado do mesmo.

A radiação é a forma de energia que mais se diferencia das demais já que ela requer um plasma opticamente espesso para ocorrer. Contudo, plasmas LIBS típicos podem ser descritos pela condição a que denominamos de Equilíbrio Termodinâmico Local. Nesse estado, o processo que envolve as colisões é mais importante do que o radiativo, de modo que o não equilíbrio da energia de radiação pode ser negligenciado, enquanto que, localmente do interior do plasma, ainda é possível encontrar um parâmetro de temperatura que satisfaça as distribuições de Boltzmann, Saha e Maxwell. Assim, a temperatura de excitação do plasma (T) e a densidade de elétrons (n_e), que derivam dos dados de emissão do mesmo, podem ser usados para descrever as características do plasma. (58,82,86)

Sob a condição de LTE, a população dos níveis excitados para cada espécie segue a distribuição de Boltzmann, que é dada por:

$$N_{k_s} = \frac{N_{0_s} g_k}{Z_s(T)} e^{-(E_k/K_B T)} \quad (4)$$

Em que, N_{k_s} corresponde à densidade de população dos emissores para uma determinada espécie s no nível excitado k , N_{0_s} corresponde à densidade total de população da espécie s presente no plasma, g_k é a degenerescência do nível k , E_k é a energia do nível superior, K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura de excitação do plasma, e $Z_s(T)$ é a função de partição da espécie emissora à temperatura do plasma.

A condição na qual os estados atômico e iônico devem ser ocupados e desocupados predominantemente por colisões eletrônicas ao invés de radiação, requerem uma densidade eletrônica que seja suficiente para assegurar uma alta taxa de colisões. (82) Assim, o limite inferior da densidade de elétrons é dado, em cm^{-3} , pelo Critério de McWhirter (87):

$$N_e(\text{cm}^{-3}) > 1,6 \cdot 10^{12} T^{1/2} (\Delta E_{nm})^3 \quad (5)$$

Em que, N_e corresponde à densidade de elétrons, T é a temperatura do plasma em Kelvin (K), e ΔE_{nm} é a maior diferença de energia entre os níveis n e m , expressa em elétron-volt (eV), para a qual a condição se aplica. (86) Entretanto, este é um critério necessário, mas insuficiente para assegurar LTE, e é totalmente cumprido nos estágios iniciais do tempo de vida do plasma.

Griem (88) sugeriu em 1997 que, para o caso do hidrogênio, o mais complicado dos átomos neutros, já que envolve uma diferença de energia (ΔE_{nm}) muito alta, para uma temperatura de mais ou menos 1 eV e densidade de elétrons da ordem de 10^{17} cm^{-3} já se poderia garantir LTE. A grande maioria dos trabalhos que empregam LIBS para análises quantitativas ou semiquantitativas apenas assume a condição de existência de LTE devido às condições em que o plasma LIBS é gerado. (86) Neste trabalho, o critério de McWhirter foi empregado para verificar possibilidade de existência da condição de LTE, já que é um dos métodos mais bem aceitos, e a partir deste teste, assumida ou não a condição para o plasma em questão. Além disso, em 2010, Cristoforetti e colaboradores discutiram o fato de que o critério de LTE pode funcionar para determinados elementos e outros não. (86) Assim, esta é uma verificação que deve ser feita para os elementos de interesse já que está ligada à diferença de energia da transição.

Portanto, plasmas em LTE podem ser caracterizados por uma única temperatura que descreve a distribuição das espécies nos níveis de energia, a população nos estágios de ionização ou a energia cinética dos elétrons e partículas pesadas. Conseqüentemente, a temperatura de excitação que controla a população dos níveis atômicos (e iônicos) deve ser a mesma que a temperatura de ionização, que determina a distribuição dos átomos de um mesmo elemento nos diferentes estágios de ionização. (82)

Cálculo da temperatura do plasma

Considerando que a hipótese de LTE seja cumprida totalmente, a temperatura do plasma pode ser calculada a partir da intensidade total da linha de emissão de um determinado elemento. A integral da intensidade da linha de emissão correspondente à transição entre dois níveis E_k (nível superior - inicial) e E_i (nível inferior - final) de uma espécie de um elemento atômico S pode ser expressa como na equação (6). Entende-se por espécie o estado de ionização de um determinado elemento atômico. Por exemplo, Mg I e Mg II são duas espécies distintas do mesmo elemento atômico e serão aqui representadas por S (espécie atômica) e S^+ (espécie uma vez ionizada). A representação da intensidade pode ser expressa por:

$$I_{\lambda}^{ki} = \frac{h\nu_{ki}}{4\pi} N_{k_s} G A_{ki} = \frac{hc}{4\pi\lambda} N_{k_s} G A_{ki} \quad (\text{fótons } s^{-1} \text{ cm}^{-3}) \quad (6)$$

Em que, h é a constante de Planck, ν_{ki} é a frequência de emissão da transição k-i, c é a velocidade da luz, λ é o comprimento de onda referente à transição, N_{k_s} corresponde à população dos emissores para uma determinada espécie no nível superior, G é um fator experimental (que considera parâmetros como o ângulo sólido da observação, a eficiência da óptica utilizada, e ainda a própria densidade e volume do plasma), e A_{ki} se refere a probabilidade de transição da linha (coeficiente de Einstein de emissão espontânea). Na aproximação da condição de LTE e de plasma opticamente fino, N_{k_s} respeita a distribuição de Boltzmann:

$$N_{k_s} = \frac{N_{0_s} g_k}{Z_s(T)} e^{-(E_k/K_B T)} \quad (7)$$

Assim:

$$I = \frac{I_{\lambda}^{ki}}{\lambda} = \frac{N_{0_s} G hc A_{ki} g_k}{4\pi\lambda Z_s(T)} e^{-(E_k/K_B T)} \quad (8)$$

Em que, N_{0_s} corresponde à densidade de população dos emissores total no nível excitado, g_k é a degenerescência do nível k, E_k é a energia do nível superior, K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura de excitação do plasma, e $Z_s(T)$ é a função de partição da espécie emissora à temperatura do plasma. (58,82)

A intensidade da linha de emissão espectral é uma medida da população do seu correspondente nível de energia de uma certa espécie no plasma. Como mencionado, respeitadas as condições de LTE e plasma opticamente fino, se houver informação quanto às intensidades de diversos níveis de excitação, é possível determinar a temperatura responsável por aquela distribuição de população. Reorganizando a equação, tem-se:

$$\ln\left(\frac{4\pi\lambda}{A_{ki} g_k hc} I\right) = -\frac{E_k}{K_B T} + \ln\left(\frac{N_{0_s} G}{Z_s(T)}\right) \quad (9)$$

A linearização da equação acima resulta, por fim, no que denominamos gráfico de Boltzmann.

Definindo $y = \frac{4\pi\lambda}{A_{ki} g_k hc} I$; $x = E_k$; $m = -\frac{1}{K_B T}$, este gráfico pode ser construído a partir de duas ou mais transições presentes no espectro LIBS, de uma mesma espécie de um mesmo elemento. Assim, é possível dispor no gráfico o lado esquerdo da equação (9) contra E_k . Na sequência, a partir do coeficiente angular (m) obtido pela regressão linear dos dados, é calculado o valor da temperatura que estamos interessados. (89) O uso de diversas linhas de emissão, ao invés de apenas duas ou três, para a consolidação da reta pode aumentar a precisão na determinação da temperatura. É importante considerar também que os valores de probabilidade de ocorrência da transição na literatura, que fazem parte da equação de Boltzmann, apresentam graus de incerteza bastante significativos (de até 50% segundo a base de dados do NIST (64)). Estes, por sua vez, também podem ser amenizados a partir do uso de diversas linhas de emissão. (82)

Quando possível, o uso de diferentes elementos para obtenção dos desvios na temperatura calculada também pode ser um recurso usado para melhorar a confiança nos valores de temperatura obtidos. Sabendo que a temperatura deve ser a mesma para o plasma como um todo, ou seja, todos os elementos e espécies estão na mesma temperatura quando em LTE, ao calcular a temperatura através da equação de Boltzmann a partir de dois elementos diferentes, teoricamente esses valores deveriam ser próximos. Assim, a partir das diferenças entre um valor de temperatura e outro, é possível um refinamento dos valores calculados para o plasma. É claro que isso só é possível se, no espectro LIBS é encontrado mais de um elemento, com linhas de emissão de uma mesma espécie, em número suficiente para que se possa aplicar Boltzmann. No caso deste trabalho, apenas o Ca apresentou linhas atômicas em número suficiente para o cálculo da temperatura.

Como linhas de emissão de diferentes estágios de ionização estão, usualmente, presentes no espectro LIBS, a combinação das distribuições de Saha para estados ionizados e de Boltzmann para estados atômicos também pode ser usada para se obter a temperatura do plasma. (82) Para isso, a forma mais comum de associação de ambas é dada pela razão da intensidade das emissões iônica e atômica. Assim,

$$\frac{I_{S^+}}{I_S} = \frac{\lambda_S}{\lambda_{S^+}} \frac{g_k^{S^+}}{g_k^S} \frac{A_{ki}^{S^+}}{A_{ki}^S} \frac{1}{N_e} \left(\frac{2(2\pi m_e K_B T)^{3/2}}{h^3} \right) \exp\left(\frac{E_S - E_{S^+} - \chi_S}{K_B T}\right) \quad (10)$$

Em que S e S^+ se referem a duas espécies consecutivas de um mesmo elemento (átomo e íon) como visto anteriormente, χ_S é a energia de ionização do elemento atômico, m_e é a massa

do elétron, e os demais parâmetros já foram apresentados. Neste caso, o fator de redução da energia de ionização devido a interações no plasma foi omitido por ser considerado negligenciável. Esta é uma equação que também pode ser linearizada para obtenção da temperatura. (82) Apresentado um grau de dificuldade ligeiramente maior do que o exigido para o cálculo da temperatura pela equação de Boltzmann, esta não é a equação mais comumente empregada para este fim. Através dela é possível obter uma quantidade bem maior de pontos (permitida pela combinação de linhas de emissão atômicas e iônicas de um mesmo elemento) para a construção do gráfico que resultará nos coeficientes da regressão linear, a partir dos quais é calculada a temperatura do plasma. Como neste trabalho empregamos o método de Boltzmann para determinação da temperatura, não entraremos em maiores detalhes na linearização da equação de equilíbrio de Saha-Boltzmann, que segue basicamente a mesma linha, e foi empregada para determinação da densidade de elétrons, que será vista na seção a seguir.

Cálculo da densidade de elétrons

Para a medida da densidade de elétrons (N_e) no plasma existem métodos diferentes. (82) Neste trabalho abordaremos dois deles, sendo o primeiro aquele que requer a medida de alargamento da linha de emissão devido ao efeito Stark, e o segundo o que requer o cálculo da razão da população de dois estados de ionização consecutivos do mesmo elemento.

O método baseado no efeito Stark considera o alargamento da linha, medida pela largura à meia altura, como resultado do campo elétrico gerado pelos elétrons, sendo este o perturbador dos níveis de energia dos íons, e conseqüentemente, alargamento das linhas de emissão a partir de tais níveis excitados. (90) O alargamento Stark de uma linha específica pode, então, ser utilizado para estimar a densidade de elétrons presente no plasma formado. (58) Para isso, valores teóricos e experimentais são relacionados da seguinte maneira:

$$N_e^{Experimental} = \frac{W^{Experimental} N_e^{Teórico}}{W^{Teórico}} \quad (11)$$

E a partir da equação anterior, é determinada a densidade de elétrons experimental. (90)

O segundo método mencionado para determinação da densidade eletrônica se dá através da relação de Saha-Boltzmann. Assim:

$$N_e = \frac{I_S}{I_{S^+}} \frac{\lambda_S}{\lambda_{S^+}} \frac{g_k^{S^+}}{g_k^S} \frac{A_{ki}^{S^+}}{A_{ki}^S} \frac{2(2\pi m_e K_B T)^{3/2}}{h^3} \exp\left(\frac{E_S - E_{S^+} - \chi_S}{K_B T}\right) \quad (cm^{-3}) \quad (12)$$

Durante o desenvolvimento dessa tese de doutorado ambos os métodos para determinação da densidade de elétrons foram avaliados, e após análise de consistência dos dados, se optou por trabalhar apenas com o método de Saha-Boltzmann. Dessa maneira, os resultados referentes ao cálculo através do efeito de alargamento Stark não serão mostrados.

3.4.3 Função de detecção: uma dependência da eficiência da instrumentação

Cada sistema experimental apresenta resposta espectral única. A óptica usada para coleta, lentes e fibras ópticas, a grade do espectrômetro, o sensor do detector, todos os componentes possuem uma determinada eficiência dependente do comprimento de onda. Dessa maneira, os espectros obtidos a partir de uma medida LIBS consideram tanto os dados físicos quanto a própria resposta do sistema. Para algumas situações, como por exemplo a abordagem do método CF, é importante considerar essa sensibilidade da instrumentação. (82) Como neste trabalho a instrumentação foi a mesma do início ao fim da medição do conjunto, esse fator acabou sendo padrão nos cálculos e por fim, foi possível eliminar essa variável do problema.

3.5 LIBS quantitativo

Diversos métodos de calibração vêm sendo explorados ao longo dos anos com o crescimento e constante avanço em relação à técnica LIBS. (82,91) No entanto, este ainda é um grande desafio, e pode ser considerado o “calcanhar de Aquilles” da técnica devido à complexidade das interações laser-amostra e plasma-partículas envolvidas, assim como referido por Hahn e Omenetto (2010). (92) Alguns métodos vêm sendo estudados, incluindo análises univariadas, análises multivariadas e o método CF, na tentativa de melhorar a reprodutibilidade e acurácia, e eliminar os efeitos de matriz, na aplicação da técnica LIBS como método quantitativo. Os efeitos de matriz podem estar relacionados com as propriedades químicas, em que a emissão de um elemento pode ser afetada pela presença de outro, e físicas da amostra, como o tamanho das partículas e textura da superfície a ser ablada, que interferem, dentre outros fatores, na quantidade de massa ablacionada. (62) Assim, estes fatores precisam ser

considerados, dependendo do método que será empregado na tentativa de quantificação dos analitos por LIBS.

3.5.1 Curvas de calibração: Análises univariadas e multivariadas

As curvas de calibração são conhecidas como tradicionais dentre os métodos de quantificação. Estas estabelecem curvas que relacionam o sinal detectado com a concentração do elemento a ser medido. Para construção de uma curva e eliminação de efeitos de matriz, a utilização de materiais de referência certificados (CRM, acrônimo do inglês Certified Reference Material) que tenham matrizes compatíveis, é indicada. Entretanto, vale considerar que, para aplicações agroambientais, como no caso deste trabalho, a existência ou até mesmo obtenção deste tipo de material, é de grande dificuldade e alto valor agregado. (93) O uso de padrões sintéticos baseados na composição da matriz principal pode ser considerado uma saída nesse sentido, se existirem. É possível ainda, a construção de curva de calibração a partir de um conjunto de amostras que foram analisadas (e tiveram o elemento de interesse quantificado) por um método de referência validado. Assim, a construção de curvas de calibração para quantificação com LIBS ainda são um grande desafio, e estão atreladas a algo laborioso e que demanda tempo, o que não temos em situações de campo, muitas vezes.

A partir de amostras quantificadas por técnica validada ou CRM de concentração conhecida e matriz compatível, é possível a associação de um único sinal às concentrações obtidas para uma calibração que chamamos de univariada. As análises multivariadas, ao contrário da análise univariada, permitem uma maior quantidade de dados e/ou sinais como informação para determinação da concentração de um determinado elemento. Tal fato pode ajudar a lidar, mas não solucionar completamente, os efeitos de matriz e flutuações entre uma medida e outra. (91) Realizar um grande número de medidas LIBS de uma mesma amostra pode amenizar, também, tais variações, além de considerar uma maior quantidade de amostra analisada, auxiliando na homogeneização.

Dessa maneira, o problema relacionado tanto às análises univariadas quanto às multivariadas está no fato de que é necessária a construção e validação de modelos para cada elemento que se deseja quantificar, já que é necessário emprego de CRM, ou matrizes compatibilizadas, ou ainda medidas quantificadas a partir de técnica de referência validada.

3.5.2 Método livre de calibração (CF)

O método CF, proposto primeiramente por Ciucci e colaboradores em 1999, (94) para corrigir efeitos de matriz, trouxe também um novo método para análises quantitativas com LIBS. A filosofia por trás dessa abordagem parte da observação de que o plasma de emissão LIBS é bastante sensível às mudanças na matriz da amostra. A principal vantagem do método está em dispensar o emprego de qualquer padrão de matriz compatível ou material de referência, o que o torna absolutamente adequado para amostras desconhecidas. Tais características do método demonstram que é extremamente promissor para uso na agricultura, já que lida bem com a ausência de CRM e severos efeitos de matriz, problemas recorrentes com amostras do setor. (93) Além disso, o CF permite a análise multielementar simultânea, baseada nas características do plasma formado, e que engloba todos os elementos ali presentes, uma grande vantagem em relação aos métodos usuais que requerem a calibração para cada elemento.

Ciucci e colaboradores (94) trabalharam com a hipótese de que o espectro contém todo o necessário para deduzir a composição da matriz. Entretanto, como o plasma induzido por laser é extremamente complexo, sua definição não é alcançada apenas por meio de modelos matemáticos, sendo necessário, para a descrição de suas propriedades macroscópicas, uma série de condições a serem assumidas para simplificação. Assim, como já mencionado nas seções anteriores, para que o método tenha validade, é preciso considerar que:

- i. A composição do plasma é representativa da composição da amostra (ablação estequiométrica);
 - ii. O plasma se encontra em LTE ao menos na janela de observação temporal e espacial utilizada durante a medida (para que se possa aplicar as equações de Saha e Boltzmann);
 - iii. O plasma pode ser modelado como uma fonte espacialmente homogênea (se ele for considerado não homogêneo, pode haver temperaturas diferentes em diferentes volumes do plasma);
 - iv. As linhas espectrais envolvidas nos cálculos são opticamente finas (evitar, por exemplo, linhas originadas em transições que envolvam o nível fundamental).
- (58,95)

Estando em LTE, os estados excitados são ocupados segundo a distribuição de Boltzmann, e os estados ionizados segundo a equação de equilíbrio de Saha-Boltzmann. (94,96) Dessa maneira, é possível escrever que, para cada espécie presente no plasma, temos que o número de

emissores atômicos é dada, a partir das equações (6 (intensidade) e (7 (distribuição de Boltzmann)) já linearizadas anteriormente, por:

$$q_s = \ln \left(\frac{N_{0_s} G}{Z_s(T)} \right) \quad (13)$$

Ou seja, simplesmente determinada pelo coeficiente linear da reta dada pelo gráfico de Boltzmann, que chamamos de q_s . Ou ainda, podemos escrever, que para cada espécie S presente no plasma, temos:

$$N_{0_s} G = \overline{I}_\lambda^{ki} \frac{4\pi\lambda}{A_{ki} hc g_k} Z_s(T) \exp \left(\frac{E_k}{K_B T} \right) \quad (14)$$

Então, tendo sido determinada a temperatura de excitação do plasma a partir de um elemento com linhas abundantes no espectro, e sabendo que a própria temperatura, de acordo com a suposição de LTE, é a mesma para todas as espécies, é possível obter a concentração das espécies (vezes o fator experimental G) através da equação acima.

Em LIBS, a grande maioria dos elementos existirão na espécie neutra e uma vez ionizada. Ocasionalmente poderá aparecer alguma população no segundo estado de ionização. Se as linhas da espécie uma vez ionizada não aparecerem no espectro, mesmo assim esta deve ser considerada presente no plasma e calculada sua densidade para que se obtenha por fim, a concentração do elemento correspondente. (58) Nesse caso, a equação de Saha é empregada no cálculo do número de emissores iônicos ($N_{0_{s^+}}$) como segue:

$$N_{0_{s^+}} G = \frac{(2\pi m_e)^{3/2}}{h^3} \frac{N_{0_s} Z_{s^+}}{N_e Z_s} (K_B T)^{3/2} \exp \left(\frac{\chi_0}{K_B T} \right) \quad (15)$$

Ou seja, o número de emissores de um determinado elemento é dado através da soma dos emissores das espécies neutra e uma vez ionizada deste, (a menos do fator experimental G). (58,94) Assim:

$$N_{Total}^S = N_{0_s} + N_{0_{s^+}} \quad (16)$$

Uma vez que o número de emissores total foi calculado para todos os elementos, podemos dizer que a abundância relativa de um determinado analito S , ou seja, sua concentração na amostra relativa à presença de todos os demais elementos que a compõe, pode ser obtida através da seguinte equação:

$$C_S = \frac{N_{Total}^S \mu_S}{\sum_{S'} N_{Total}^{S'} \mu_{S'}} = \frac{(N_{0_S} + N_{0_{S^+}}) \mu_S}{\sum_{S'} N_{Total}^{S'} \mu_{S'}} \quad (17)$$

Em que μ_S é a massa atômica do elemento S , e a soma se estende sobre todos os elementos detectados S' . É importante mencionar que, durante o experimento, se faz fundamental cuidar para que os parâmetros experimentais se mantenham constantes (lentes, foco, energia do laser, etc.), para que então, o fator G também permaneça constante e possa anulado nesta etapa de determinação da razão. (97)

Não tendo certeza sobre ter detectado todos os elementos da amostra (o que é muito difícil ocorrer a menos que a amostra seja conhecida e controlada), ou sabendo, por exemplo, que possivelmente existam elementos não detectados por se encontrarem abaixo do limite de detecção da técnica, e havendo um padrão interno de concentração determinada, podemos então calcular a concentração de todos os demais elementos presentes na amostra através da razão dessas duas concentrações (método proposto por Wang et al.). (98) Assim:

$$\frac{C_S}{C_{Padrão}} = \frac{N_{Total}^S \mu_S}{\sum_{S'} N_{Total}^{S'} \mu_{S'}} \frac{\sum_{S'} N_{Total}^{S'} \mu_{S'}}{N_{Total}^{Padrão} \mu_{Padrão}} = \frac{N_{Total}^S \mu_S}{N_{Total}^{Padrão} \mu_{Padrão}} \quad (18)$$

Em que a soma se estende a todos os elementos presentes na amostra. E por fim, temos:

$$C_S = C_{Padrão} \frac{N_{Total}^S \mu_S}{N_{Total}^{Padrão} \mu_{Padrão}} \quad (19)$$

Em que o nome *Padrão* faz referência à concentração, densidade total e massa atômica, do elemento padrão interno previamente determinado ou adicionado. (97)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de soja

Para o estudo de otimização das medidas LIBS, bem como para o estudo de melhor forma de armazenamento das amostras, foram usadas folhas de soja sadias provenientes da Fazenda Canadá, localizada em São Carlos (cultivar BRS 7589, e cultivar BRS 7590, respectivamente).

Em relação ao conjunto principal, em que se desenvolveu os demais estudos, as amostras foram folhas saudáveis (amostras-controle) e doentes com HVRF (infestadas pelo nematoide *Aphelenchoides basseyi*), em fase sintomática, de plantas de soja provenientes do estado do Maranhão. Para simplicidade, daqui em diante as amostras doentes serão denominadas HVRF apenas.

No total, foram avaliados dois conjuntos de amostras que foram denominados de acordo com a fazenda de coleta e estão definidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Informações dos conjuntos de amostras de folhas de soja.

Conjunto	Amostras sadias	Amostras doentes	Cidade	Cultivar	Latitude	Longitude	Alt. (m)
Xingu II	35	36	Riachão /MA	M 9144 RR	7° 44' 24"	46° 27' 13"	419
Parnaíba	35	36	Balsas/ MA	TMG 1188 RR	8° 27' 26"	46° 06' 50"	548

Fonte: Dados fornecidos pelo pesquisador Dr. Maurício Meyer (Embrapa Soja).

4.2 Armazenamento, transporte e preparo de amostras

Inicialmente, foi feita uma avaliação para definir qual a melhor forma de armazenamento das amostras, uma vez que o conjunto principal de estudo viria do estado do Maranhão, conforme descritas acima. Para isso, folhas de soja recém coletadas, foram armazenadas, em isopor fechado e com placas de gelo, da seguinte maneira:

- Fora do saquinho plástico:
 - Trifólio da planta de soja conservado;
 - Trifólio da planta de soja não conservado – folhas desmembradas;
- Dentro do saquinho plástico transparente e fechado:
 - Trifólio da planta de soja conservado;
 - Trifólio da planta de soja não conservado – folhas desmembradas;
 - Apenas uma folha;

A Figura 9 traz imagens exemplificando o que seriam os trifólios íntegros e desmembrados.



Figura 9 - À esquerda temos um exemplo do que denominamos trifólio conservado, e à direita, o trifólio desmembrado.

Fonte: Acervo da autora.

E para cada uma das três variantes das amostras nos saquinhos plásticos, foram avaliadas as seguintes condições (cada uma das quais estão ilustradas na Figura 10):

- Saquinho sem ar (o ar foi retirado mecanicamente e o saquinho foi fechado com fita adesiva);
- Saquinho sem ar + aproximadamente 0,5 ml de água;
- Saquinho com ar (o ar foi adicionado ao saquinho com um sopro leve, método ensinado por funcionários da fazenda de coleta);
- Saquinho com ar + aproximadamente 0,5 ml de água;

Foram coletadas ainda folhas do meio da plantação, e folhas da borda (próximo às “ruas”) que, segundo informações fornecidas por funcionários da fazenda, algumas vezes estão um pouco mais machucadas e vulneráveis a doenças por estarem próximas à passagem de maquinários e pessoas. A idade das amostras coletadas foram as mesmas, para que variações desse tipo não influenciassem os testes.

Uma última variante avaliada foi a manutenção das folhas fora do saquinho plástico, apenas dentro do isopor refrigerado.



Figura 10 – Em a) saquinho sem ar e com água, em b) saquinho sem ar e sem água, em c) saquinho com ar e água e, em d) saquinho com ar e sem água.

Fonte: Acervo da autora.

Tendo definida a melhor forma de armazenamento e transporte das amostras que viriam do Maranhão, as instruções foram passadas para a equipe que coletaria as amostras. O protocolo de armazenagem foi respeitado e as amostras chegaram até São Carlos após 2 dias de traslado nas melhores condições possíveis. Tão logo trazidas ao laboratório, após a análise por outras técnicas, as amostras foram colocadas para secagem em estufa a 60 graus por 72 horas. Feito isso, as amostras foram armazenadas em dessecadores, e aos poucos foram moídas criogenicamente. A maceração foi realizada manualmente a partir de almofariz e pistilo. Na sequência as amostras foram peneiradas para melhor homogeneização de modo que todo conteúdo previamente macerado passou pela abertura da penira, mantendo granulometria máxima de 0,297 mm (peneiras de 50 mesh). Por fim, o pó homogeneizado foi prensado a 8 toneladas em um pastilhador, com área aproximada de $0,79 \text{ cm}^2$, por cerca de 1 minuto (Figura 11). O procedimento de pastilhamento foi feito com uma amostra por vez. Uma vez pronta, as

pastilhas, com diâmetro de 1 cm, foram armazenadas em sacos plásticos vedados, e mantidas em geladeira.

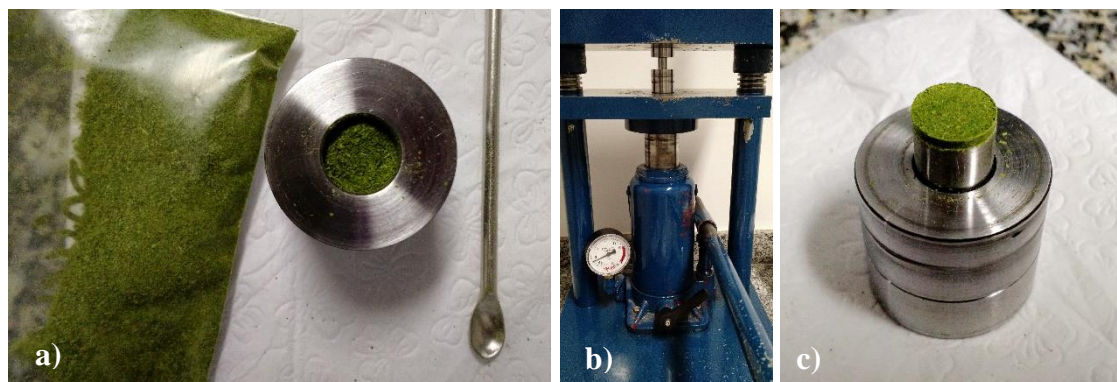


Figura 11 – Em a) é mostrada a folha de soja já triturada criogenicamente, pronta para ser prensada e dentro do porta-amostra (pastilhador). Em b) segue uma foto da prensa hidráulica usada para fornecer 8 toneladas de pressão para confecção da pastilha. E em c) a pastilha de folha de soja recém confeccionada.

Fonte: Acervo da autora.

4.3 Medidas LIBS: equipamentos e parâmetros utilizados

4.3.1 LIBS pulso único: sistema comercial Ocean Optics

As medidas LIBS com pulso único em amostras de soja foram realizadas, também, em um equipamento comercial, LIBS2500 spectrometer (Ocean Optics, Dunedin, USA) (Figura 12). O sistema possui um Q-switched laser de Nd: YAG (Quantel, Big Sky Laser Ultra50) que opera em 1064 nm, com 50 mJ de energia máxima, 8 ns de duração do pulso e 10 Hz de frequência. O sistema de detecção deste compreende sete espectrômetros, que resolvem a faixa espectral de 189 a 966 nm, com resolução óptica de 0,1 nm e uma CCD (charge-coupled device). A distância entre a amostra e a lente de coleta de emissão do plasma é de aproximadamente 7 mm. Condições otimizadas de aquisição (de acordo com o que o equipamento proporciona) foram aplicadas durante as medidas, e dessa maneira adotados os seguintes parâmetros: 1 ms de tempo de integração e 50 mJ de energia por pulso (fluência de 1200 J/cm²), um tiro de limpeza foi disparado a cada medida, e em seguida foi adquirida a média de três tiros para melhorar a relação sinal-ruído do espectro. Para cada amostra pastilhada foram feitas 30 medidas LIBS em diferentes posições da amostra, manualmente controlada por um sistema XY. O sistema operou em atmosfera ambiente e foram intercaladas medidas de amostras sadias e doentes para evitar qualquer influência operacional ou de flutuações do sistema.



Figura 12 – Sistema comercial LIBS da Ocean Optics. Em 1 temos a fonte de energia, em 2 o laser para excitação da amostra, em 3 a câmara de ablação e em 4 o conjunto de 7 mini espectrômetros.
Fonte: Acervo da autora.

4.3.1.1 Tratamento dos dados LIBS: sistema comercial Ocean Optics

Para as avaliações espectrais iniciais, foi verificada toda extensão do espectro (189 - 966 nm). Para isso, foi adotada uma normalização pela área abaixo da curva do espectro, referente a cada um dos intervalos dos espectrômetros separadamente, para que pudéssemos comparar os espectros entre si de forma igualitária, tentando eliminar influências relacionadas à formação de cada plasma (como por exemplo, flutuações do laser e efeitos eletrônicos). Tal normalização foi realizada de modo que, para cada um dos sete intervalos do espectro, definidos por cada um dos sete espectrômetros, foi calculada a área abaixo da curva, e os valores de intensidades presentes no respectivo intervalo foram divididos por tal valor de área. Após a normalização de cada espectro foi calculada a média por amostra.

Em seguida, a Análise de Componente Principais (PCA, acrônimo do inglês Principal Component Analysis) foi empregada para verificar a capacidade de clusterização das amostras sadias e HVRF a partir do perfil espectral todo fornecido pela medida LIBS. Sabendo do alto custo computacional empregado, e na tentativa de reduzir as taxas de processamento, foi utilizada uma ferramenta estatística que pudesse, de maneira robusta, selecionar regiões importantes do espectro que estivessem contribuindo para a diferenciação das classes sadia e doente. Assim, o Teste t de student foi a ferramenta estatística empregada nos espectros normalizados, executando o teste bilateral com 5% de significância, assumindo a não homogeneidade da variância e a normalidade dos dados, ponto a ponto no espectro LIBS. Dessa maneira, foi obtido um p-valor para cada comprimento de onda de emissão, e com isso,

foram selecionadas regiões do espectro LIBS que contivessem picos de emissão dos elementos de interesse (Ca, Mg e K) que apresentassem, portanto, diferença estatística significativa entre as classes sadia e doente. O p-valor indica a evidência ou não de diferença estatística significativa entre os dados, se é menor do que 0,05 diz-se que existe a evidência de diferença estatística significativa entre os dados das classes comparadas, e quanto menor o p-valor, menor a probabilidade de que a diferença apresentada seja decorrente do acaso.

Para verificação da qualidade dos dados obtidos por LIBS, comparamos o sinal adquirido com as concentrações definidas pela técnica de referência. Para a construção dos modelos de calibração foi desenvolvido um método de normalização e obtenção da área final de cada pico de emissão de interesse. Para eliminação do offset eletrônico do sistema foi calculada a média de intensidades próximas ao início de cada um dos espectrômetros, em uma região em que não há linhas de emissão presentes, e por fim, este valor foi subtraído de cada intervalo espectral referente a cada um dos 7 espectrômetros. Após a definição do intervalo envolvendo o pico de emissão a ser estudado foi traçada uma reta na sua linha de base, obtida a área abaixo desta curva, e esta conduzida ao zero. Feito isto, foi traçado o perfil Lorentziano do pico e calculada a área do pico a partir do ajuste. Em seguida, a área obtida foi normalizada pela área calculada abaixo da reta, minimizando os efeitos de matriz. Para a construção dos modelos de calibração foram utilizadas as linhas 422,67, 766,49 e 285,21, respectivamente de Ca I, K I e Mg I.

Por fim, a PCA foi utilizada para extrair informações dos dados espectrais coletados, além de melhorar a capacidade de identificação e discriminação dos dados adquiridos de diferentes amostras de soja. A partir da análise de PCA, tanto o “*scree-plot*”, quanto o “*score-plot*” foram estudados. O *scree-plot* permite a verificação da variância dos dados de acordo com cada componente principal. Já o *score-plot* mostra a projeção de cada amostra nas componentes principais. A avaliação do parâmetro denominado “*loading*”, calculado durante a análise de PCA, também foi considerada. Os *loadings* são as correlações existentes entre cada uma das variáveis originais, no caso os próprios comprimentos de onda, com as componentes principais. Um valor positivo de *loading* demonstra que a variável e a componente principal são positivamente correlacionadas. Isso indica, portanto, que um aumento no valor da variável implica em um aumento dos valores da componente principal; enquanto que, para valores negativos de correlação, temos o oposto, ou seja, um aumento no valor da variável implica em menores valores da componente. Todo tratamento dos dados foi feito por meio de rotinas desenvolvidas no software Matlab (versão R2014a).

Na tentativa de verificar a capacidade de distinção das classes sadia e HVRF por meio dos atributos selecionados foram gerados modelos de classificação através da associação dos métodos de classificação via regressão (CVR, acrônimo do inglês Classification Via Regression) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR, acrônimo do inglês Partial Least Square Regression), a qual chamaremos de CVR+PLSR. Para as avaliações de classificação previstas nesta etapa do trabalho, foi executada a validação cruzada aleatória com a divisão em 10 grupos (usualmente denominado 10-fold). O número de componentes para aplicação da ferramenta CVR+PLSR utilizado, no caso dos dados do sistema LIBS comercial, foi de 20. Os dados quantificados por AAS também tiveram sua capacidade de distinção por classe avaliada através da geração de modelos de classificação usando 5 componentes. O método será melhor abordado na seção de Ferramenta de classificação, mais adiante.

4.3.2 LIBS com sistema de detecção de alta resolução (sistema de bancada)

Este sistema LIBS, montado no laboratório de Óptica e fotônica da Embrapa Instrumentação, pode operar em dois modos, SP e DP LIBS e com dois diferentes lasers. Um laser pulsado, de Nd:YAG, “Q-switched” (Quantel – Brilliant) com comprimento de onda centrado em 532 nm, energia máxima por pulso de 180 mJ (nominal), duração do pulso de 4 ns, diâmetro do feixe do laser no foco em torno de 8 μm e taxa de repetição de até 10 Hz. O segundo laser é um Nd:YAG também pulsado, “Q-switched” (Quantel – Ultra 50) com comprimento de onda centrado em 1064 nm, energia máxima por pulso de 50 mJ, com duração de pulso de 8 ns, diâmetro do feixe no foco em torno de 28 μm e taxa de repetição de até 20 Hz. O sistema de detecção consiste de um espectrômetro de alta resolução, ARYELLE 400-Butterfly, que resolve uma faixa espectral de 190-330 nm ou 275-750 nm, com resolução espectral de 13-24 pm ou 29-80 pm, respectivamente, e possui uma CCD intensificada com 1024 x 1024 pixels. Um conjunto de espelhos dicróicos, apropriados a cada comprimento de onda, são utilizados para direcionar o feixe dos lasers para a superfície da amostra, e lentes, com filme antirreflexo, são utilizadas para focalização do feixe na superfície da amostra. O porta-amostra fica posicionado sobre uma plataforma x-y micro controlada pelo software de aquisição dos dados, tornando a varredura da amostra mais rápida e precisa. Para o controle temporal entre os dois lasers, e entre o segundo pulso do laser e o sistema de detecção, é utilizado um gerador de atraso de pulso com oito canais (Quantum Composers – modelo 9618). As medidas foram feitas em atmosfera ambiente, e durante os experimentos as medidas de energia de ambos os lasers foram aferidas. O ganho do MCP (do inglês, Microchannel Plate)

foi mantido em 1500. A Figura 13 mostra a montagem experimental simplificada do sistema, e como ela pode operar nos dois modos, SP e DP, e nas duas geometrias do DP LIBS, colinear e ortogonal.

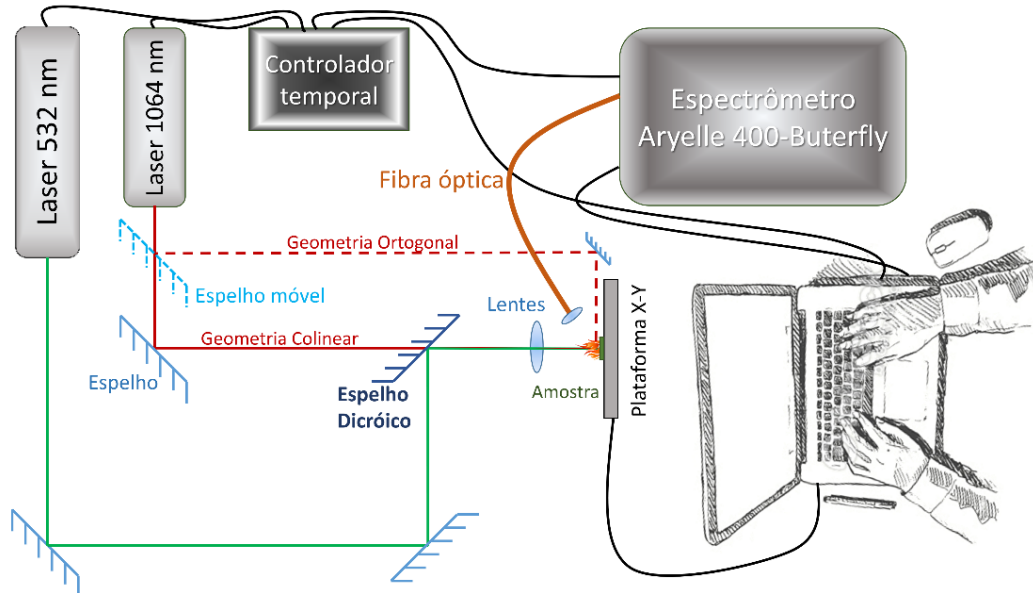


Figura 13 - Montagem experimental do sistema LIBS de alta resolução. Este sistema opera no modo SP LIBS (532 nm), DP LIBS colinear (espelho móvel removido) e DP LIBS ortogonal (linha descontinua). Todos os componentes operam em sincronia, controlada pelo gerador de atrasos.
Fonte: Elaborada pela autora.

Testes anteriores mostraram um melhor desempenho do sistema quando o modo DP LIBS foi configurado com o laser 1 de ablação em 532 nm e o laser 2 em 1064 nm e, portanto, as medidas foram realizadas desta maneira. A Figura 14 traz uma foto do sistema experimental utilizado.

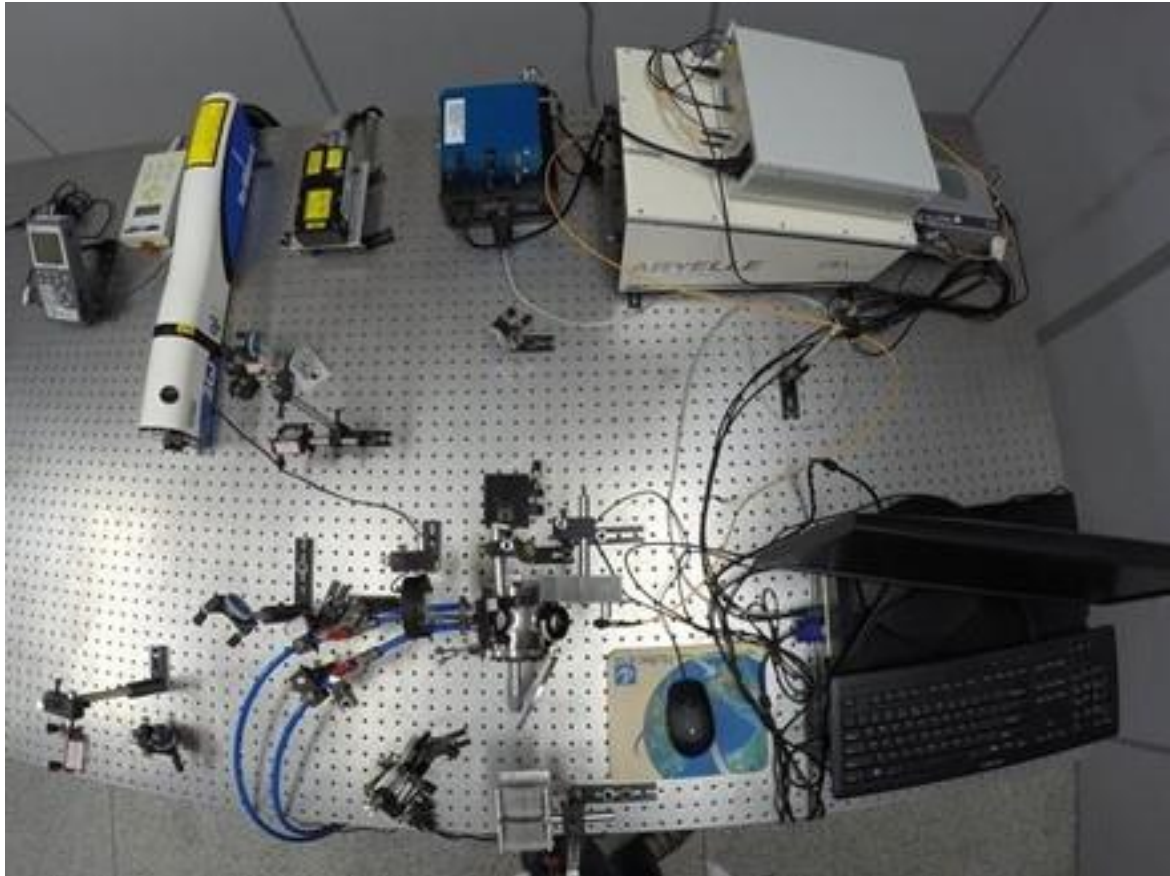


Figura 14– Foto do sistema experimental DP LIBS do Laboratório de Ótica e Fotônica da Embrapa Instrumentação.

Fonte: Foto cedida por Alfredo Xavier.

4.3.2.1 Tratamento dos dados LIBS: sistema de bancada

Tanto as otimizações realizadas no sistema SP LIBS quanto no DP LIBS foram avaliadas a partir de 10 medidas para cada condição experimental testada, obtida a área dos picos investigados, e por fim utilizada a média das áreas das dez medidas LIBS. A área do pico foi obtida por meio do ajuste de uma função lorentziana deste, realizada logo após a correção da linha de base através de reta traçada na base do pico. Erros de até 10% devido a desvios ocorridos durante o ajuste da curva Lorentziana foram aceitos.

Operando no modo de pulso único, tentou-se otimizar as medidas para a obtenção de uma boa relação sinal-ruído, levando em consideração também parâmetros físicos do plasma como temperatura e densidade de elétrons. As avaliações SP LIBS conduzidas neste trabalho foram por meio do laser com comprimento de onda em 532 nm. Parâmetros como a energia do pulso, o tempo de atraso do espectrômetro em relação ao pulso e também, a largura da janela de aquisição (também conhecido por gate width, em inglês) foram avaliados e escolhidos os melhores considerando o sinal adquirido.

O mesmo procedimento foi conduzido na configuração DP LIBS para melhoramento de sinal, inicialmente para o sistema na geometria colinear e, na sequência, quando o sistema passou por mudanças, na configuração ortogonal no modo de reaquecimento. Para ambos os casos, foram testados diferentes valores de atraso do espectrômetro associados a diferentes atrasos entre o primeiro e o segundo pulso de laser. Parâmetros como a temperatura e a densidade de elétrons do plasma também foram considerados no processo de otimização dos parâmetros de medida, e serão abordados na sequência para melhor compreensão dos métodos utilizados nestes cálculos.

As amostras do conjunto Xingu II foram medidas pelo sistema DP LIBS colinear e ortogonal a partir das condições otimizadas definidas no estudo anterior. É de extrema relevância mencionar que, as medidas foram feitas intercalando amostras sadias e doentes, evitando assim enviesamento dos dados. A partir de tais medidas foi iniciado o processo de avaliação das condições físicas dos plasmas obtidos para posterior análise quantitativa, que será melhor explicado em seguida. A partir dos dados quantificados, e dos diferentes perfis nutricionais obtidos para amostras sadias e HVRF, esses dados também foram estudados segundo a capacidade de definição de modelos preditivos para a doença em questão. Assim, através do emprego do método CVR+PLSR por meio do software livre Weka, métricas sobre os classificadores desenvolvidos foram obtidas e avaliadas.

Avaliação das condições físicas do plasma gerado: temperatura e densidade de elétrons

Para determinação da temperatura do plasma para os dados obtidos a partir da rede Echelle (DP LIBS) foram realizadas inúmeras avaliações para a escolha das linhas de emissão que pudessem proporcionar um gráfico de Boltzmann de qualidade, ou seja, que fosse realmente representativo da temperatura do plasma. Apesar das tentativas de busca por diferentes elementos que tivessem uma série de linhas de emissão que pudessem ser utilizadas para este fim, apenas o Ca foi o elemento que apresentou número de linhas suficientes para uma definição da temperatura de maneira confiável. Foram inicialmente identificadas mais de vinte linhas de Ca, e respeitando alguns critérios, essas linhas foram cuidadosamente reduzidas a sete no total.

As linhas de emissão resultantes de transição envolvendo o estado fundamental foram excluídas, pois elas são as que mais severamente são afetadas pelo fenômeno de auto absorção, que pode alterar o perfil da linha e mascarar a determinação do elemento. Linhas com energia do nível mais baixo inferiores a 6000 cm^{-1} também precisaram ser excluídas para evitar

totalmente este problema. (99) Além disso, transições com coeficiente de Einstein para emissão espontânea inferiores à $10^6 s^{-1}$ também não devem ser consideradas para finalidades quantitativas de análise já que, os tempos de emissão correspondentes podem ser comparáveis com os tempos associados às variações do plasma. Picos de emissão com intensidades relativas muito altas (geralmente superior à 3000) precisam ser considerados com cuidado, pois podem superestimar a população de uma espécie se esta existir em alta concentração na amostra. Por outro lado, pode ser uma linha que auxilie na detecção de elementos traço quando se esteja interessado em detecções e/ou quantificações, e então essa deve ser uma escolha criteriosa. (99)

Respeitando os critérios acima mencionados, e levando em consideração linhas que pudessem fornecer um maior intervalo de energias do estado excitado possível, proporcionando um gráfico de Boltzmann consistente, chegamos à seleção de linhas que consta na Tabela 2. Os valores de acurácia na probabilidade de transição dada pelo NIST também foram observados durante a seleção das linhas, dando preferência sempre às que proporcionassem uma menor incerteza da transição. Assim, $C+ > C > D$ em ordem de melhor acurácia, que indicam incertezas de $18\% < 25\% < 50\%$. (64)

Tabela 2 – Linhas de Cálcio I, e os parâmetros envolvidos na transição, selecionadas para o cálculo da temperatura do plasma a partir do método de Boltzmann ao longo do trabalho. Além dos comprimentos de onda são mostrados na tabela o coeficiente de Einstein para emissão espontânea, as energias inferior e superior envolvidas na transição, e a degenerescência do nível superior de energia.

Comprimento de onda (nm)	$A_{ki} (s^{-1})$	Acurácia	$E_i (cm^{-1})$	$E_k (cm^{-1})$	g_k
364,44	$3,55 \cdot 10^{+7}$	C+	15315,943	42747,387	7
428,30	$4,34 \cdot 10^{+7}$	C+	15210,063	38551,558	5
430,25	$1,36 \cdot 10^{+8}$	C+	15315,943	38551,558	5
445,48	$8,7 \cdot 10^{+7}$	C	15315,943	37757,449	7
616,22	$4,77 \cdot 10^{+7}$	C	15315,943	31539,495	3
643,91	$5,3 \cdot 10^{+7}$	D	20371,000	35896,889	9
646,26	$4,7 \cdot 10^{+7}$	D	20349,260	35818,713	7

Fonte: Dados retirados da base de dados do NIST. (64)

A partir das linhas de Ca selecionadas, e inicialmente assumindo que a condição de LTE seja totalmente satisfeita, foi aplicado o método de Boltzmann. Para os dados de otimização o cálculo da temperatura foi feito para cada tiro de medida LIBS e logo em seguida foi obtida a temperatura média para cada uma das condições de medida avaliadas. Enquanto que, para os dados de quantificação elementar, primeiramente foram calculados os espectros médios por

amostra, e em seguida, a partir das médias, foi calculada a temperatura do plasma por amostra, o que reduz o custo computacional, visto que estamos trabalhando com um número grande de amostras e também um número bem maior de medidas por amostra.

A Figura 15 traz um exemplo de gráfico de Boltzmann a partir do qual se é obtida a temperatura do plasma. Dessa maneira, foi calculada toda e qualquer temperatura de plasma a que mencionamos neste trabalho, seja ela obtida a partir de um espectro médio ou não.

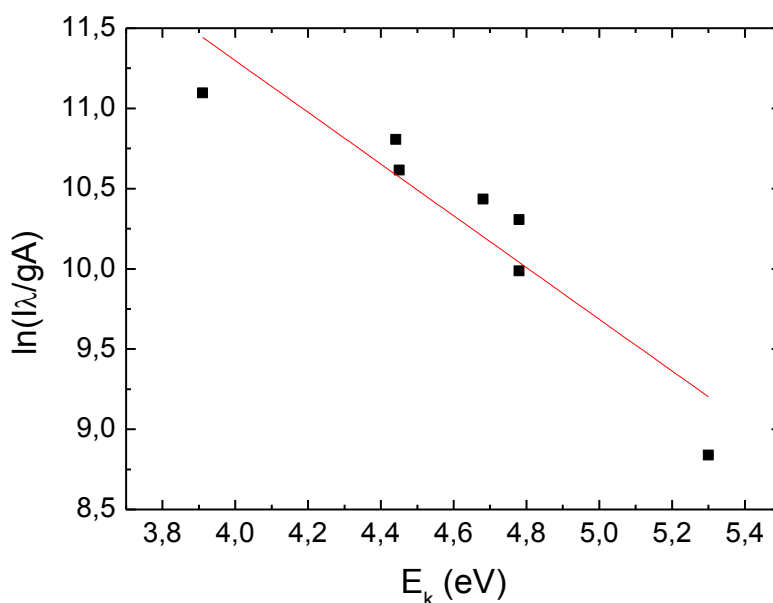


Figura 15 - Exemplo de um gráfico de Boltzmann feito a partir das linhas de Ca selecionadas previamente. A melhor reta traçada nos pontos do gráfico permite a obtenção do coeficiente angular, à partir do qual se é determinada a temperatura do plasma, em Kelvin.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tanto para dados de otimização, quanto para os dados de quantificação obtidos a partir do sistema DP LIBS, foram calculadas as densidades eletrônicas do plasma. Assim como no caso da temperatura, para os dados de otimização do sistema esses valores foram obtidos para cada medida da amostra teste, nas condições especificadas, e logo após, foi feito o cálculo da média dos espectros adquiridos por amostra, ou seja, por condição de avaliação do sistema. Para os dados adquiridos a partir do DP LIBS colinear e ortogonal otimizados, primeiro foram calculados os espectros médios por amostra a partir das 30 medidas realizadas, e em seguida calculadas as densidades de elétrons.

A densidade foi obtida a partir da equação de Saha-Boltzmann, já mencionada em seção anterior. Para isso, dois picos de emissão de um mesmo elemento, sendo estes de duas espécies consecutivas, ou seja, um pico de emissão atômica e outro de emissão iônica, foram selecionados para obtenção da razão. Como o Ca foi utilizado para determinação da

temperatura, e explorando as possibilidades do espectro de uma folha de soja, optamos por usar também picos de Ca para esta determinação. Assim, após levar em consideração fatores como os já mencionados anteriormente, e cuidadosa e criteriosamente selecionar duas linhas de Ca, sendo uma atômica e outra iônica, conforme Tabela 3, foi feito o cálculo da densidade de elétrons a partir da Equação (12).

Tabela 3 – Dados referentes às linhas selecionadas para o cálculo da densidade de elétrons através do método de Saha-Boltzmann.

	Comprimento de onda (nm)	A_{ki} (s^{-1})	Acurácia	E_i (cm^{-1})	E_k (cm^{-1})	g_k
Ca I	612,22	$2,87 \cdot 10^{+7}$	C	15210,063	31539,495	3
Ca II	370,60	$8,8 \cdot 10^{+7}$	C	25191,510	52166,930	2

Fonte: Dados retirados da base de dados do NIST. (64)

Tendo concluído o cálculo da densidade de elétrons do plasma, foi verificada a condição de McWhirter para possibilidade de existência de LTE no plasma estudado. Assim como em inúmeros trabalhos que constam na literatura, este foi o critério utilizado para avaliação do plasma e, sendo ele satisfeito, assumimos a existência de LTE no plasma gerado para dar sequência às avaliações quantitativas do sistema e aplicação do método CF.

Durante o processo de otimização do sistema, acompanhamos a existência de LTE para as transições do Ca como parâmetro de comparação entre as diferentes condições experimentais. Para a aplicação do método CF nos dados DP LIBS nas geometrias colinear e ortogonal, esta avaliação foi feita para cada um dos elementos que foram quantificados, já que esta é uma condição necessária. A equação utilizada no cálculo da densidade mínima de elétrons necessária no plasma para assegurar as colisões no mesmo, conforme explicitado pelo critério de McWhirter, está bem descrita na seção anterior.

Tendo concluída esta etapa de avaliação do plasma, os espectros obtidos e parâmetros calculados para as amostras do conjunto Xingu II medidos no sistema DP LIBS (colinear e ortogonal) passaram às avaliações quantitativas.

Avaliações quantitativas: análise univariada e CF

Para as avaliações quantitativas os picos de emissão presentes no espectro todo foram investigados e identificados. Assim, todos os elementos presentes na amostra e que foram

excitados durante a formação do plasma em quantidade suficiente para que pudessem ser estudados no espectro LIBS, passaram então pela tentativa de quantificação. A seleção dos picos de cada elemento utilizado nessa etapa respeitou os critérios abordados anteriormente na tentativa de evitar quaisquer alterações de perfil dos picos que pudessem interferir na quantificação dos mesmos. Assim, é possível notar, por exemplo, que apenas picos de intensidade baixa à moderada foram escolhidos para a etapa de quantificação, excluindo picos sofrendo de possíveis efeitos de reabsorção, alargamento Stark, entre outras anomalias.

Através de uma análise univariada e a partir da construção de curvas de calibração, os elementos Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg e Mn foram quantificados tanto para o sistema DP LIBS operando na geometria colinear, quanto na geometria ortogonal. Os modelos foram gerados a partir das próprias amostras de folhas de soja que foram nutricionalmente avaliadas pela técnica de referência, após a remoção de 6 amostras aleatoriamente, que foram em seguida utilizadas para validar o modelo criado e verificar o quão assertivo é o método. No caso da quantificação por CF as mesmas amostras foram estudadas. O Ca foi utilizado como elemento padrão para a determinação dos demais, e por fim, foi obtido um gráfico de correlação das concentrações obtidas pelo método proposto e pela técnica de referência. A Tabela 4 a seguir mostra o comprimento de onda dos picos de cada um dos elementos a serem quantificados.

Tabela 4 – Especificação dos comprimentos de onda dos picos usados na quantificação elementar das amostras de folhas de soja, tanto pelo método convencional de curvas de calibração, quanto pelo método CF.

Elemento	Linha de emissão (nm)
Al I	394,40
Ca I (padrão interno no CF)	428,94
Cu I	324,75
Fe I	358,12
K I	693,88
Mg I	516,73
Mn I	403,45

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Ferramenta de classificação: geração de modelos a partir de CVR + PLSR

CVR+PLSR é um método para classificação que associa classes nominais à números, usando um processo de binarização. Em seguida, o método aplica funções para a definição de

cada classe. Este tipo de classificação foi proposto por Frank e colaboradores (100) e encontra-se bem explicado e utilizado por Cardinali e Ranulfi, que aplicaram o método em ferramentas diagnósticas para amostras agroambientais. (20,101)

Para construção dos modelos de classificação foi utilizado o software livre Weka, amplamente empregado em análises quimiométricas. (102) Para construção dos classificadores é necessário estabelecer um conjunto denominado Treino para calibração do modelo de regressão, e um conjunto que chamamos de Teste, para posterior validação do modelo gerado. Assim, através de um processo chamado de validação cruzada verificamos a capacidade de generalização do modelo de predição. Ou seja, o conjunto de dados total é dividido em n grupos, o sistema utiliza $n - 1$ grupos para a geração do modelo, e em seguida testa o modelo no grupo que ficou fora da construção do mesmo, e assim, verifica o desempenho deste através da análise de parâmetros como acurácia, precisão, entre outros fornecidos pelo próprio software utilizado. Na sequência, o grupo de Teste é reintegrado ao grupo total, e um novo grupo é retirado para fazer papel do grupo de Teste, até que todos os grupos sejam usados uma vez como conjunto Teste. Ao final, como resultado da validação cruzada, obteremos a média das várias métricas utilizadas para avaliação dos classificadores.

Como o objetivo final do trabalho é saber a capacidade de diferenciação das amostras sadias e doentes com HVERF através dos diferentes perfis nutricionais, com a possibilidade de propor LIBS como ferramenta diagnóstica e também de compreensão da doença em estudo, tanto os dados do LIBS comercial, quanto os dados quantificados por CF obtidos a partir das duas geometrias DP LIBS (colinear e ortogonal no modo reaquecimento), foram utilizados na construção de modelos de classificação, e através de diferentes métricas, foram avaliados os dados que proporcionaram os melhores resultados de separação das classes.

Para melhor visualização da classificação dos modelos criados, os resultados são expressos por meio de uma matriz de confusão dos dados para cada validação cruzada realizada. As linhas dessa matriz indicam o número total de amostras pertencentes a uma determinada classe, enquanto as colunas indicam o número de amostras e como elas foram classificadas pelo modelo (Figura 16).

Considerando as amostras doentes como nossa classe de maior interesse e, portanto, a classe positiva, então temos que, as amostras nominalmente sadias da diagonal principal são os verdadeiros negativos (VN) da análise, e as amostras nominalmente doentes da diagonal principal, são os verdadeiros positivos (VP). As amostras sadias, que foram classificadas como doentes são os falsos positivos (FP) do modelo, e as amostras doentes, classificadas como sadias, são os falsos negativos (FN). (103) A partir dessas taxas, VP, FP, VN e FN, é que são

estabelecidas as métricas de avaliação dos modelos de classificação. A Figura 16 traz um modelo de matriz de confusão obtida a partir da validação cruzada dos dados. No lugar do número de amostras são apresentadas as siglas definidas acima, demonstrando sua posição na matriz.

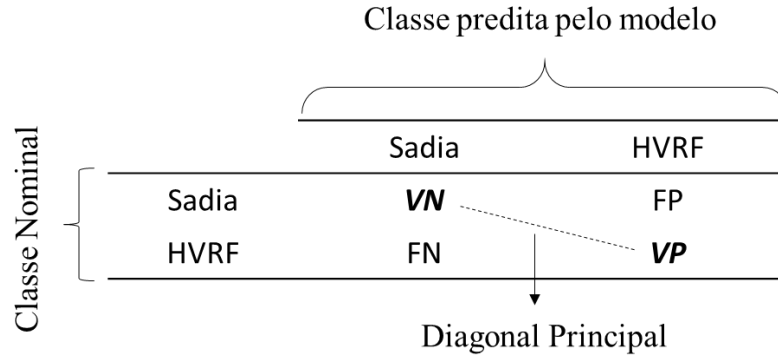


Figura 16 – Matriz de confusão obtida a partir da validação cruzada dos dados para avaliação de modelos de classificação a partir das classes sadia e HVRF, considerando a classe doente como a referência para estabelecimento das métricas.

Fonte: Elaborada pela autora.

As métricas utilizadas na avaliação foram: a acurácia, a sensibilidade (também conhecida por revocação), a especificidade e, por fim, a precisão dos modelos e o índice *kappa*. A seguir apresentamos as equações para obtenção das métricas:

$$\text{Acurácia} = \frac{VN + VP}{VN + FP + FN + VP} \quad (20)$$

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{FN + VP} \quad (21)$$

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{VN + FP} \quad (22)$$

$$\text{Precisão} = \frac{VP}{FP + VP} \quad (23)$$

$$\text{Índice } \kappa = \frac{\theta_0 - \theta_e}{1 - \theta_e}, \quad (24)$$

Em que $\theta_0 = \frac{VN+VP}{VN+FP+FN+VP}$ e $\theta_e = \frac{1}{(VN+FP+FN+VP)^2} [(VN + FP)(VN + FN) + (FN + VP)(FP + VP)]$.

4.5 Técnica de referência: AAS (Atomic Absorption Spectrometry)

Para a performance das medidas das amostras de folhas de soja com a técnica de referência é necessário primeiramente realizar a digestão ácida das mesmas. Assim, após as medidas LIBS, as mesmas pastilhas foram pesadas (peso médio de 200 mg) e colocadas em tubos de ensaio para a digestão ácida. Neles, foram adicionados 10 ml de HNO_3 (65% v/v P.A.-A.C.S. da marca Synth) e assim permaneceram por 4 horas a 140°C em um bloco digestor aberto (1500W SL-25/40), como mostra a Figura 17. E então, 3 ml de H_2O_2 (35% v/v P.A.-A.C.S. da marca Synth) foram adicionados vagarosamente aos tubos, que permaneceram no bloco digestor à mesma temperatura por mais 4 horas. Decorrido este intervalo, e após resfriamento da amostra, a solução da digestão foi filtrada com membrana celulósica, diluída em água Milli-Q até completar 50 ml e armazenada em tubos fechados do tipo Falcon de 50 ml.



Figura 17 – Tubos de ensaio contendo ácido nítrico em processo de digestão das amostras dentro do bloco digestor aberto aquecido.

Fonte: Acervo da autora.

AAS é uma técnica espectroanalítica para a determinação quantitativa de elementos, baseada na absorção da radiação por átomos livres no estado gasoso. De forma bem básica, o que é feito é a geração de uma nuvem de átomos no estado fundamental, que são excitados por uma luz com comprimento de onda específico. O detector posicionado do lado oposto da lâmpada, após a passagem do feixe pela nuvem de elétrons, deve detectar uma diminuição de intensidade devido à absorção dos átomos presentes nessa nuvem de vapor. A partir de uma calibração prévia, é possível, portanto, determinar a concentração do elemento na amostra em

solução a partir da medida indireta da absorção da luz pelos átomos, ou seja, diminuição da intensidade da luz que alcança o detector (Lei de Beer-Lambert). (104)

O equipamento Perkin Elmer PinAAcle™ 900T AAS (Figura 18), presente no laboratório, operando no modo chama (FAAS, acrônimo do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry) pôde ser utilizado para a determinação de Ca, K, Mg, Na, Fe e Zn; e operando no modo forno de grafite (GFAAS, acrônimo do inglês Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry) pôde determinar: Al, Co, Cu, Mn, Mo e Ti. Essa técnica foi utilizada como referência e através dela obtidas as concentrações em mg/Kg para alguns elementos de interesse.

As medidas foram realizadas em triplicata. Foram feitos 3 brancos de digestão que ajudaram no controle da ocorrência de contaminação ao longo do processo. Além disso, 3 materiais certificados disponíveis no laboratório, e de matriz semelhante à das amostras, foram também digeridos para que fosse possível acompanhar a recuperação dos elementos a serem quantificados. Estes foram folhas de maçã (NIST Standard Reference Material 1515), folhas de pêssigo (NIST Standard Reference Material 1547) e folhas de tomate (NIST Standard Reference Material 1573a).

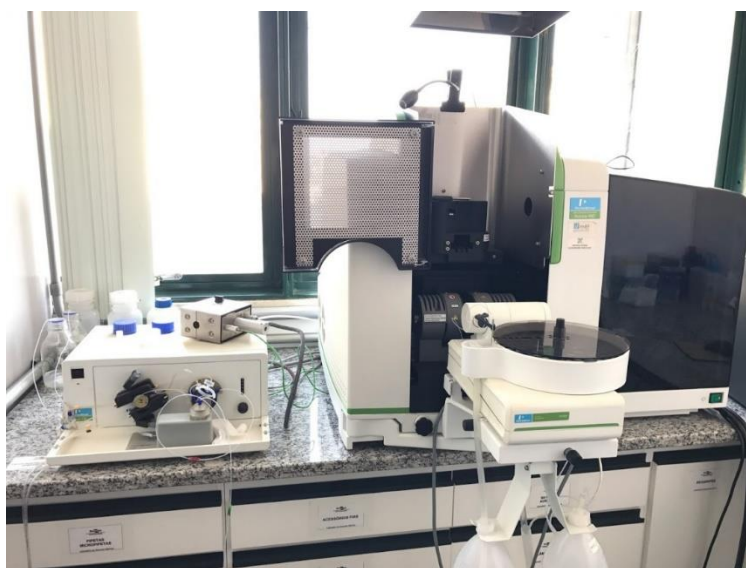


Figura 18 – Na foto, equipamento Perkin Elmer PinAAcle™ 900T AAS da Embrapa Instrumentação. O equipamento possui um sistema de leitura automática programada para a GFAAS, que pode ser realizado através do posicionamento de várias amostras de uma única vez, no carrossel que pode ser visto à direita.

Fonte: Acervo da autora.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados serão apresentados em diferentes subseções que abordarão desde as discussões sobre melhor forma de armazenamento deste tipo de amostra, até a aplicação de um método inovador como o CF para quantificação elementar nesse tipo de amostra, sem a necessidade de calibração prévia, e as descobertas encontradas em relação à variação do perfil nutricional em amostras de soja sadias e contaminadas pela doença HVRF com finalidade diagnóstica.

5.1 Armazenamento de amostras

Tendo em vista que, o conjunto principal de amostras a serem avaliadas por este trabalho viriam da região nordeste do Brasil, e que se tratavam de folhas de soja in natura, foi realizado então um estudo inicial quanto à melhor forma de armazenamento desse tipo de amostra. Este estudo culminou no desenvolvimento de protocolo para armazenamento correto deste tipo de amostra, tanto em campo, quanto durante o longo período de transporte das mesmas.

Primeiramente, em relação à condição do trifólio, ficou definido que a melhor forma de o armazenar seria com as folhas desmembradas dentro do saquinho plástico (Figura 19). Quando comparamos o trifólio íntegro e o trifólio desmembrado após uma semana de armazenamento, foi possível notar uma deterioração maior nas folhas do trifólio íntegro, já que possivelmente não ficam bem acomodadas nos saquinhos. Armazenar uma folha apenas, por saquinho plástico não trouxe vantagem em relação à conservação das mesmas, e aumentou o trabalho com as amostras. Dessa maneira, ficou definido que armazenar o trifólio desmembrado no mesmo saquinho faria parte do protocolo.

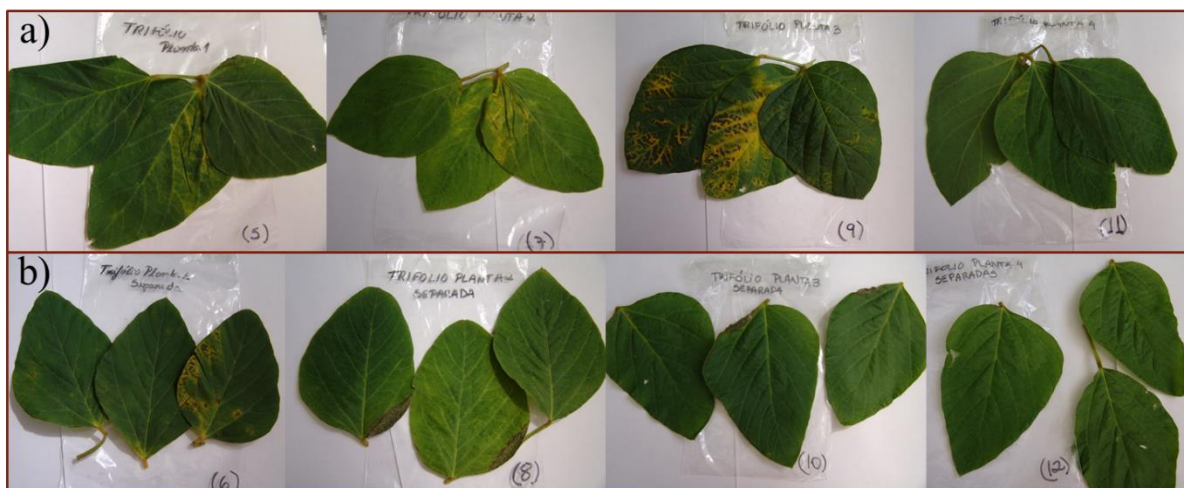


Figura 19 – Comparação de armazenagem das folhas de soja com o trifólio a) íntegro e b) desmembrado, após uma semana sob refrigeração na caixa de isopor com gelo.

Fonte: Acervo da autora.

A segunda constatação foi em relação à presença ou ausência de ar e/ou água nos saquinhos plásticos de armazenagem. Após acompanhar diariamente a evolução das amostras por uma semana, foi observado que o saquinho totalmente sem ar e também sem adição de água foi o que melhor conservou as amostras. Já em relação a trabalhar com amostras do meio ou da borda da plantação foi indiferente nos testes, assim, não foram feitas restrições desse tipo ao coletar as amostras nas fazendas do Maranhão.

Aquelas amostras que foram apenas colocadas no isopor, fora do saquinho plástico, deterioraram e secaram rapidamente, conforme esperado, sendo que no segundo dia de armazenamento elas já estavam totalmente secas e impróprias para as análises. Portanto, em relação a este estudo ficou estabelecido que, após colheita das amostras de folhas de soja, estas deveriam ser armazenadas em saquinhos plásticos preferencialmente transparentes, devidamente identificados quanto à classe, localização e número da amostra, com o trifólio desmembrado para melhor acomodação, e o ar deveria ser retirado o máximo possível do saquinho para posterior vedação. Os saquinhos contendo as amostras deveriam por sua vez, serem mantidos em pé, enfileirados, dentro do isopor contendo placas de gelo na parte de baixo, evitando contato direto com as amostras.

5.2 Concentrações elementares de referência: uma avaliação dos dados de AAS

Utilizando o FAAS, foram performadas medidas de Ca, Fe, K, Mg, Na e Zn. Para o caso do Zn, as concentrações encontradas foram baixas quando comparadas com os demais

elementos, conforme esperado, já que se trata de um elemento traço na amostra. Os resultados de quantificação serão aqui abordados, porém, nas etapas posteriores, não foram encontrados picos de Zn no espectro LIBS para que pudéssemos trabalhar a quantificação por CF em dados LIBS nas condições possibilitadas pelo equipamento. De qualquer maneira, as medidas FAAS foram validadas e recuperaram em média 82% da concentração total de Zn nos materiais certificados.

Para o Ca e Mg a recuperação foi superior a 90%. Para o Fe foi possível recuperar as concentrações dos materiais certificados em 80% em ao menos um dos materiais certificados. Em relação ao Na, foram realizadas as medidas FAAS, porém, como as digestões foram realizadas em tubos de vidro e não de Teflon ou Quartzo, foi preciso descartar estes dados. Isso foi necessário pois, o próprio vidro pode se desgastar ao longo do processo de digestão ácida, sendo removidas camadas do mesmo, de modo a contaminar e confundir as medidas de Na, que é um composto presente no material.

Os elementos que acreditávamos existir na amostra em baixas concentrações foram medidos utilizando GFAAS, mais trabalhoso, porém mais sensível do que o método da chama. De todos os elementos medidos (Al, Co, Cu, Mn, Mo e Ti), o Co, Mo e Ti aparentemente existem em concentrações realmente muito baixas, já que se apresentaram abaixo do limite de detecção da técnica de referência. No espectro LIBS também não foram encontradas linhas de emissão desses elementos, com exceção do Ti, que apresenta uma linha em 337,14 nm, de baixa intensidade. Porém, para a maioria das amostras, o Ti não pode ser determinado por GFAAS por estar abaixo do limite de detecção e, portanto, não foi utilizado nas análises futuras. O Al foi encontrado em quantidade razoável, e sua recuperação esteve dentro dos limites aceitáveis, de 80 a 120%, para ao menos uma das amostras de referência.

O Mn e Cu também puderam ser detectados. Para o primeiro caso a recuperação foi superior a 90% dos CRMs medidos. Para o caso do Cu a recuperação também ficou dentro do aceitável.

Tanto as amostras do conjunto Xingu II quanto as amostras do conjunto Parnaíba foram avaliadas por AAS. O método foi validado a partir do teste estatístico t de Student com 95% de confiança, e também a partir das avaliações de recuperação desempenhadas. A Tabela 5 traz os valores de concentração obtidos para os conjuntos Xingu II e Parnaíba que foram utilizados tanto nesta primeira parte do estudo, quanto mais adiante nas avaliações dos métodos de quantificação por LIBS.

Tabela 5 – As concentrações obtidas para diferentes elementos dos conjuntos Xingu II e Parnaíba obtidos pela técnica de referência. Os valores estão em mg/Kg.

Amostras	Xingu II							Parnaíba		
	Al	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Ca	K	Mg
Sadia 1	2221,3	19854,8	13,0	1401,9	8048,5	15908,9	66,3	18496,3	12346,4	5021,0
Sadia 2	1636,6	13896,0	14,2	1249,2	11702,1	10829,6	40,1	19069,5	12018,9	5023,3
Sadia 3	2171,1	14643,0	8,2	1506,2	10333,1	12202,3	43,8	13946,7	14903,9	5373,1
Sadia 4	4321,1	14603,4	13,0	1942,9	13764,2	18406,5	67,4	16140,8	12744,0	5710,6
Sadia 5	1174,7	12708,2	7,0	750,7	10512,8	9837,8	24,3	21919,2	12487,8	6362,9
Sadia 6	1294,0	11127,7	9,0	848,1	9809,7	8806,6	21,0	15657,8	16776,6	5308,6
Sadia 7	1503,2	13270,4	4,7	1042,9	7855,2	10695,2	25,1	15526,0	12312,6	4980,0
Sadia 8	4559,6	16401,8	18,8	2687,8	10771,0	39876,0	106,3	17364,4	13621,1	6826,6
Sadia 9	1128,9	12437,6	4,8	718,4	9077,9	9795,3	22,3	19443,5	9877,4	6638,7
Sadia 10	942,6	11261,3	4,9	666,0	8095,2	8198,1	15,5	15871,4	12394,9	5392,8
Sadia 11	1153,9	9173,8	4,3	837,5	14731,7	9201,9	19,3	10640,1	16455,4	3621,4
Sadia 12	2543,1	19171,2	9,8	1603,2	8679,2	21694,4	48,4	14296,3	16846,1	8299,7
Sadia 13	1696,7	17205,8	5,3	1150,2	7331,8	16557,1	30,2	18140,7	13082,5	5975,6
Sadia 14	1743,6	13706,8	8,7	949,4	10830,3	14585,9	34,1	15265,4	12778,9	4508,1
Sadia 15	1046,3	12702,3	3,9	625,4	8148,8	9118,6	16,8	13685,9	12879,8	6246,5
Sadia 16	1532,2	12061,9	6,3	1082,7	11005,2	12231,5	22,3	21536,5	11215,4	5625,9
Sadia 17	885,7	10437,0	4,4	528,0	10070,5	8449,9	17,0	17783,8	11411,8	6063,5
Sadia 18	1714,8	11819,0	5,2	1210,3	11412,3	12960,6	25,1	27237,0	9255,5	7480,4
Sadia 19	1523,0	10209,8	5,8	966,1	12098,6	10362,9	19,9	13829,0	13430,9	4939,2
Sadia 20	724,5	12180,6	5,3	615,1	7333,7	9277,3	15,0	23143,7	10427,3	8519,2
Sadia 21	1173,9	13465,1	7,8	718,6	6904,0	12491,1	19,1	20203,0	13116,6	5718,1
Sadia 22	1278,3	11992,7	7,1	706,2	11009,4	12944,6	23,4	18617,3	13126,2	4177,8
Sadia 23	1027,1	17627,2	5,7	616,8	2864,5	36214,8	18,5	22112,1	11202,7	6285,9
Sadia 24	2800,7	10778,1	4,5	3209,8	10089,9	8532,2	7,7	21813,3	11162,8	6100,1
Sadia 25	1290,5	10039,2	79,9	1112,3	10956,0	3872,0	105,0	27531,0	8223,1	7655,0
Sadia 26	537,9	13205,3	5,9	421,8	9558,7	6207,7	17,4	19597,6	12120,7	5054,1
Sadia 27	1052,0	13315,8	7,6	613,1	7222,2	9952,5	19,6	10976,0	14488,7	8220,3
Sadia 28	1294,7	11090,0	6,3	779,1	8819,7	11608,3	22,6	16797,1	13878,7	5278,1
Sadia 29	1614,3	11616,2	5,7	1012,5	11819,4	11197,8	21,2	27706,2	8994,5	8874,6
Sadia 30	1246,4	10655,7	3,3	816,8	7089,5	5170,2	12,7	17058,0	15314,6	7624,3
Sadia 31	1515,3	11558,1	6,1	840,7	10931,9	11010,7	26,3	24505,6	9002,4	9572,0
Sadia 32	1754,0	13076,9	7,3	1254,4	8204,2	12068,2	28,2	18951,6	13511,0	7335,4
Sadia 33	1356,2	10065,7	7,5	872,8	13204,0	10922,8	27,1	12967,9	14316,3	5386,7
Sadia 34	794,4	12363,3	3,9	735,4	6958,1	6576,4	98,6	13121,4	13719,3	5876,6
Sadia 35	1208,0	12138,6	15,2	821,1	11403,3	11699,0	140,5	19512,1	9498,3	6622,7
HVRF 1	763,0	10056,1	6,9	480,0	6512,5	10956,9	110,0	8619,9	14682,9	3471,2
HVRF 2	644,9	5593,4	7,2	399,4	8299,2	8532,4	97,1	13298,3	11182,1	5344,6
HVRF 3	565,8	6255,0	5,5	340,4	11842,1	6279,7	125,0	8784,5	13951,9	6519,4
HVRF 4	433,9	5150,2	3,6	263,2	7779,4	9555,1	162,3	4627,0	15167,5	6533,4
HVRF 5	1518,4	4201,6	8,4	562,2	15177,2	12585,9	161,0	5111,1	12531,1	5973,7
HVRF 6	1015,3	7124,7	8,2	543,1	14714,1	11879,9	120,6	7701,9	12669,2	3457,2

(continua)

(continuação)

Tabela 5 – As concentrações obtidas para diferentes elementos dos conjuntos Xingu II e Parnaíba obtidos pela técnica de referência. Os valores estão em mg/Kg.

HVRF 7	959,3	5001,7	6,5	494,0	14467,7	10927,1	99,4	11847,1	8783,3	5558,9
HVRF 8	576,7	5751,7	6,3	317,4	15151,9	6075,5	248,2	5969,8	12098,2	5258,5
HVRF 9	358,1	5863,9	4,3	221,3	10543,0	9016,2	76,1	21528,5	11495,1	6680,9
HVRF 10	805,0	7046,0	6,1	371,5	13828,7	10706,2	128,9	7780,7	8999,8	8567,0
HVRF 11	1304,4	5901,8	13,0	649,2	15835,5	16260,5	163,7	9782,3	16210,2	8148,0
HVRF 12	994,9	6906,7	10,1	486,4	16785,5	11591,1	192,8	4840,7	12545,8	4288,6
HVRF 13	390,2	5465,0	3,7	235,5	16293,5	4594,9	108,6	7307,9	15546,5	4935,8
HVRF 14	601,6	5484,2	5,0	329,2	11084,8	7164,3	154,0	6717,2	19979,8	3696,5
HVRF 15	1087,0	8228,2	8,7	507,7	10599,6	12589,3	139,6	7972,0	9995,1	3930,7
HVRF 16	897,5	7223,1	8,3	489,1	15768,0	11345,8	212,3	4785,5	20009,8	3649,3
HVRF 17	1188,3	8723,1	8,2	550,2	10596,5	13939,0	147,9	5230,6	15796,8	2326,3
HVRF 18	749,4	3545,0	9,7	419,5	13310,4	10329,3	115,1	4523,7	18227,8	3590,3
HVRF 19	414,1	12790,5	9,4	342,7	7462,7	10062,2	166,3	8997,9	13520,2	3419,0
HVRF 20	30,2	6768,7	6,0	162,6	15389,0	6209,5	92,7	8505,2	17521,9	4120,4
HVRF 21	234,4	8589,6	6,1	324,1	8632,0	6839,3	144,4	5374,5	16731,4	3351,6
HVRF 22	593,2	5603,1	6,8	383,0	16142,0	4720,9	264,4	7616,7	13884,3	5268,6
HVRF 23	203,0	9015,9	6,7	248,1	11311,1	6853,7	131,1	9391,5	14703,7	4172,3
HVRF 24	265,0	9800,8	10,2	299,8	10339,9	9518,7	169,2	10135,7	14254,8	4562,8
HVRF 25	459,8	8468,0	5,2	168,9	7671,5	8320,6	90,9	5551,8	14834,7	4689,6
HVRF 26	169,3	10684,5	7,0	205,2	9179,5	7833,2	119,5	3983,2	17221,2	4074,4
HVRF 27	242,3	6218,6	8,2	308,0	11248,3	5552,9	126,7	5641,2	25555,6	4957,2
HVRF 28	164,6	3044,5	4,4	210,8	11930,3	2707,8	52,3	10371,9	15436,9	3451,4
HVRF 29	222,4	5262,3	3,8	228,9	15416,5	3361,4	152,4	4354,1	15610,1	3298,2
HVRF 30	369,4	5172,4	10,2	312,2	14770,2	5443,4	275,9	3670,5	16063,7	4875,7
HVRF 31	195,8	8413,0	10,9	252,4	6755,7	6996,5	99,2	11138,3	64903,0	10954,6
HVRF 32	184,8	8894,5	13,4	270,0	6805,1	7139,8	126,4	5000,9	7423,1	3921,7
HVRF 33	303,9	9439,9	40,2	310,6	9337,3	8841,0	131,8	5833,9	9338,2	8411,5
HVRF 34	201,1	12424,5	13,5	317,2	7826,4	10871,3	127,0	5210,7	13459,5	5013,9
HVRF 35	193,7	6421,1	6,5	215,9	5249,1	4915,7	92,7	3850,7	18149,1	3787,2
HVRF 36	162,8	4844,3	10,7	270,8	10806,0	6873,1	119,0	5675,1	17884,4	6346,9

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3 Sistema comercial LIBS

5.3.1 Avaliação inicial dos dados

Através das medidas feitas no sistema SP LIBS comercial, instrumentalmente mais simples e com maiores possibilidades de análises qualitativas em campo e em larga escala, foram avaliados os espectros de emissão LIBS utilizando toda a faixa espectral. O estudo foi baseado na comparação e diferenciação das classes de amostras sadias e doentes, para os conjuntos

Xingu II e Parnaíba, e na sequência, o estudo focou na avaliação de três macroelementos específicos presentes nas amostras de folhas de soja e que puderam ser detectados pelo equipamento: Ca, K e Mg.

5.3.2 Perfil nutricional de amostras sadias e doentes: uma análise do espectro LIBS

Uma vez infectada pelo agente causador da doença, mesmo que o desenvolvimento desta aconteça de maneira local na planta, é esperado que esta inicie um processo de combate ao patógeno, relacionado a mudanças no seu metabolismo e, conseqüentemente, mudanças na sua composição nutricional. O espectro médio normalizado para as duas classes de amostra é mostrado na Figura 20, em que também apresentamos alguns picos de emissão devidamente identificados através de uma comparação com a base de dados do NIST (64).

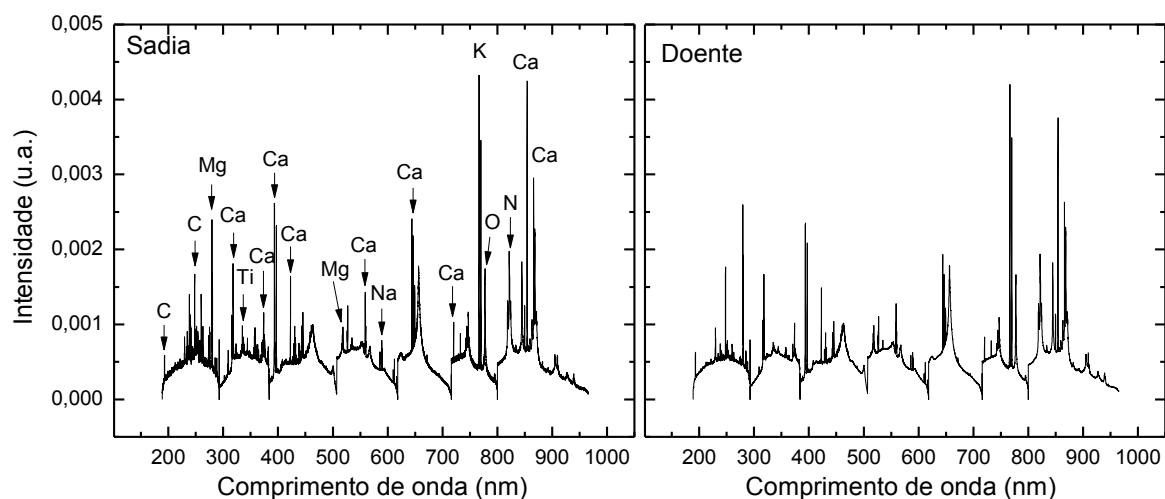


Figura 20 - Espectro médio obtido para amostras sadias (esquerda) e doentes com soja louca II (direita). No primeiro espectro algumas linhas de emissão apresentam-se já identificadas, a partir da base de dados do NIST (64).

Fonte: Adaptada de RANULFI et al. (29)

Após a normalização, o espectro médio por amostra foi calculado, e avaliado por PCA, a fim de observar a existência de padrões que pudessem agrupar as amostras doentes e sadias no novo espaço ortogonal das componentes principais. Feito isso, foram avaliadas a porcentagem da variância para cada uma das componentes principais, e as duas primeiras componentes juntas respondem à 56% e 82% da variância dos dados, respectivamente para o conjunto Xingú II e Parnaíba. Ou seja, mais da metade da variância dos dados é explicada por apenas duas componentes. O *scree-plot* para estes casos podem ser vistos na Figura 21.

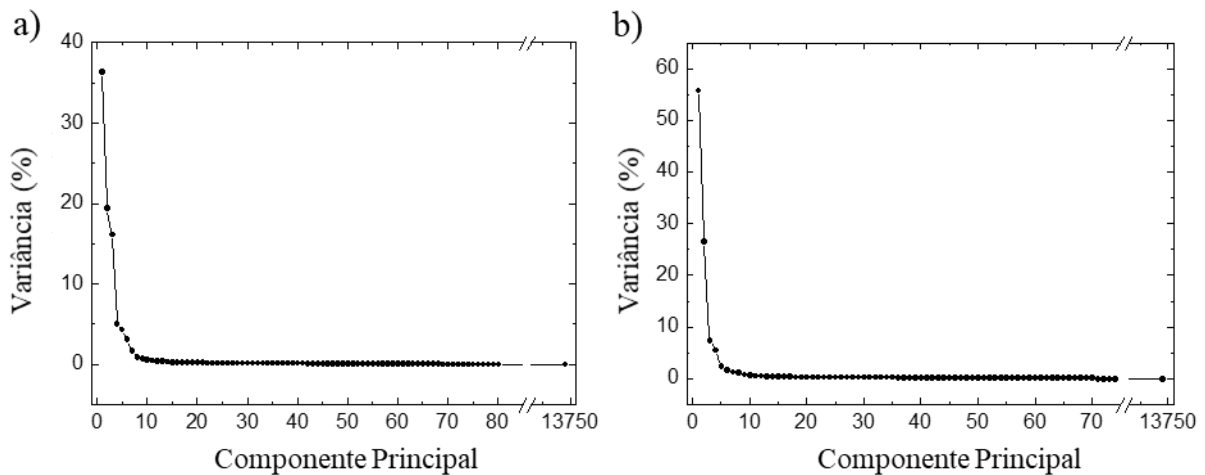


Figura 21 - *Scree-plot* para o conjunto Xingu II (a) e conjunto Parnaíba (b) obtidos a partir da PCA aplicada aos dados LIBS referentes a todo intervalo espectral adquirido.

Fonte: Adaptada de RANULFI et al. (29)

Na tentativa de diminuir o número de variáveis e, buscar as variações nutricionais específicas proporcionadas pela HVRF, o próximo passo das análises foi aplicar a ferramenta estatística de hipótese, Teste t de student, ponto a ponto do espectro, comparando as classes sadia e doente. A partir dos p-valores obtidos com o teste, foram selecionadas regiões do espectro LIBS contendo picos de emissão dos macroelementos que estavam contribuindo para a diferenciação das classes. A Figura 22 mostra as regiões de alguns picos avaliados para que se possa compreender melhor a análise feita. A coluna da esquerda traz os dados referentes ao conjunto Xingu II e a coluna da direita os referentes ao conjunto Parnaíba. A primeira linha de gráficos mostra um pico de Ca, a segunda dois picos de K e por fim, dois picos de Mg.

Os picos de cálcio, em particular, apresentaram p-valores muito próximos de zero para ambos os conjuntos avaliados, e esta diferença pode ser notada também na média dos espectros por classe de amostra, em que se nota uma diminuição relativa da intensidade das amostras doentes quando comparadas às sadias. Quanto menor o valor do p-valor, temos que menor é a chance da diferença estatística significativa encontrada ter sido advinda do acaso, ou seja, quanto mais próximo de zero, mais evidente a diferença. Quanto aos picos de Mg e K notou-se que os menores p-valores se encontram nas regiões próximas ao pico de emissão.

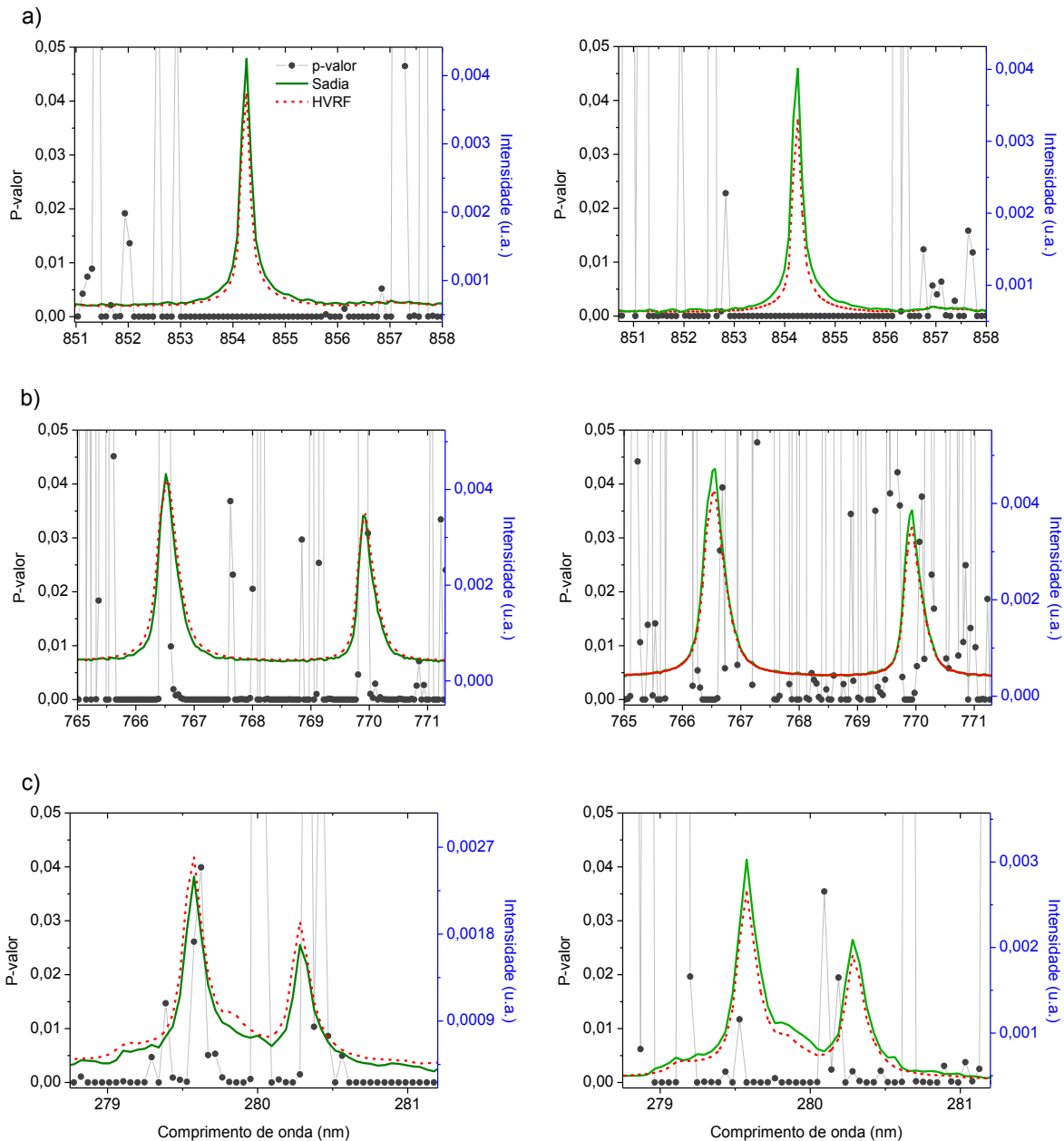


Figura 22 - Gráficos que mostram os p-valores obtidos após aplicação do Teste t ponto a ponto do espectro (eixo da esquerda), na busca por picos de emissão que trouxessem diferença estatística significativa entre as classes sadia e doente. O eixo da direita traz a intensidade dos picos médios normalizados para cada classe. A coluna de gráficos da esquerda traz os dados do conjunto Xingu II, e a da direita, do conjunto Parnaíba. Em a) são mostrados um pico de Ca em cada um dos gráficos, em b) a região que contém dois picos de emissão do K, e em c) uma região que contém picos de Mg.

Fonte: Adaptada de RANULFI et al. (29)

Uma vez que o Teste t de Student indicou as regiões do espectro que melhor contribuiriam para a diferenciação das classes, estes foram selecionados e, na Tabela 6 abaixo, seguem definidos os intervalos do espectro que continham os picos de emissão referentes aos macroelementos Ca, K e Mg e que foram utilizados para as posteriores análises. A partir destes, o número de variáveis passou de 13749 para 547.

Tabela 6 – Intervalos do espectro LIBS que apresentaram diferença estatística entre as classes sadia e doente com soja louca II, e que compreendem picos de emissão dos elementos Ca, K e Mg.

Elemento (linhas atômicas/iônicas)	Número de picos	Intervalo (nm)
Mg (iônicas)	2	278,5 - 281,0
Ca (iônicas)	2	315,0 - 321,0
Ca (atômica)	1	420,0 - 426,0
Mg (atômicas)	2	517,0 - 518,7
K (atômicas)	2	765,0 - 772,0
Ca (iônica)	1	850,0 - 858,0

Fonte: Adaptada de RANULFI et al. (29)

5.3.3 Área do pico LIBS *versus* concentração obtida por AAS: uma análise univariada dos dados

Antes de prosseguir com as avaliações relacionadas à diferenciação das classes estudadas, foi feita uma análise semiquantitativa dos dados LIBS com a finalidade de confirmar a qualidade dos mesmos. Para isso, obtidas as áreas dos picos de emissão dos três macroelementos em estudo, foi feita uma comparação com os dados de concentração elementar obtidos através da técnica de referência AAS. Uma vez que a intensidade das linhas de emissão são proporcionais à concentração dos átomos e íons presentes no plasma gerado, espera-se obter uma forte correlação entre a área do pico de emissão LIBS e a concentração AAS. A Figura 23 traz o gráfico de correlação dos dados após a eliminação de dados anômalos, bem como o coeficiente de correlação de Pearson para cada caso.

Os coeficientes de correlação de Pearson se apresentam, com exceção do Mg para o conjunto de amostras Xingú II, dentro do intervalo de 0,76 a 0,90; uma correlação de moderada a alta entre LIBS e a técnica de referência. Considerando a complexidade das amostras, já que se trata de uma matriz biológica, valores como estes são esperados. No caso do magnésio para as amostras do conjunto Xingú II, o baixo valor de correlação pode ser atribuído à baixa variação de concentração encontrada, se considerarmos a grande maioria das amostras, e ainda ao grande desvio padrão percentual apresentado quando consideramos a média de concentração AAS obtida para cada classe, que foi cerca de 30%. Isto pode ser resultado de erros durante os procedimentos para obtenção dos dados AAS de magnésio pelo método chama, uma vez que para os demais elementos, no mesmo conjunto de amostras, foram encontrados resultados satisfatórios.

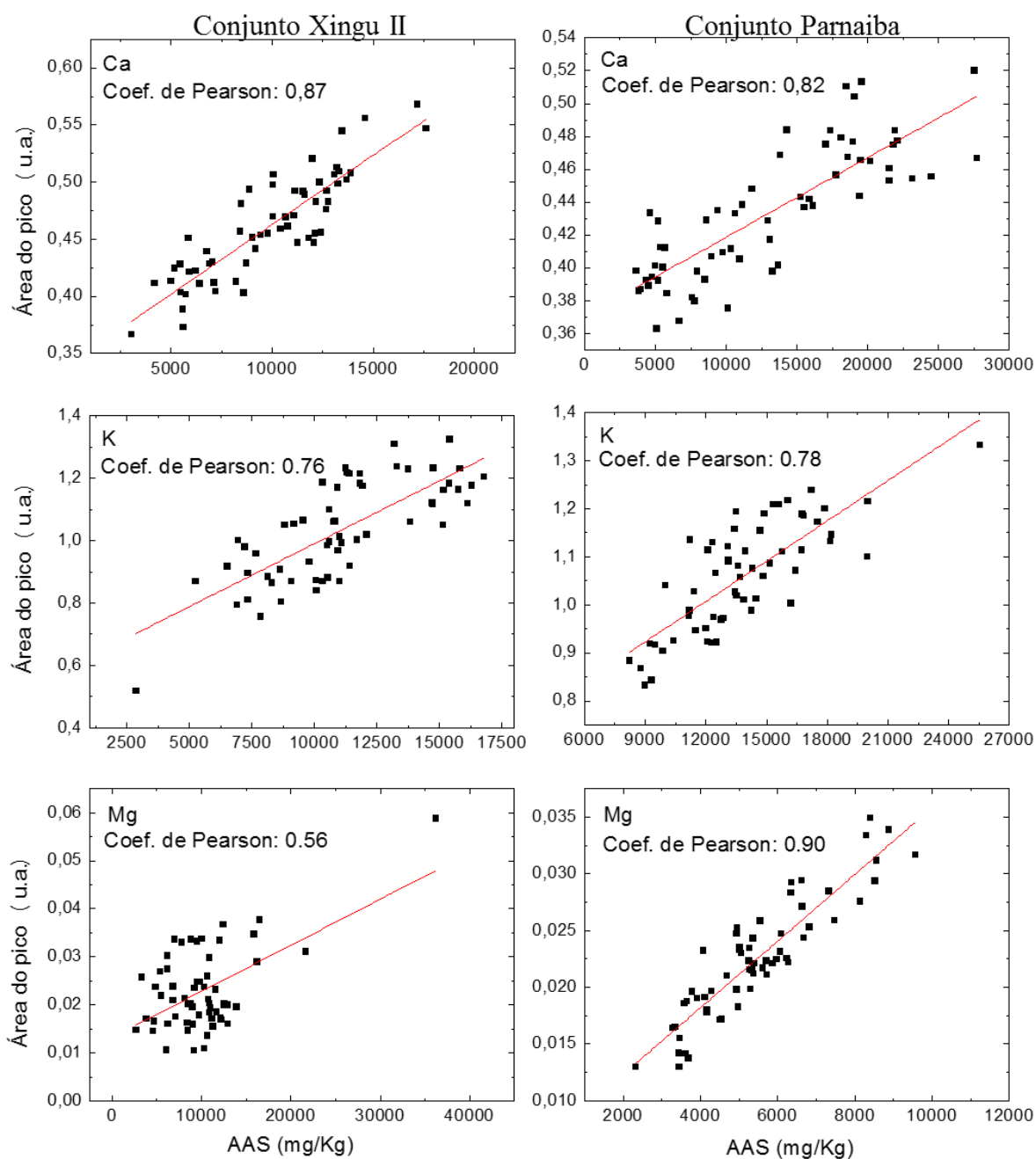


Figura 23 – Correlação entre as áreas dos picos obtidas por LIBS para Ca (422,67 nm), K (766,49 nm) and Mg (518,36 nm), e sua respectiva concentração elementar medida pela técnica de referência para os conjuntos Xingú II (esquerda) e Parnaíba (direita).

Fonte: Adaptada de RANULFI et al. (29)

5.3.4 Métodos quimiométricos aplicados aos intervalos de interesse

Tendo reduzido o número de variáveis através da seleção estatística descrita previamente, o método PCA foi aplicado novamente nos dados para a verificação da formação de agrupamentos das amostras segundo à classe correspondente. Os resultados mostraram que a

variância acumulada pelas duas primeiras componentes principais (PC, acrônimo do inglês Principal Components) foram de 84,9% e 82,7%, respectivamente para o conjunto Xingú II e Parnaíba, contra 55,8% e 82,5% de variância encontrados previamente à seleção de variáveis.

Em seguida, na tentativa de entender como cada um dos elementos em questão contribuem para cada PC, os valores de *loadings* foram avaliados para os dois conjuntos, Xingú e Parnaíba, considerando a existência das duas classes, sadia e doente com HVRF. É importante considerar que altos valores absolutos de *loadings* (coeficientes positivos ou negativos) indicam um forte efeito na PC avaliada. Ao avaliar os dados, observou-se que os picos de potássio têm grande influência na PC1, com a qual é positivamente correlacionada. Assim, um aumento na concentração de K na amostra, que leva a um aumento da intensidade da linha, reflete com um aumento também nos valores da PC1. Diferentemente, os picos de Mg e Ca tem maior correlação com a PC2, também de forma positiva, ou seja, temos um aumento dos valores da PC2 com o aumento da concentração de Mg e Ca na amostra. A Figura 24 mostra o interessante comportamento dos *loadings* para cada um dos conjuntos, e para cada uma das duas primeiras componentes.

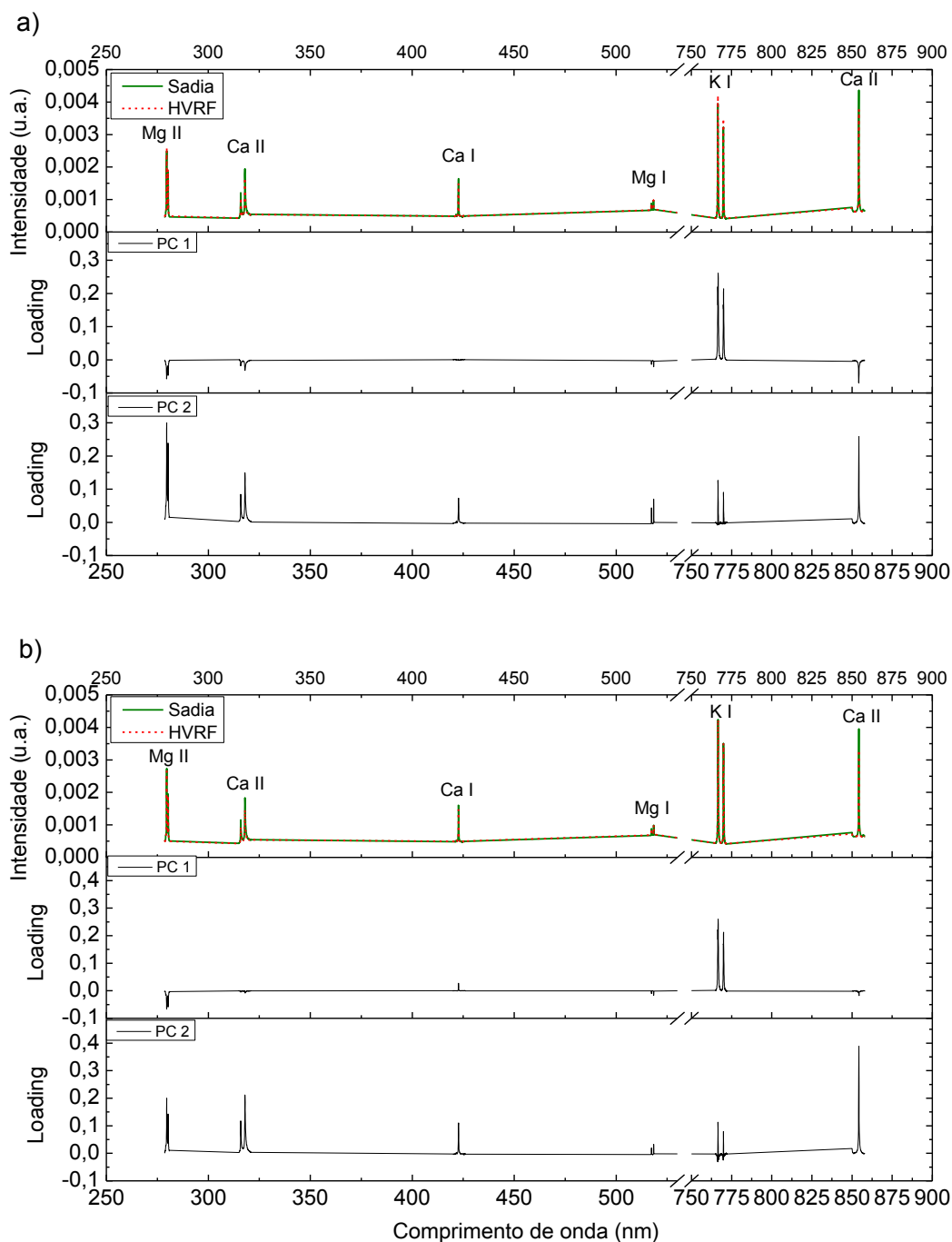


Figura 24 - Gráficos que mostram o comportamento dos loadings para as duas primeiras componentes principais. Em a) temos a análise para o conjunto Xingu II e em b) a análise para o conjunto Parnaíba. Fonte: Adaptada de RANULFI et al. (29)

Por meio da PCA aplicada, observamos também o *score-plot* para ambos os conjuntos (Figura 25). Neles, ainda que seja alta a aparente confusão entre as amostras sadias e doentes na distribuição, nota-se a tendência de separação das mesmas, especialmente no caso do conjunto Parnaíba (Figura 25.b). Explicitando neste mesmo gráfico os resultados concluídos através da avaliação dos *loadings*, conseguimos observar que, provavelmente, um aumento na concentração de Ca e Mg está relacionada à classe sadia, e um aumento na concentração de

potássio parece estar relacionada às amostras doentes. Tais resultados foram também confirmados pelas médias por classe das concentrações de Ca, Mg e K medidas pela técnica de referência (Tabela 5).

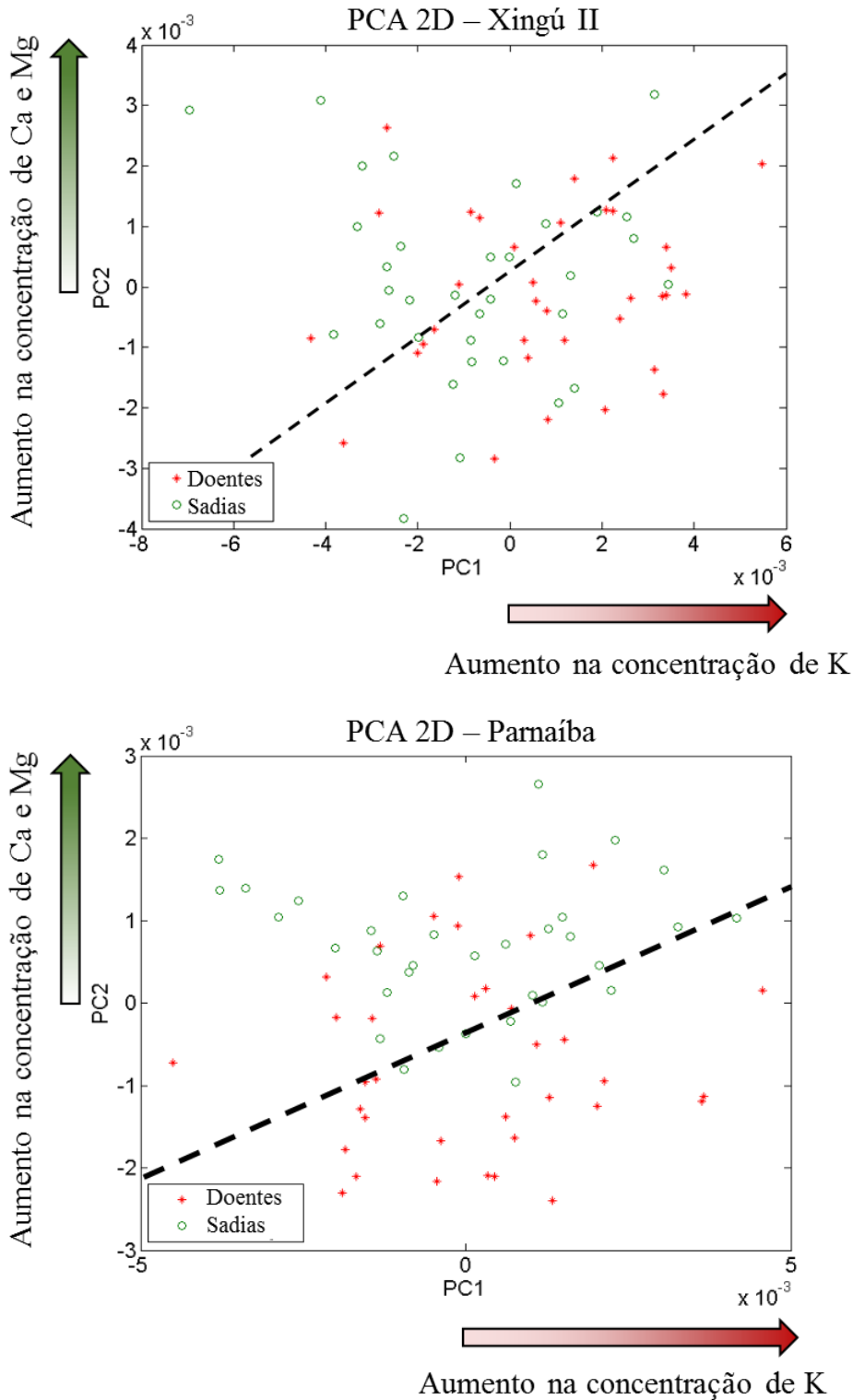


Figura 25 – Gráfico de pontos (score-plot) e resultado da interpretação dos loadings para os dois conjuntos de amostras estudados. A partir da figura e da análise de loadings feita anteriormente, foi possível associar um aumento da concentração de K e uma diminuição da concentração de Ca e Mg nas amostras, à doença HVRF.
Fonte: Adaptada de RANULFI et al. (29)

O teste-t de student também foi aplicado aos dados de concentração obtidos a partir de AAS, e dessa maneira verificou-se a existência de diferença estatística significativa entre as classes, para cada um dos elementos, e em ambos os conjuntos de amostras (Tabela 7). Porém, apesar dos resultados de concentração satisfatórios obtidos pela técnica de referência, vale lembrar que esta é uma técnica laboriosa, demorada, além de ser de alto custo, o que não viabiliza o uso em larga escala.

Tabela 7 – Concentrações médias por classe de Ca, K e Mg, obtidas por FAAS.

	Concentração (mg/Kg) /1000					
	Ca		K		Mg	
	Sadia	Doente	Sadia	Doente	Sadia	Doente
Xingú	18±3 ^a	10±3 ^b	10±2 ^a	12±3 ^b	13±4 ^a	8±3 ^b
Parnaíba	18±3 ^a	7±2 ^b	13±2 ^a	16±4 ^b	6±1 ^a	5±1 ^b

a,b = letras diferentes nas linhas, comparando as classes para cada elemento, representam diferença estatística significativa a partir do Teste-t de Student com 95% de confiança.

Fonte: Adaptada de RANULFI et al. (29).

Os dados dos intervalos selecionados foram também avaliados por um método de classificação, o CVR associado ao PLSR. A taxa de acerto (acurácia) obtida por validação cruzada dos dados atingiu 94,2% para o conjunto Xingú II e 87,3% para o conjunto Parnaíba, ou seja, taxas altas de diagnóstico. As matrizes de confusão para estes dois casos encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Matrizes de confusão para o conjunto Xingu II e Parnaíba obtidas através do modelo de classificação gerado a partir dos intervalos do espectro LIBS pré-selecionados.

Classe nominal (↓)	Xingu II		Parnaíba	
	Sadia	HVRF	Sadia	HVRF
Sadia	94%	6%	89%	11%
HVRF	6%	94%	14%	86%

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, a técnica LIBS associada a métodos quimiométricos parecem robustas o suficiente para serem aplicadas na caracterização nutricional de amostras de soja pastilhadas, e então distinguir amostras doentes e amostras saudas. O desenvolvimento do mesmo estudo paralelamente em dois conjuntos de amostras de diferentes variedades, obtendo resultados muito similares, demonstra grande potencialidade da técnica para diagnóstico em plantas.

Vale ressaltar que, os principais resultados encontrados através deste estudo com o sistema comercial LIBS foram recentemente publicados por Ranulfi e colaboradores em revista internacional: *Microchemical Journal*. (29)

5.4 Otimização de parâmetros: SP LIBS

Nesta etapa, o sistema LIBS de alta resolução foi otimizado para as medidas SP, utilizando o laser de excitação em 532 nm. A primeira avaliação feita foi em relação ao tempo de atraso do espectrômetro para a aquisição de um bom sinal das linhas discretas de emissão, de modo geral no intervalo espectral do visível. Para esta análise, a energia do laser foi mantida constante em torno de 50 mJ (irradiância de $2 \cdot 10^{13} \text{ W/cm}^2$), o intervalo de aquisição foi fixado em 10 μs e, os tempos de atraso do espectrômetro variaram de 600 a 3000 ns da seguinte maneira: 600, 800, 1000, 1500, 2000, e 3000 ns. Feito isso, foi possível notar que as áreas das linhas de emissão avaliadas, de Ca e Mg (que foram usadas como parâmetro nessa avaliação por estarem presentes com certeza em amostras desse tipo -folhas de soja- e por permitirem a avaliação de mais de um pico de emissão), eram grandes no início e decaíam com o aumento do intervalo, conforme esperado durante o resfriamento do plasma (Figura 26a). Um pequeno intervalo contendo picos de Ca, de relativa baixa intensidade, é mostrado na Figura 26b, e nela fica claro o comportamento do espectro a tempos de atraso muito baixos, com uma emissão de fundo ainda muito pronunciada, devido à alta temperatura do plasma e as emissões de corpo negro, evidenciando pouco as linhas de emissão atômicas e iônicas. Tal fato fica melhor ilustrado no gráfico da Figura 26c. Assim, valores de atraso superiores a 800 ns demonstraram ser bons para análise, porém, considerando a presença das emissões de fundo, ou seja, uma melhor relação sinal/linha base calculada a partir do espectro médio, observa-se que o atraso ótimo se dá em 1000 ns. A partir daí, é possível notar nos três gráficos uma redução grande na intensidade das linhas de emissão discretas, as quais temos interesse, o que poderia prejudicar as avaliações.

Além disso, foi calculada a temperatura de cada espectro medido e, a partir da média das temperaturas para cada caso, analisamos como esta evoluiu para os diferentes atrasos do espectrômetro (Figura 26d). A partir das temperaturas foi possível ainda confirmar o comportamento discutido anteriormente, de modo que o perfil da temperatura acompanha as Figura 26a e 26c. Vale ressaltar, que para tempos muito curtos de atraso do espectrômetro, inferiores a 1000 ns, efeitos de blindagem do plasma pela formação de ondas de choque são bastante importantes o que torna coerente o aquecimento do plasma encontrado entre 600 e

1000 ns. Tempos de atraso maiores mostram o rápido resfriamento do plasma formado, como apontado pelo gráfico d) da Figura 26.

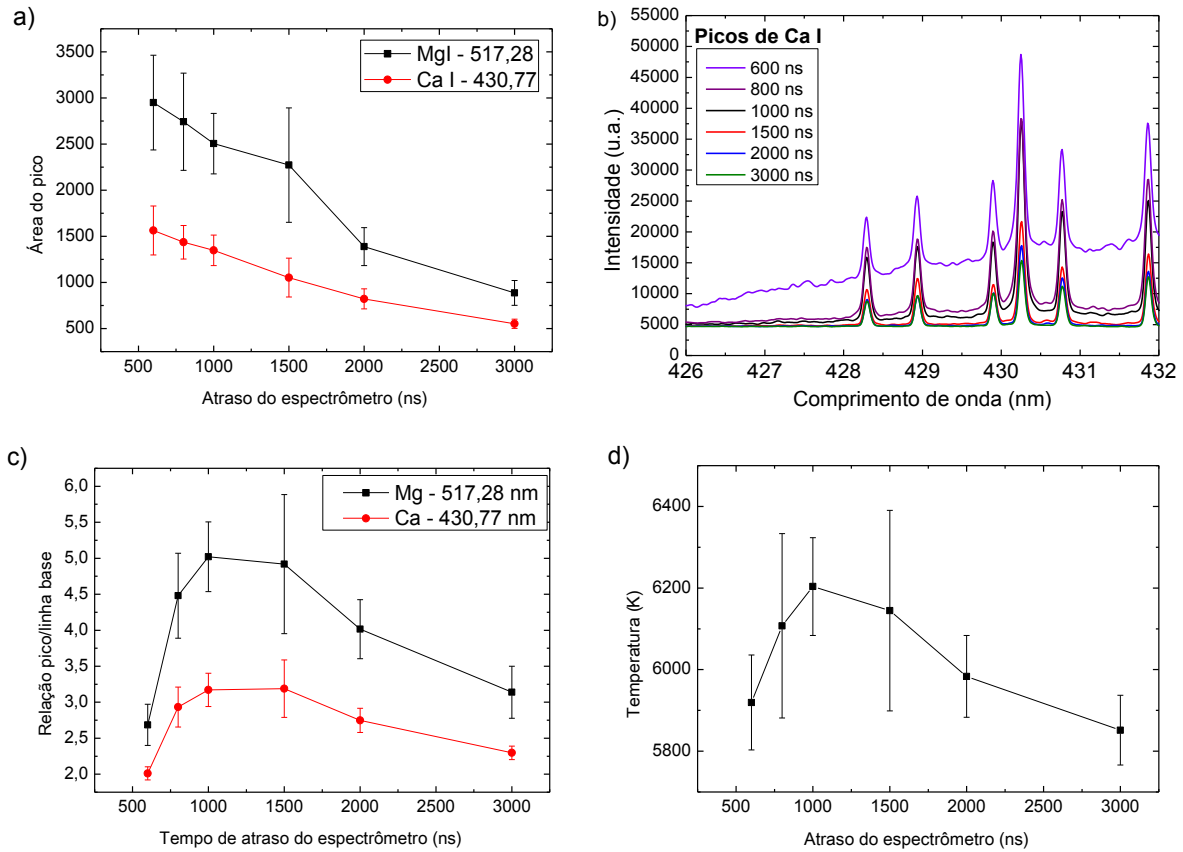


Figura 26 – Área dos picos avaliados em função dos diferentes atrasos do espectrômetro testados (a) e, gráfico dos espectros (b) contendo picos de Ca, em que pode ser observado o comportamento e evolução do mesmo de acordo com os tempos de atraso. O gráfico (c) apresenta a razão pico/linha base para os casos do Ca e Mg. E em (d) tem-se o gráfico da temperatura média em função dos atrasos do espectrômetro testados durante as medidas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Dessa maneira, obtido um valor de temperatura razoável no tempo de atraso do espectrômetro de 1000 ns, com um bom sinal de emissão e ruído de fundo reduzido, este foi o tempo de atraso considerado ótimo para as medidas. Por fim, a densidade de elétrons foi calculada a partir da equação de Saha-Boltzmann para este caso ($5,6 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-3}$), e na sequência, aplicado o critério de McWhirter para as transições do Ca em 430,77 nm e do Mg em 517,27 nm, linhas que estão sendo usadas como parâmetro de avaliação durante a otimização do sistema. O valor mínimo de densidade de elétrons obtido a partir da condição estabelecida pelo critério foi de $3 \cdot 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ para o Ca e $1,7 \cdot 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ para o Mg, ou seja, a densidade de elétrons encontrada no plasma não atingiu a mínima densidade necessária para o estabelecimento da

condição de LTE apontada pelo critério, e, portanto, dificultando análises quantitativas a partir destas medidas.

Fixando o valor de atraso do espectrômetro em 1000 ns, 5 pulsos acumulados e o tamanho da janela de aquisição em 10 μ s, agora os valores de energia do laser foram variados de 40 (irradiância de aproximadamente $1,8 \cdot 10^{13}$ W/cm²) a 90 mJ ($4,0 \cdot 10^{13}$ W/cm²), em passos de 10 mJ. Como anteriormente, verificamos o comportamento dos espectros a partir da média das áreas dos mesmos picos de Ca e Mg para cada caso, bem como a razão da intensidade desses picos pela linha de base próxima a eles (Figura 27a e b).

Nesta avaliação, o comportamento da intensidade do espectro não ocorreu exatamente conforme esperado, já que, com o aumento de energia, esperava-se que houvesse aumento de massa ablacionada, bem como aumento da intensidade do sinal, o que se manteve praticamente sem alterações significativas, considerando o desvio padrão da média. Além disso, analisando as razões de intensidade e linha base, o aumento da energia também não resultou em um padrão de aumento das razões, que evidenciariam uma melhora na intensidade do sinal LIBS.

Em relação à temperatura calculada a partir do gráfico de Boltzmann para cada caso, também não houveram alterações, e esta oscilou apenas 200 K para as diferentes energias por pulso, o que pode ser observado no gráfico da Figura 27c. Para esta etapa da otimização a densidade de elétrons do plasma foi calculada para todas as energias avaliadas, já que os demais parâmetros não foram conclusivos para a determinação da melhor energia por pulso a ser adotada como ótima. Dessa maneira, a Figura 27d ilustra os valores de densidade de elétrons para cada caso, bem como a densidade mínima de elétrons a ser atingida para o estabelecimento de LTE segundo o critério de McWhirter. Através da análise do gráfico foi possível concluir que não houve grandes alterações relacionadas à densidade de elétrons com o aumento da energia fornecida por pulso, e que o critério não foi atendido para nenhuma das transições estudadas, em nenhuma das energias avaliadas.

Uma possível justificativa para a falta de variação do sinal com o aumento da energia do laser pode estar relacionada à estabilidade do sinal no limite para altas energias, o que limita consequentemente, os valores de temperatura e densidade de elétrons. Nessa situação, maior energia pode resultar em maior densidade de elétrons no início da ablação e, portanto, blindagem do plasma, o que pode não resultar em aumento do sinal. Assim, efeitos não lineares e a ocorrência de um plasma não opticamente fino podem ser favorecidos a energias muito altas.

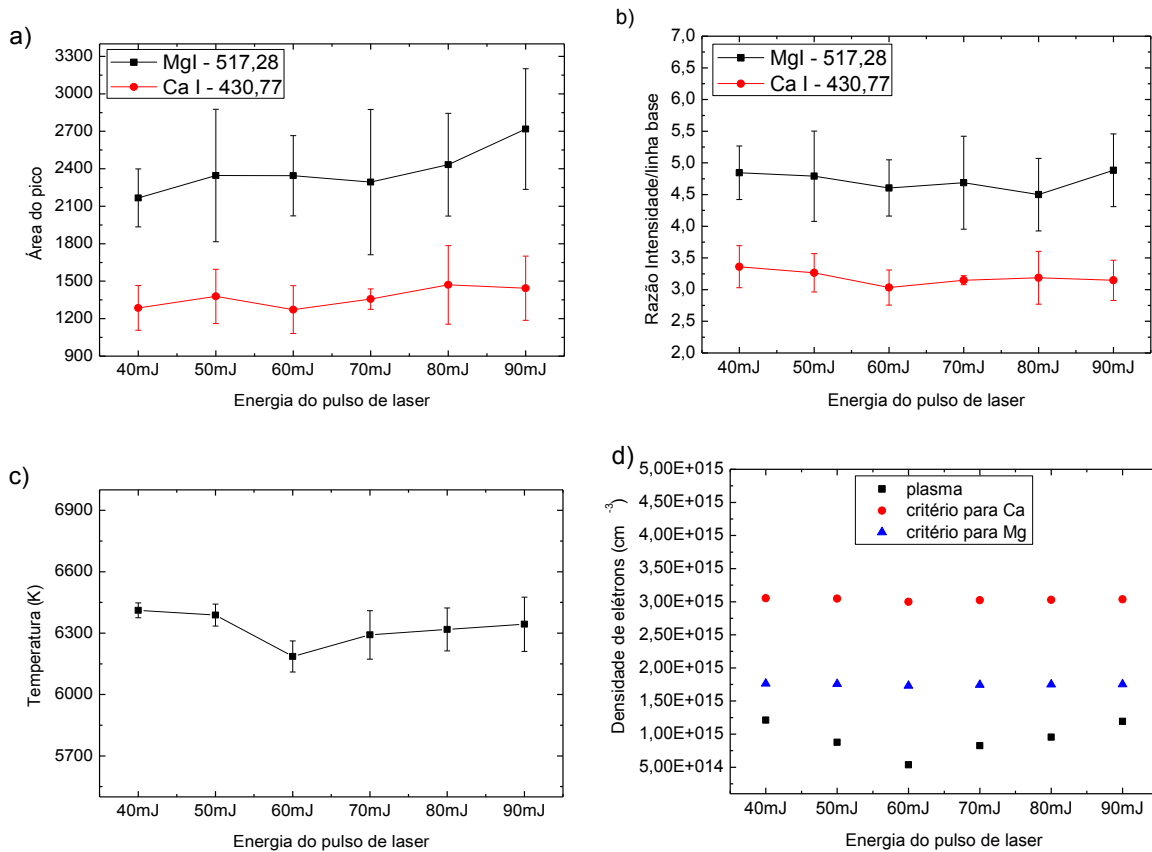


Figura 27 – Evolução das áreas dos picos de Ca e Mg em função da energia do pulso de excitação (a) e em (b) tem-se a evolução das razões de Intensidade do pico, pela linha de base próxima a ele também em função das variações de energia do pulso de laser de excitação. temperatura do plasma de acordo com as diversas energias do laser.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir desta avaliação, adotamos uma energia intermediária como ótima, em torno de 60 mJ ($2,7 \cdot 10^{13} \text{ W/cm}^2$), já que o próximo passo será a comparação deste (SP LIBS) com o sistema operando no modo DP LIBS. Assim, para uma comparação equânime, a irradiância fornecida durante a análise deve ser aproximadamente a mesma nos dois casos, de modo que a variável que exista entre ambos seja apenas a forma de ablação proporcionada por um ou dois pulsos.

Por fim, a última análise relacionada à otimização do SP LIBS envolveu a investigação da melhor duração do intervalo de aquisição para obtenção do melhor sinal. Para isso, o atraso do espectrômetro foi mantido em 1000 ns, a energia do pulso fixada em torno de 60 mJ e a janela de aquisição variou de 1 a 20 μs . A partir da avaliação dos valores de área dos picos de Ca e Mg notou-se um comportamento crescente das médias destas com o aumento do tamanho da janela de aquisição até 10 μs mantendo-se estável a 15 μs , e decaindo para intervalos maiores (Figura 28a). Ao avaliar os espectros, com exceção dos intervalos muito curtos, de 1 e 3 μs que possuem baixas intensidades, os demais não apresentaram grandes variações em média,

conforme visto na Figura 28b, que mostra dois picos de Mg I, em 516,732 e 517,268 nm, corroborando com a tendência dos valores de área obtidos em (a), considerando as barras de erro.

Quanto à temperatura de excitação do plasma (Figura 28c), também calculada a partir dos picos de Ca citados anteriormente, notou-se uma variação de aproximadamente 400 K, porém a oscilação ocorreu dentro das barras de desvio da média. Conforme o intervalo da aquisição aumenta, aumenta também o tempo de interação e de vida do plasma que é considerado na medida, de modo que este continua a evoluir, ou seja, expandir e resfriar durante o intervalo da aquisição. Dessa maneira, era esperado encontrar uma curva melhor definida de decaimento da temperatura conforme a duração da janela de aquisição aumenta. A Figura 28d mostra a evolução da densidade de elétrons de acordo com o tamanho da janela de aquisição, bem como a condição mínima de densidade que deveria ser alcançada para possibilitar LTE e permitir análises não apenas qualitativas, mas também quantitativas dos dados LIBS para o caso do Ca e Mg. Em relação ao Ca, densidade mínima de elétrons não foi alcançada para nenhuma das situações propostas nesta otimização. Já para o Mg, as janelas de 5 e 10 μs alcançaram densidades muito próximas à desejada e, para 15 μs a densidade mínima de elétrons foi superada com êxito, possibilitando existência de LTE.

Considerando, portanto, uma melhora no sinal obtido, verificada pelos valores de área (Figura 28a) e intensidade dos picos (Figura 28b), e ainda os valores de densidade calculados, a largura de 10 μs foi considerada ótima para as medidas. O limiar dos 15 μs não foi escolhido porque estudos apontam que janelas grandes de aquisição podem proporcionar problemas relacionados a interações no plasma, não possibilitando a assunção de que este seja opticamente fino devido a condições experimentais. Assim, com boas condições de sinal em 10 μs , ficou decidido seguir com este parâmetro.

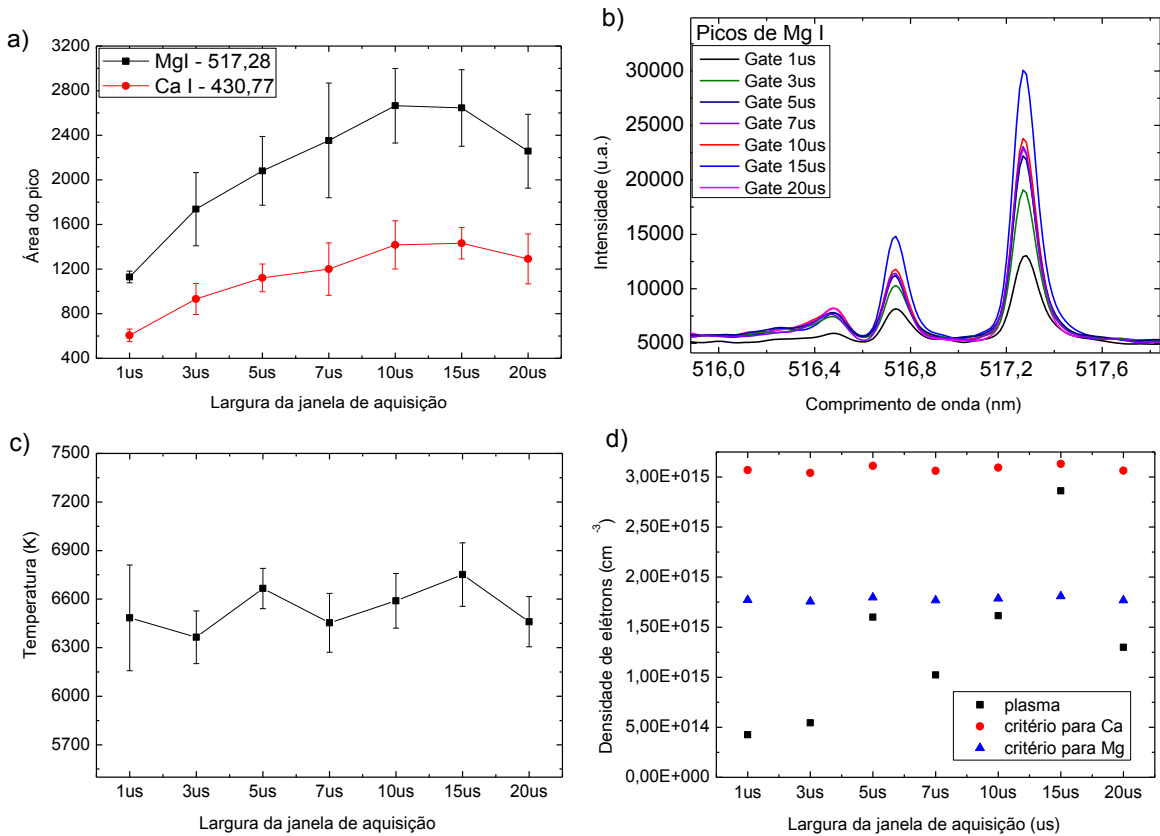


Figura 28 – Variação da área dos picos de Ca e Mg em função do intervalo de aquisição do sinal LIBS (a), perfil de um intervalo do espectro LIBS contendo picos de Mg I para cada intervalo de aquisição avaliado (b), variação da temperatura (c) e densidade de elétrons (d) com a largura da janela de aquisição. Fonte: Elaborada pela autora.

5.5 Otimização de parâmetros: DP LIBS Colinear

Para otimização do sistema DP LIBS operando no modo colinear foi fixado o tamanho da janela de aquisição em 10 μs , a energia do laser de 532 nm em 50 mJ e a energia do laser em 1064 nm nos mesmos 50 mJ. A partir daí, para três diferentes tempos de atraso do espectrômetro (250, 500 e 750 ns), variou-se o tempo de atraso entre os pulsos da seguinte forma: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 e 2500 ns. Feito isso, através das áreas de uma linha de Ca (Figura 29a) e de uma linha de Mg (Figura 29b), as mesmas do estudo de otimização SP LIBS, observou-se as variações com as mudanças de tempos de atraso. Por meio dos gráficos (a) e (b) da Figura 29 observou-se que 500 ns é o tempo de atraso entre os pulsos ideal, e que os maiores valores de área foram conseguidos utilizando o atraso do espectrômetro em 250 ns. Porém observando os espectros em (c), é possível notar que para este atraso do espectrômetro tem-se uma baixa relação sinal/ruído, já que as emissões de fundo ainda são muito intensas. E ainda que, para o caso do atraso do espectrômetro em 750 ns há uma perda considerável de intensidade dos picos se comparada com o tempo de 500 ns.

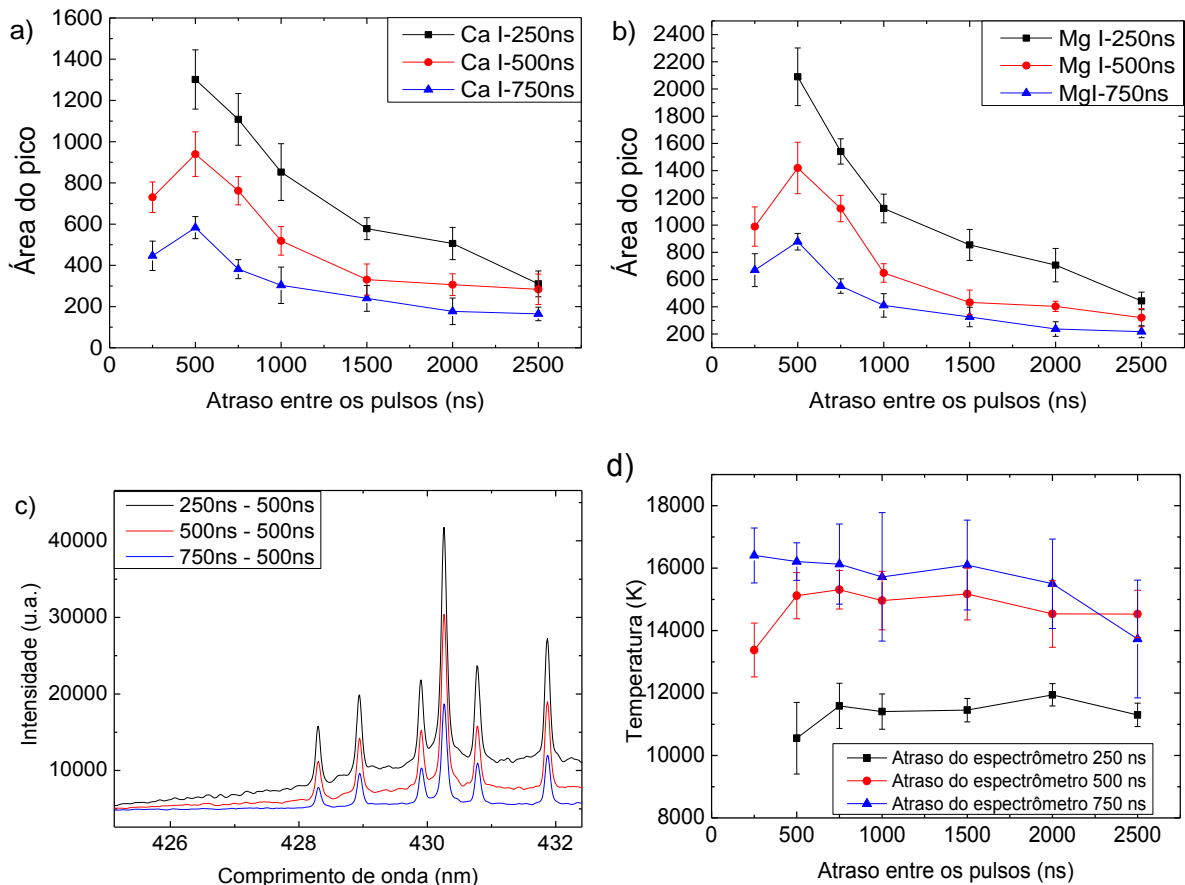


Figura 29 – Variações nas áreas dos picos de Ca (a) e Mg (b) de acordo com os diferentes atrasos do espectrômetro (250 ns – preto, 500 ns – vermelho, 750 ns – azul) e diferentes tempos de atraso entre os pulsos. Em (c) é mostrado uma parte do espectro que contém linhas de Ca para valores de atraso entre os pulsos fixos em 500 ns e três diferentes tempos de atraso do espectrômetro. O gráfico em (d) mostra como ocorre a variação de temperatura, calculada a partir do gráfico de Boltzmann, para todos os tempos de atraso avaliados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para 500 ns e 750 ns de atraso do espectrômetro foi possível avaliar o caso do atraso entre os pulsos de 250 ns, e observar que, a área dos picos estudados, se apresentou menor do que para o tempo de atraso entre os pulsos de 500 ns. Uma possível justificativa para tal constatação pode estar ligada aos próprios mecanismos que descrevem a absorção de energia do laser a partir da dinâmica de expansão do plasma. A tempos curtos de atraso entre os pulsos o efeito de blindagem do plasma ocorre, reduzindo a interação do segundo laser com a amostra. Para tempos de atraso entre os pulsos um pouco maiores, a densidade da pré-pluma do plasma já foi reduzida, já que a onda de choque avançou, expandiu e tornou o ambiente logo atrás dela mais rarefeito e permissivo para interação com o segundo pulso. Este, além de interagir com o pré-plasma, consegue ainda interagir com a própria amostra, ablando mais material, e por consequência, melhorando o sinal aquisitionado.

A temperatura do plasma calculada a partir dos picos de Ca I, mostram um comportamento similar para 250 e 500 ns, sendo em média, a temperatura do plasma a 500 ns de atraso entre os pulsos, maior para o caso do atraso do espectrômetro também em 500 ns. Para o tempo de atraso do espectrômetro em 250 ns era esperada uma temperatura de plasma maior do que os demais casos, porém não foi o que se constatou a partir do cálculo da temperatura. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que as emissões de fundo ainda estão pronunciadas no espectro, dificultando a obtenção correta dos valores de área dos picos utilizados para o cálculo da temperatura, como pode ser observado na Figura 29d. Dessa maneira, a combinação de tempos considerados ótimos para medidas DP LIBS colinear em amostras de plantas foi: 500 ns de atraso do espectrômetro e 500 ns de atraso entre os pulsos.

Vale ressaltar ainda que, para a combinação ideal de tempos estabelecida, foi calculada a densidade de elétrons a partir da temperatura média ($3,98 \cdot 10^{19} \text{ cm}^{-3}$) e também a densidade de elétrons mínima requerida para que possa existir LTE para o Ca e Mg por meio do critério de McWhirter, que foi de $4,7 \cdot 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ e $2,7 \cdot 10^{15} \text{ cm}^{-3}$. Ou seja, a partir das medidas com o sistema DP LIBS colinear foi possível atingir melhores condições físicas do plasma para que este seja analisado com maior rigor, possibilitando análises quantitativas de amostras, chance esta que foi eliminada pelas condições estabelecidas pelo critério de McWhirter no caso das avaliações dos espectros SP LIBS adquiridos.

5.6 Comparação: SP LIBS x DP LIBS colinear

Para a comparação SP e DP LIBS, a densidade de potência total fornecida pelos lasers para vaporização e excitação da amostra durante a análise foi mantida da ordem de 10^{13} W/cm^2 , de modo que, a diferença entre as duas medidas fosse apenas a forma como a energia total chegaria à amostra. Assim, para o caso do SP LIBS o laser em 532 nm foi usado para excitação, e o atraso do espectrômetro e o tamanho da janela de aquisição foi estabelecido de acordo com a análise anterior, sendo respectivamente 1000 ns e 10 μs . Para a medida DP LIBS colinear, o laser que primeiro atingiu a amostra foi o de 532 nm e, em seguida o de 1064 nm, e utilizou-se o atraso do espectrômetro e o atraso entre os pulsos em 500 ns. A janela de aquisição foi fixada em 10 μs . Para cada um dos modos de operação do sistema, foram feitas 30 medidas em uma amostra de folhas de soja sadias pastilhadas.

As médias dos espectros evidenciaram picos de emissão de elementos presentes na amostra, e através deles foi possível notar a significativa melhora do sinal de emissão LIBS, que apresentaram um aumento de até 400% na intensidade (Figura 30). É importante notar que

os cálculos de porcentagem de aumento foram feitos descontando a linha de base dos picos abaixo, que são ilustrativos já que não estão com a linha de base corrigida.

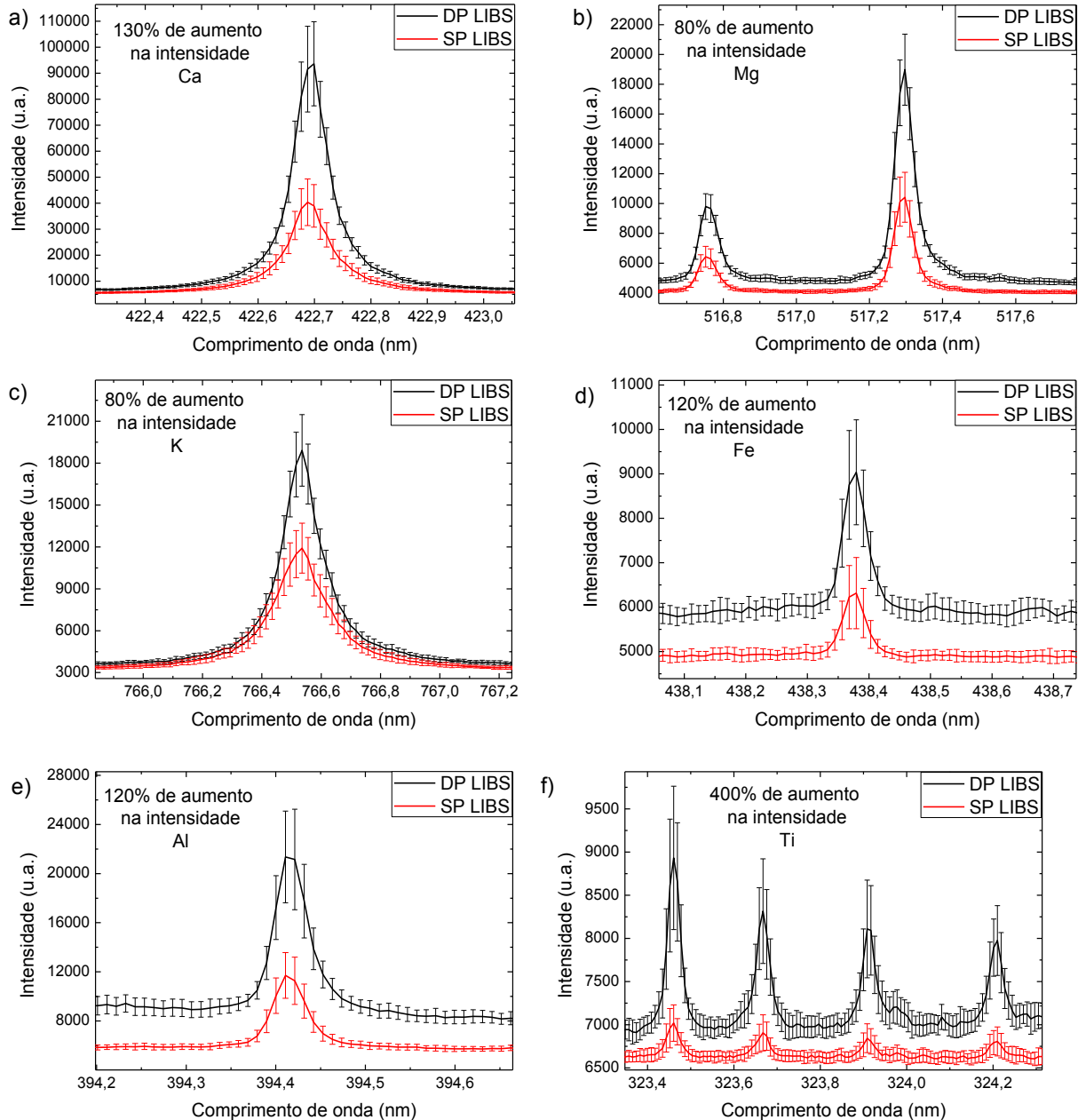


Figura 30 – Comparação das intensidades dos picos de emissão do Ca (a), Mg (b), K (c), Fe (d), Al (e) e Ti (f) presentes no espectro LIBS a partir das medidas SP e DP LIBS. Foram notados aumentos de intensidade de até 400% nas linhas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Além da avaliação dos espectros, foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura nas crateras formadas a partir da medida LIBS nos dois modos de operação do sistema (Figura 31). A partir delas pode-se observar que a quantidade de matéria removida e

vaporizada pelo modo de operação DP LIBS é maior quando comparado com a imagem da cratera provocada pela medida SP LIBS.

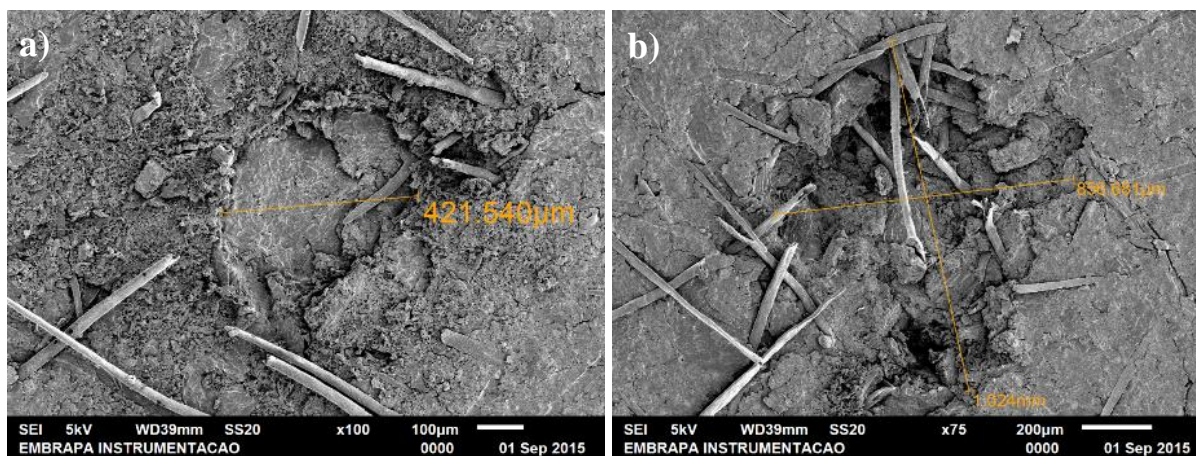


Figura 31 – Microscopia eletrônica de varredura de uma pastilha de folhas de soja secas e moídas manualmente após uma medida com 3 pulsos acumulados SP LIBS (a) e DP LIBS colinear (b). O diâmetro aproximado da cratera em (a) foi de 422 µm, e da cratera em (b), foi em média 940 µm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com isso, podemos inferir que a melhora no sinal observado anteriormente está relacionada, dentre outros fatores, à quantidade de matéria ablacionada e analisada durante a medida. Um aumento da quantidade de material ablacionado resulta em maior temperatura e densidade de elétrons no plasma, proporcionando condições adequadas de estudo no que diz respeito à possível existência de LTE no meio, permitindo avaliações quantitativas a partir das medidas LIBS. Além disso, como a medida DP LIBS colinear abrange uma área maior da amostra, contribui ainda para uma melhor homogeneidade e representatividade da mesma.

5.7 Nova configuração: DP LIBS Ortogonal modo aquecimento

Após a implementação e análises a partir do sistema LIBS colinear, estudos demonstrando a possibilidade de obtenção de um sinal LIBS superior motivaram esforços para implementação do sistema operando na configuração ortogonal. Essa nova geometria do sistema possibilita análises também do tipo DP LIBS, porém com energias de excitação reduzidas. Assim, foi conduzido um estudo sobre os parâmetros do sistema que pudessem ser otimizados para as medidas de amostras de plantas. Neste trabalho, foram avaliados os resultados obtidos para amostras de folhas de soja pastilhadas.

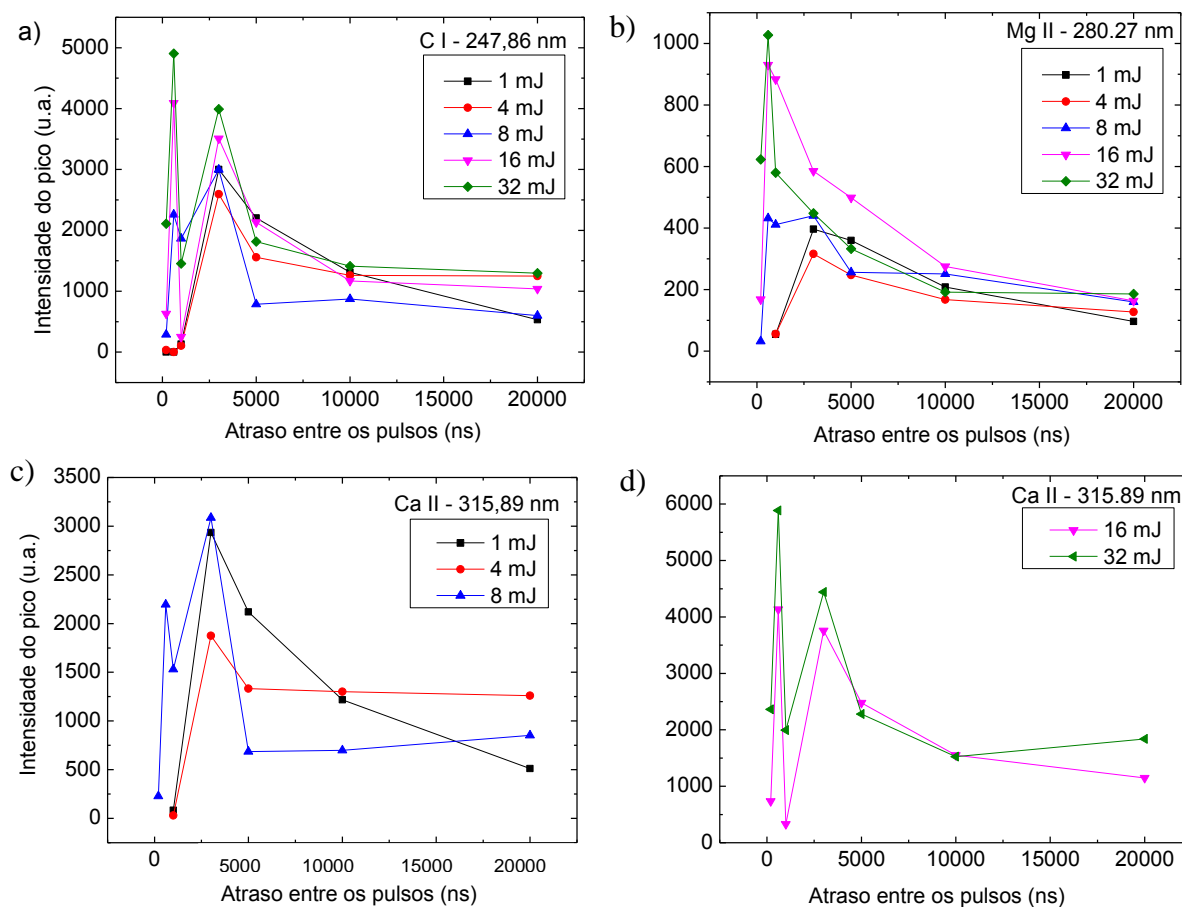


Figura 32 – Gráficos da intensidade dos picos de C I e Ca II em função do tempo de atraso entre os pulsos para cinco diferentes energias de excitação do primeiro laser na medida DP LIBS ortogonal (a). E em (b), o mesmo gráfico anterior para o caso do Ca II, separado de acordo com os regimes de baixa ou alta energia do laser 1 de medida, evidenciando a diferença de comportamento.

Fonte: Elaborada pela autora.

A otimização das medidas com o sistema operando na configuração ortogonal envolveu a avaliação de diferentes energias de excitação do laser de ablação da amostra em 532 nm (1, 4, 8, 16 e 32 mJ), irradiâncias respectivamente de $4 \cdot 10^{11}$, $2 \cdot 10^{12}$, $4 \cdot 10^{12}$, $7 \cdot 10^{12}$ e $1 \cdot 10^{13}$ W/cm² aproximadamente, e diferentes atrasos entre os pulsos para cada energia (200, 600, 1000, 3000, 5000, 10000 e 20000 ns) mantendo fixos o atraso do espectrômetro em 1000 ns e a energia do laser de aquecimento do plasma (1064 nm) em 50 mJ. Ao observar a intensidade de dois picos de emissão (obtidos a partir do ajuste Lorentziano após a correção da linha de base e que possuem comportamento comparável às áreas dos picos utilizadas no estudo anterior) sendo um atômico e um iônico, C I e Mg II (Figura 32a e 32b), em função das diferentes energias e diferentes atrasos entre pulsos, notou-se que havia certa tendência de comportamento distinta para as curvas com baixas e altas energias de excitação. Para facilitar a visualização, para um pico de Ca II, os gráficos foram separados de acordo com as energias de excitação com comportamentos mais similares, ou seja, 1, 4 e 8 mJ (Figura 32c), e 16 e 32 mJ (Figura 32d), e

através deles foi possível inferir que, para regimes utilizando baixas energias de excitação, o melhor tempo de atraso entre os pulsos seria 3000 ns, e para medidas utilizando altas energias seria 600 ou 3000 ns (Figura 32c e 32d).

Uma possível explicação para o melhoramento de sinal utilizando esta configuração pode estar baseada na presença das ondas de choque e na dinâmica de expansão da pluma do plasma no ambiente. Para grandes tempos de atraso, maiores do que 3000 ns, é observada a diminuição do sinal pois o segundo pulso encontra um plasma de densidade reduzida devido à expansão deste no ambiente, o que diminui a absorção e interação do segundo pulso com o pré-plasma formado.

Baixas energias demonstram ser suficientes para vaporizar o material e produzir um plasma pouco denso, mas não são suficientes para resultar no processo de blindagem, e então, para tempos de atraso entre os pulsos inferiores a 3000 ns, quando o segundo pulso atinge o material vaporizado, o processo de absorção via inverso de *Bremsstrahlung* pode se tornar significativo, contribuindo para o aumento do sinal até o tempo ótimo de 3000ns. (68)

Quando a densidade de energia de excitação aumenta (regime de alta energia), as características de expansão do plasma mudam, é produzido um plasma relativamente mais denso, que favorece os processos de blindagem. Então, logo que o segundo pulso é liberado (provavelmente no tempo 600 ns), as ondas de choque formadas pelo primeiro pulso dificultam o acoplamento do segundo pulso com plasma, com conseqüente reaquecimento do mesmo, que resulta em melhora do sinal. Para o tempo de 3000 ns, também observamos uma melhora do sinal, que pode ser devido ao melhor acoplamento do laser com o pré-plasma formado via inverso de *Bremsstrahlung*, como mencionamos anteriormente, proporcionando re-excitação das espécies iônicas, principalmente. A partir deste tempo, observamos apenas queda do sinal, que pode ser justificada pelo resfriamento do plasma, já que em regimes de mais altas energias, os átomos têm maior velocidade por meio da expansão adiabática, expandindo e resfriando mais rapidamente do que quando se está no regime de baixas energias. Isto pode ser observado por meio do gráfico das temperaturas calculadas para cada caso (Figura 33a), em que as cores evidenciam dois diferentes regimes de resfriamento. Para o de baixas energias, é possível notar a curva de aumento de temperatura, e não decaimento até os tempos avaliados. Já o regime de altas energias evidencia a rapidez de aquecimento e resfriamento, conforme esperado. (28)

A partir destas avaliações, demos preferência por trabalhar no regime de altas energias, ao invés de trabalhar no limiar de baixas energias, já que para este tipo de análise não estamos tão preocupados com os danos à amostra, o que seria algo a se pensar caso estivéssemos trabalhando com análises em plantas de campo, ou outros materiais, como antiguidades.

Na Figura 33b estão representados os cálculos de densidade de elétrons para o regime de altas energias, aplicando 16 e 32 mJ de energia no primeiro pulso de ablação. O comportamento da curva corrobora com os valores encontrados para temperatura nestes mesmos regimes. As densidades de elétrons para as energias do regime de baixa energia também foram obtidas, porém não mostradas no gráfico para não comprometer a análise, e estas estavam todas em valores de densidade abaixo do que as que foram encontradas para o regime de altas energias, como esperado. A Figura 33b mostra ainda as densidades mínimas de elétrons necessárias para alcançar a possibilidade de LTE para duas transições, do Ca e Mg, estando a energia do primeiro pulso em 16 mJ. A seta em azul indica o tempo de atraso entre os pulsos para o qual a densidade de elétrons do plasma supera a densidade indicada pelo critério de McWhirter. Para o regime de 32 mJ, o critério foi atendido para ambas as transições em tempos de atraso entre os pulsos superiores a 1000 ns.

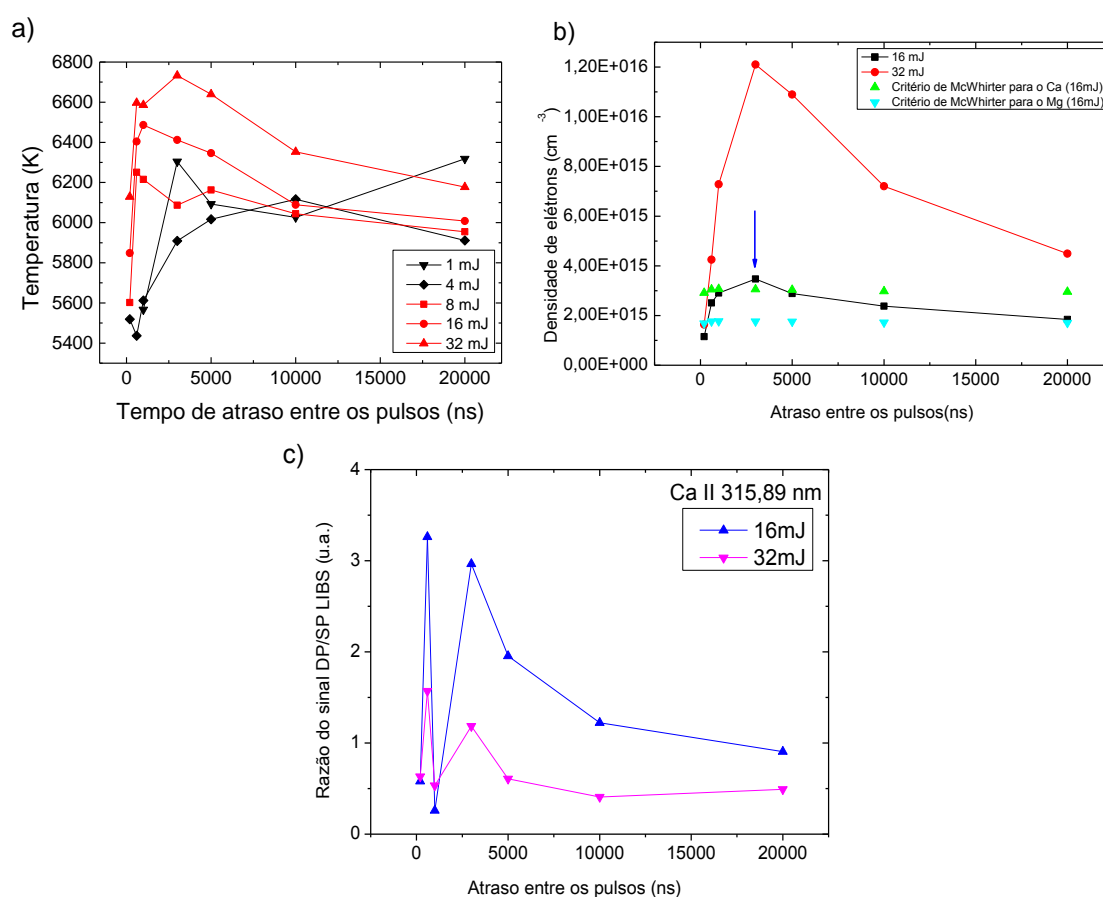


Figura 33 – Em a) temos o perfil de variação das temperaturas, calculadas pelo gráfico de Boltzmann a partir de picos de Ca, em b) a densidade de elétrons obtida para o regime de altas energias, bem como o critério de McWhirter para a energia de 16 mJ, e, em c) temos a razão entre o sinal DP/SP LIBS para um pico de Ca. Todos os gráficos em função do tempo de atraso entre os pulsos que foi variado na otimização do sistema.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, uma última análise feita comparou, para as duas maiores energias, o sinal obtido com o DP LIBS ortogonal com o sinal obtido pelo sistema operando no modo SP LIBS, este último medido a partir da mesma energia de excitação fornecida pelo primeiro laser (532 nm) durante a medida DP LIBS ortogonal (Figura 33c). Através desta análise, conseguimos visualizar a melhora do sinal LIBS devido ao reaquecimento promovido pelo segundo laser de excitação, o que é mostrado na Figura 33c. A partir daí, e juntamente com todas as análises anteriores, definimos a energia ótima em 16 mJ e o tempo de atraso ideal em 3000 ns para as análises no sistema DP LIBS operando na geometria ortogonal.

Concluída esta etapa de otimização dos parâmetros do sistema DP LIBS ortogonal é importante mencionar que os principais resultados encontrados foram publicados na revista *Microchemical Journal* em 2017, evidenciando as otimizações de medidas DP LIBS ortogonal nessa configuração para amostras agroambientais (plantas, solos, e fertilizantes). (28)

5.8 Avaliação quantitativa

Para as avaliações quantitativas, o conjunto de amostras Xingu II foi estudado. A partir das definições feitas anteriormente para otimização do sistema DP LIBS operando nas geometrias colinear e ortogonal, foram adquiridos os dados utilizados nessa etapa do trabalho. Os valores de referência das amostras em relação aos elementos investigados foram obtidos através de medidas de AAS, também mencionadas em seção anterior.

O principal objetivo desta etapa foi demonstrar se existe possibilidade de quantificação elementar por CF de uma amostra com a complexidade das amostras biológicas e agroambientais, sem grande necessidade de pré-tratamento e pré-preparo, e a partir de medidas DP LIBS, nas geometrias colinear e ortogonal, em um sistema de nanossegundos. Para isso, primeiramente foi utilizado o método mais comum de construção de curvas de calibração para tentativa de quantificação, para posteriormente estimar a quantificação através de um método novo, como o CF. Em um artigo de revisão publicado recentemente por Carvalho e colaboradores (2018), (91) foram reportados os mais recentes avanços em LIBS para análises de plantas. Neste trabalho foi citada apenas uma pesquisa em que o CF foi investigado em folhas de árvore de álamo (uma espécie de pinheiro) utilizando um sistema LIBS de femtosegundos. (105) Nele, o método não foi explorado em detalhes e os resultados obtidos foram qualitativos, demonstrando o pioneirismo desse tipo de investigação e estudo.

Previamente à aplicação de qualquer método de quantificação, como já mencionado anteriormente, faz-se importante a avaliação das condições do plasma, como ser opticamente

fino e estar em LTE para que valha as condições de ablação estequiométrica. Assim, vale ressaltar que todas as linhas de emissão selecionadas tanto para cálculos de temperatura e densidade de elétrons, quanto para as quantificações, tiveram seus perfis avaliados para assegurar a condição de que o plasma estivesse na aproximação de opticamente fino, e minimizados os efeitos indesejáveis, como auto absorção.

Os plasmas em LTE podem ser caracterizados por uma única temperatura que descreve a distribuição das espécies nos níveis de energia, a população nos estágios de ionização ou a energia cinética dos elétrons e partículas pesadas. Então, a temperatura de excitação que controla a população dos níveis atômicos (e iônicos) deve ser a mesma que a temperatura de ionização, que determina a distribuição dos átomos de um mesmo elemento nos diferentes estágios de ionização. Para verificação dessa condição de equilíbrio, primeiramente foi calculada a temperatura do plasma formado para cada amostra, a partir do espectro médio das 30 medidas LIBS obtidas, usando o método de Boltzmann. O gráfico de caixa apresentado na Figura 34 mostra a variabilidade das temperaturas calculadas para ambos os conjuntos de amostra, e separadas por classe.

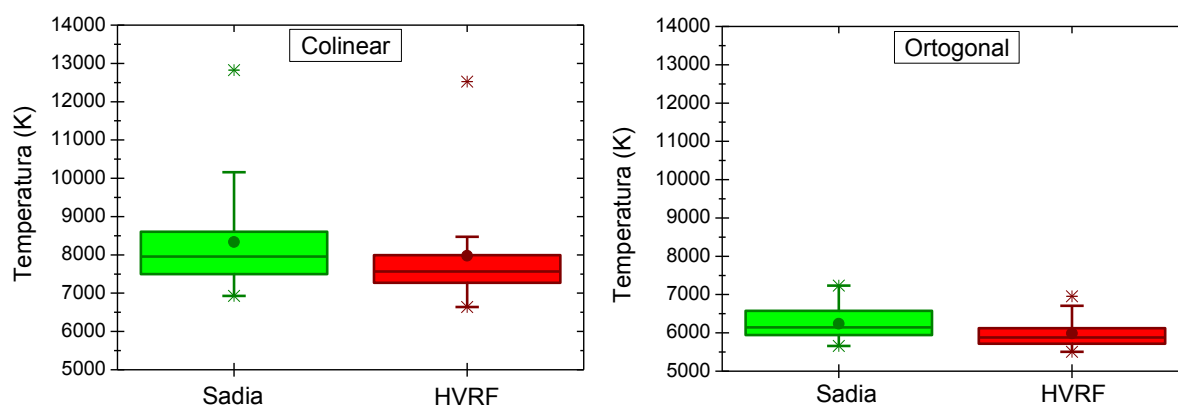


Figura 34 – Gráficos de caixa para os valores de temperatura encontrados no conjunto Xingu II avaliado por LIBS na geometria colinear (esquerda) e ortogonal (direita).

Fonte: Elaborado pela autora.

Por meio dos gráficos foi possível notar que a variabilidade da temperatura é geralmente maior para a classe sadia, o que pode ser observado graficamente pela sua distribuição em relação à classe HVRF. Este intervalo entre quartis é de cerca de 1100K e 630K para as amostras sadias, e 740K e 400K para as amostras doentes, respectivamente para os sistemas DP LIBS colinear e ortogonal. O símbolo • na Figura 34, denota o valor médio de temperatura, enquanto que a linha dentro da caixa marca a mediana. Já o símbolo * representa os percentis

1% e 99%, ou seja, os valores em que, respectivamente, 1% e 99% dos dados são menores ou iguais a ele.

Outra constatação interessante foi que, na geometria ortogonal as temperaturas alcançadas foram relativamente menores do que as obtidas para o sistema operando na geometria colinear, em média 6200 e 6000 K para o primeiro, e 8300 e 7900 K para o colinear, respectivamente para as amostras sadias e doentes. Este efeito era esperado e pode ser justificado pela menor interação do laser com a amostra quando os feixes de excitação estão perpendiculares um ao outro, do que quando comparados aos dois lasers incidindo paralelos e na direção da amostra. As diferenças entre as amostras sadias e HVRF encontradas para cada caso, em média, foram pequenas, e podem ser um reflexo das alterações de composição das matrizes.

A partir dos cálculos de temperatura, e empregando a equação de Saha-Boltzmann, foi possível determinar a densidade de elétrons do plasma formado para cada amostra. Concomitantemente, foi avaliado o critério de McWhirter para cada uma das linhas de transição dos elementos envolvidos na determinação quantitativa dos nutrientes. Assim, para simplificar e ilustrar, para cada elemento, a Figura 35 ilustra para o caso das medidas no DP LIBS colinear, o gráfico de barras representando a densidade de elétrons calculada para o plasma, e as linhas determinando a densidade mínima estipulada pelo critério, apontando se houve o atendimento ao critério para estabelecimento da condição de LTE. A Figura 35b mostra uma aproximação na região do gráfico em foram determinadas as densidades mínimas.

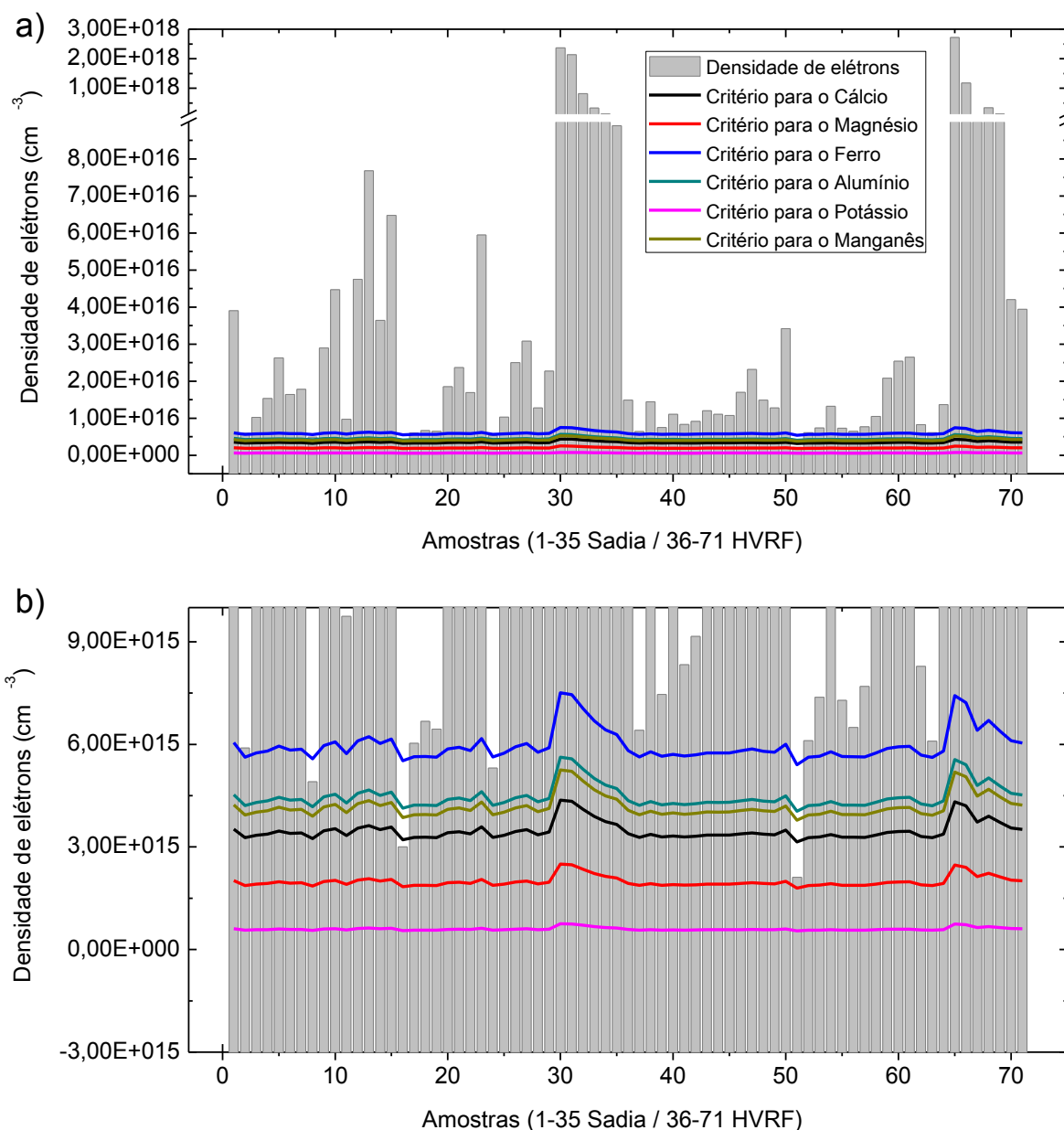


Figura 35 – Gráfico de densidade eletrônica do plasma gerado pela medida DP LIBS na geometria colinear (barra cinza) e os valores de densidade mínimos (linhas) necessários para a assunção do equilíbrio termodinâmico local do plasma, segundo o critério de McWhirter, para cada um dos elementos Al, Ca, Fe, K, Mg e Mn que serão utilizados nas próximas etapas para quantificação nutricional das amostras de folhas de soja. Em a) temos uma visão geral e em b) uma ampliação da região do gráfico que contém as densidades mínimas. A legenda em a) é a mesma para ambos os gráficos.
Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores de densidade eletrônica encontrados para o caso dos dados do sistema colinear foram da ordem de 10^{17} cm^{-3} . Ao aplicar o critério de McWhirter observamos que para o caso do K e Mg, todas as amostras satisfizeram a densidade de elétrons mínima. Para o Al, Ca e Mn, duas amostras apresentaram densidades mínimas não suficientes para assunção de LTE, e para o caso do Fe, foram 4 amostras. Observando atentamente tais amostras foi possível notar que,

apesar de ligeiramente abaixo da densidade estabelecida pelo critério, estas estavam muito próximas e, portanto, se optou por não as excluir neste momento, e prosseguir com as quantificações, a fim de verificar comportamento.

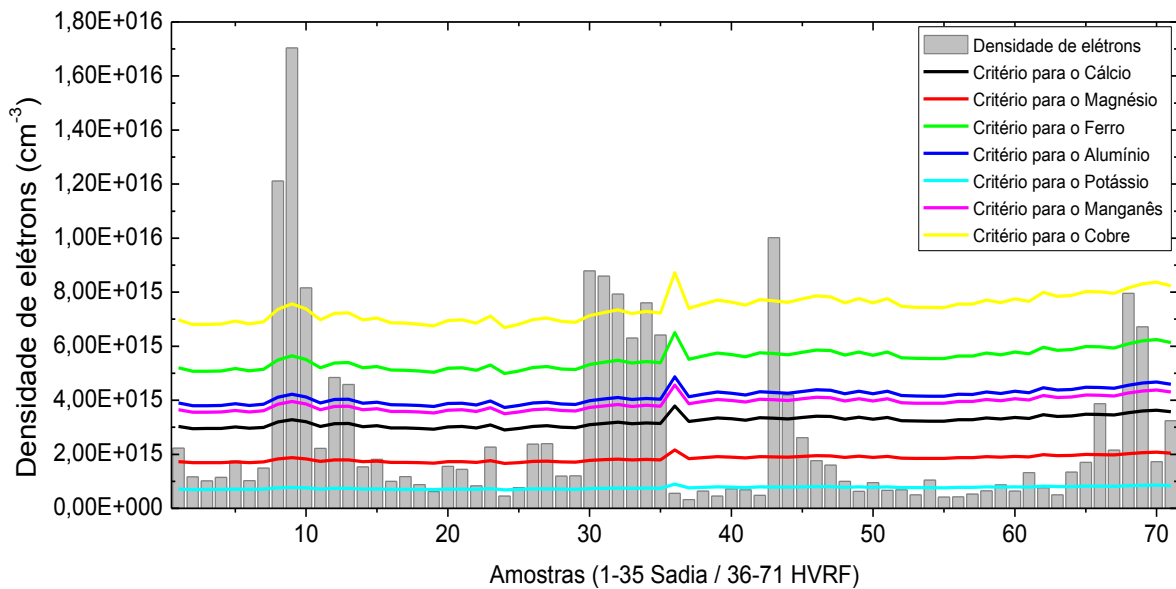


Figura 36 - Gráfico da densidade eletrônica do plasma gerado pela medida DP LIBS na geometria ortogonal modo reaquecimento (barra preta) e os valores de densidade mínimos (linhas) necessários para a assunção do equilíbrio termodinâmico local do plasma, segundo o critério de McWhirter, para cada um dos elementos Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg e Mn que serão utilizados nas próximas etapas para quantificação nutricional das amostras de folhas de soja.
Fonte: Elaborada pela autora.

Para o caso das amostras medidas pelo sistema DP LIBS operando na geometria ortogonal, a maioria das amostras não apresentaram a densidade de elétrons mínima necessária para o estabelecimento do LTE, segundo o critério de McWhirter. Assim como para a temperatura, no caso do sistema ortogonal era esperada uma densidade de elétrons menor, quando comparada à densidade obtida para o sistema na geometria colinear. Uma vez que o sistema colinear tem maior interação com a amostra e possibilita a ablação de uma quantidade maior de material, o resultado é um plasma mais denso, e cuja melhora no sinal é resultado tanto do reaquecimento do plasma quanto do maior número de emissores presentes. Porém, devido às condições de medida para ambas as geometrias do sistema, era esperado que a maioria das amostras pudessem atingir a densidade mínima necessária para considerarmos a possibilidade de existência de LTE, o que não ocorreu e pode ser observado na Figura 36.

Diante do exposto, e considerando que a faixa de densidade de elétrons encontrada foi da mesma ordem da densidade mínima exigida (entre 10^{15} e 10^{16}cm^{-3}), ficou decidido que os

próximos passos relacionados às quantificações seriam seguidos para observar os resultados finais. Essa decisão foi tomada pensando que, apesar de extremamente importante, tanto o critério utilizado quanto a própria LTE, são bastante polêmicos. Além disso, a condição de LTE na massiva maioria dos trabalhos com LIBS é apenas assumida, e nunca avaliada. Isso é feito já que se acredita que, pelas condições em que são gerados os plasmas LIBS, ao menos no início da formação do plasma, a condição é satisfeita. Além disso, alguns poucos trabalhos que realmente avaliam as condições do plasma indicam que, existem evidências de que após $1\mu\text{s}$ de formação do plasma este se encontra em LTE, condição esta que estamos usando para estas aquisições. (58,106)

5.8.1 Análise univariada

O método tradicional e mais simples de avaliação dos dados LIBS de maneira quantitativa pode ser feito através de uma análise univariada, em que o sinal de um determinado elemento pode ser diretamente comparado com a concentração do mesmo. Assim, para investigação da possibilidade de quantificação por meio de uma curva de calibração univariada, foram construídos modelos de calibração associando a área de um pico LIBS de um determinado elemento, à concentração deste obtida por AAS. Para isso, do conjunto total de amostras Xingu II, até 10% das amostras puderam ser excluídas do modelo como outliers no momento em que foram dispostas no gráfico de Área do pico *versus* Concentração, e 10% foram separadas como amostras para validação do método de maneira totalmente aleatória.

Para ambas as geometrias do sistema, houve a tentativa de determinação dos seguintes elementos: Ca, Al, Fe, K, Mg, Mn e Cu. Estes foram os elementos cujos picos de emissão foram encontrados em um espectro LIBS adquirido através da rede Echelle do espectrômetro que se encontra no Laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação em São Carlos. Os erros na tentativa de ajuste do pico, para obtenção da área do mesmo, no caso do Cu na geometria colinear, foram grandes, e dessa maneira, resolvemos não utilizar esses resultados para quantificação, nem durante a análise univariada e nem para aplicação do método CF. Isso pode ter ocorrido com os dados do sistema colinear e não com o ortogonal devido o sistema, operando no modo colinear, proporcionar plasmas de maior temperatura e, conseqüentemente, um maior sinal do contínuo, que pode estar ocultando a presença desta linha na maioria das amostras, já que trata-se de uma linha de baixa intensidade, e estarmos referindo a um elemento de baixa concentração na amostra. A intenção do trabalho era explorar ao máximo o perfil nutricional da planta de soja através da análise foliar, e por isso a decisão de

tentar trabalhar com todos eles inicialmente. Picos de emissão de microelementos como Zn, Co e Mo também foram exaustivamente procurados, mas não foram encontrados, ou não possuíam qualidade suficiente para serem inseridos nas avaliações.

A escolha das linhas de emissão de cada elemento será apresentada nas figuras a seguir. Todas as linhas encontradas no espectro foram identificadas e analisadas minuciosamente, e parâmetros como intensidade relativa, transição e coeficiente de Einstein foram levados em consideração na tentativa de eliminar efeitos indesejados e que pudessem comprometer a análise quantitativa dos modelos gerados, tais como efeitos de reabsorção da linha. A presença de dupletos e tripletos e o comportamento das transições também foram considerados no momento de determinação elementar, bem como na escolha das linhas que serão utilizadas durante a quantificação.

As Figura 37 e Figura 38 a seguir, trazem, respectivamente, para o sistema operando na geometria Colinear e Ortogonal, os gráficos das Áreas dos picos *versus* Concentração determinada por AAS. Nestes, as amostras das classes Sadia e HVRF foram representadas por símbolos e cores diferentes, de modo que pudessem ser discriminadas quanto à concentração dos diversos elementos. Nestes primeiros gráficos de avaliação, foram inclusas as amostras que serão utilizadas como validação (apenas para visualização do conjunto todo), e através deles foi possível prever quais, e como, alguns elementos estavam variando nas folhas de soja devido à doença.

Para o Al, Ca, Fe e até o Mn, aparentemente, mesmo com uma correlação direta simples, permitida pela análise univariada, foi possível observar um comportamento diferente em termos de concentração em amostras sadias e doentes. Para os demais elementos, essa correlação não ficou evidente em uma análise desse tipo, e possivelmente, será necessário envolver outros parâmetros e características do plasma e/ou espectro LIBS, e aplicação de métodos multivariados para uma avaliação mais conclusiva

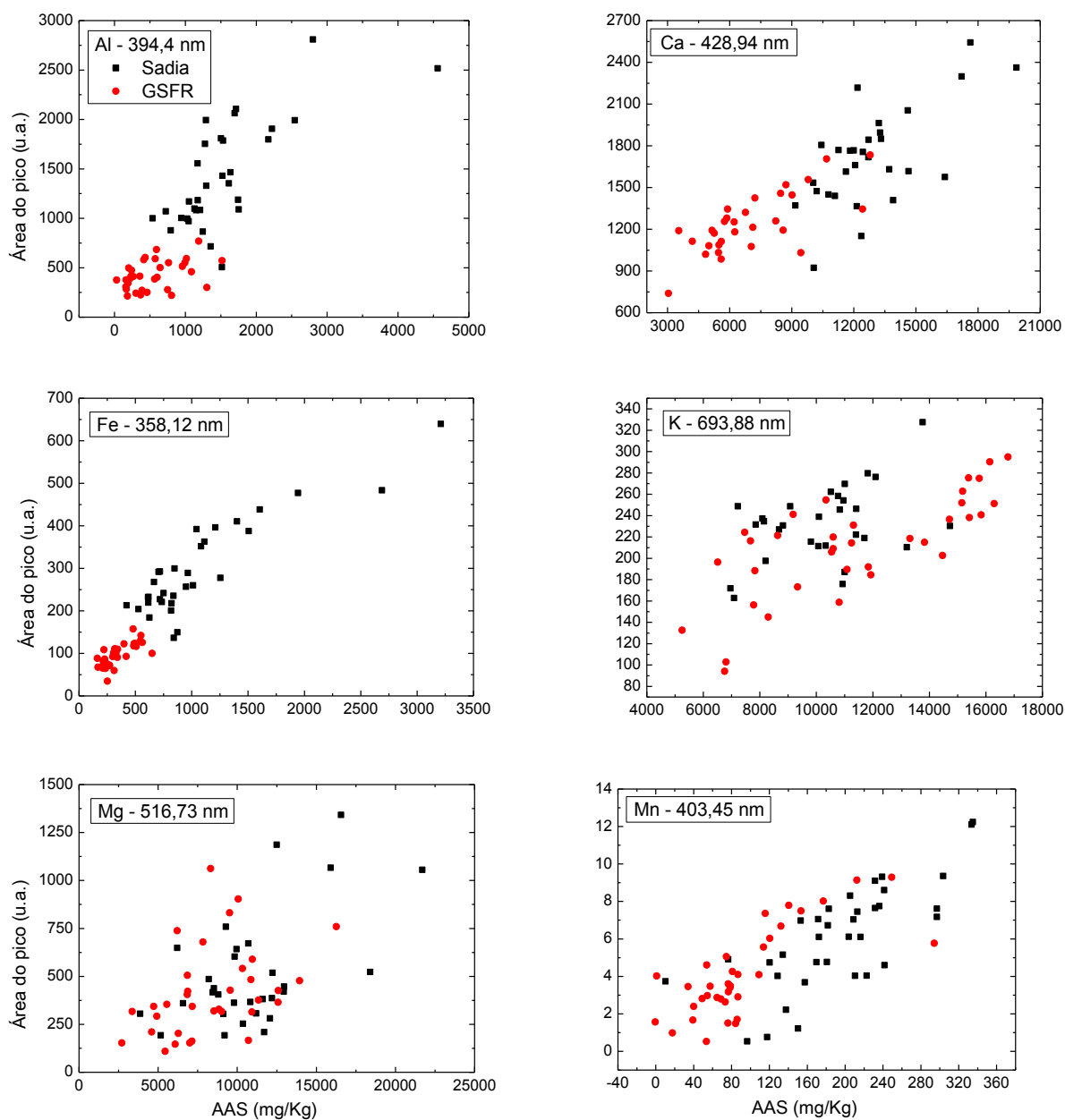


Figura 37 – Gráficos de correlação direta entre a área do pico LIBS no sistema de geometria colinear, e a concentração obtida pela medida da técnica de referência (AAS) para os elementos Al, Ca, Fe, K, Mg e Mn.

Fonte: Elaborada pela autora.

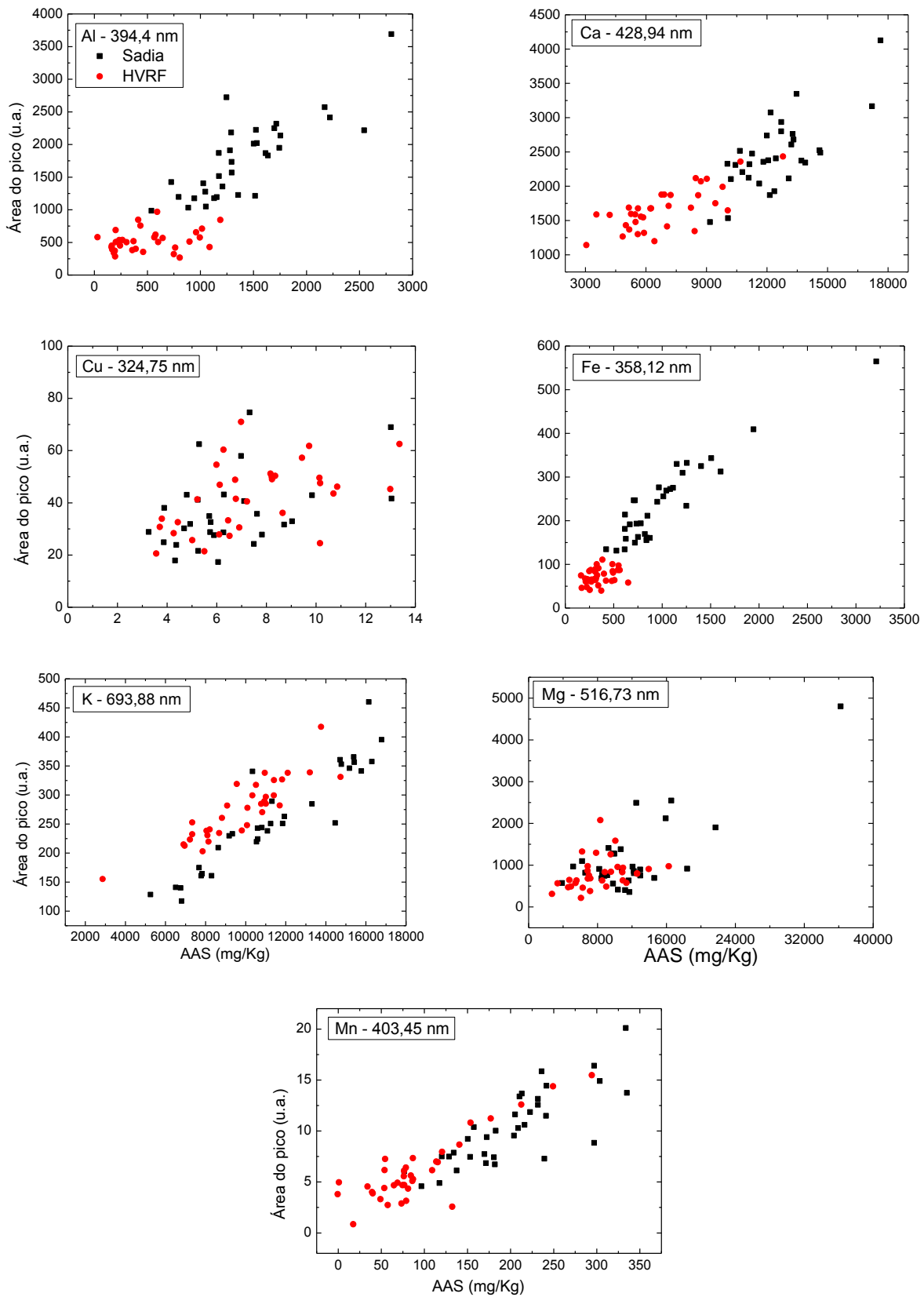


Figura 38 - Gráficos de correlação direta entre a área do pico LIBS no sistema de geometria ortogonal, e a concentração obtida pela medida da técnica de referência (AAS) para os elementos Al, Ca, Fe, K Mg e Mn.

Fonte: Elaborada pela autora.

O gráfico obtido para o Mn apresentou um comportamento ótimo de correlação entre área do pico e concentração. Foi possível notar que, para as amostras doentes, as concentrações obtidas pela técnica de referência, e área do pico, foram relativamente baixas quando comparadas com as amostras sadias pela distribuição dos dados no gráfico. Tal comportamento foi bastante positivo dada a dificuldade de se calibrar nutrientes com baixa concentração.

Na sequência serão apresentados os valores da correlação de Pearson obtidos para cada um dos modelos de calibração desenvolvidos a partir das amostras do conjunto Xingu II. Para que a parte gráfica não fique exaustiva, apenas as curvas de calibração do Fe serão apresentadas como exemplo na Figura 39, tanto para a geometria colinear, quanto para ortogonal do sistema.

Para o caso do Al as curvas obtidas apresentaram coeficiente de correlação de 0,82 e 0,89 e RMSE (raiz do erro quadrático médio, do inglês, Root Mean Square Error) 367,6 e 345,0, respectivamente para as geometrias colinear e ortogonal. Para ambos os casos 6 amostras foram aleatoriamente excluídas para a validação do modelo posteriormente. Em relação ao Ca os coeficientes de correlação de Pearson encontrados foram de 0,82 e 0,85 com desvio padrão da curva em 215,6 e 306,0, respectivamente para o sistema colinear e ortogonal. No caso do Fe as curvas foram apresentadas na Figura 39. Como para os elementos calculados anteriormente, também neste caso foram separadas 6 amostras para validação. É importante mencionar, que além de aleatórias, as amostras de validação são retiradas de modo a não deixar o sistema sadias *versus* HVRF desbalanceado, e para isso, são tomadas 3 amostras de cada uma das classes.

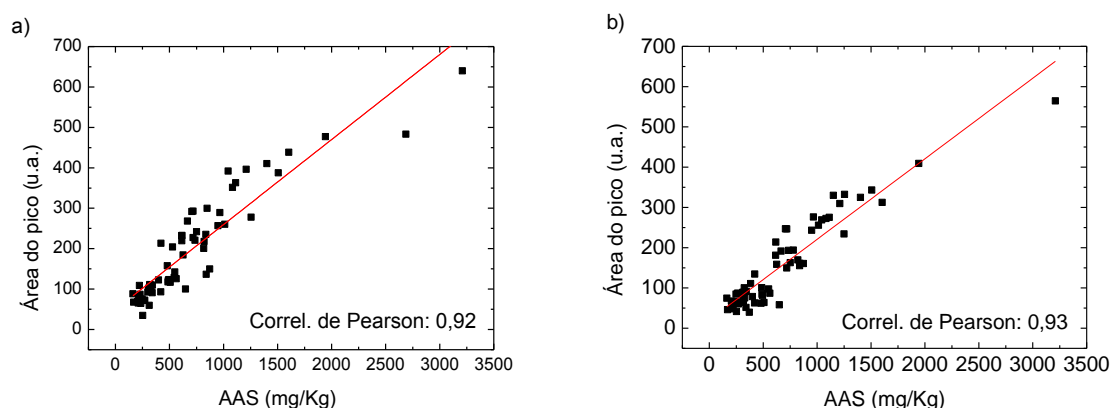


Figura 39 – Curvas de calibração geradas para o Fe. Em a) temos a curva para o sistema de geometria colinear, e em b) dados para o sistema em geometria ortogonal.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para os casos do K e Mg tivemos os piores modelos, para ambas as geometrias do sistema. Os valores do coeficiente de correlação foram 0,60 e 0,71 para o sistema colinear, e 0,85 e 0,71

para o ortogonal, respectivamente para K e Mg. Os valores de RMSE foram 35,3 e 242,8, e 52,14 e 496,7, sempre em unidades arbitrárias, e respectivamente para K e Mg, para a geometria colinear e ortogonal. Para o caso do Mn, os modelos gerados apresentaram R^2 de 0,7 e 0,8 e, RMSE de 1,48 e 1,96, respectivamente para o sistema operando na geometria colinear e ortogonal.

O último modelo univariado gerado foi para o Cu, a partir dos dados obtidos a partir do DP LIBS operando na geometria ortogonal. Para esse caso o coeficiente de correlação de Pearson foi 0,52, ou seja, apresentando baixa correlação. Ainda assim, tentamos validar a curva, já que era sabido que elementos a baixas concentrações trariam maiores desafios e dificuldades para o processo de quantificação.

Nas figuras a seguir serão apresentadas as curvas de validação dos modelos univariados gerados.

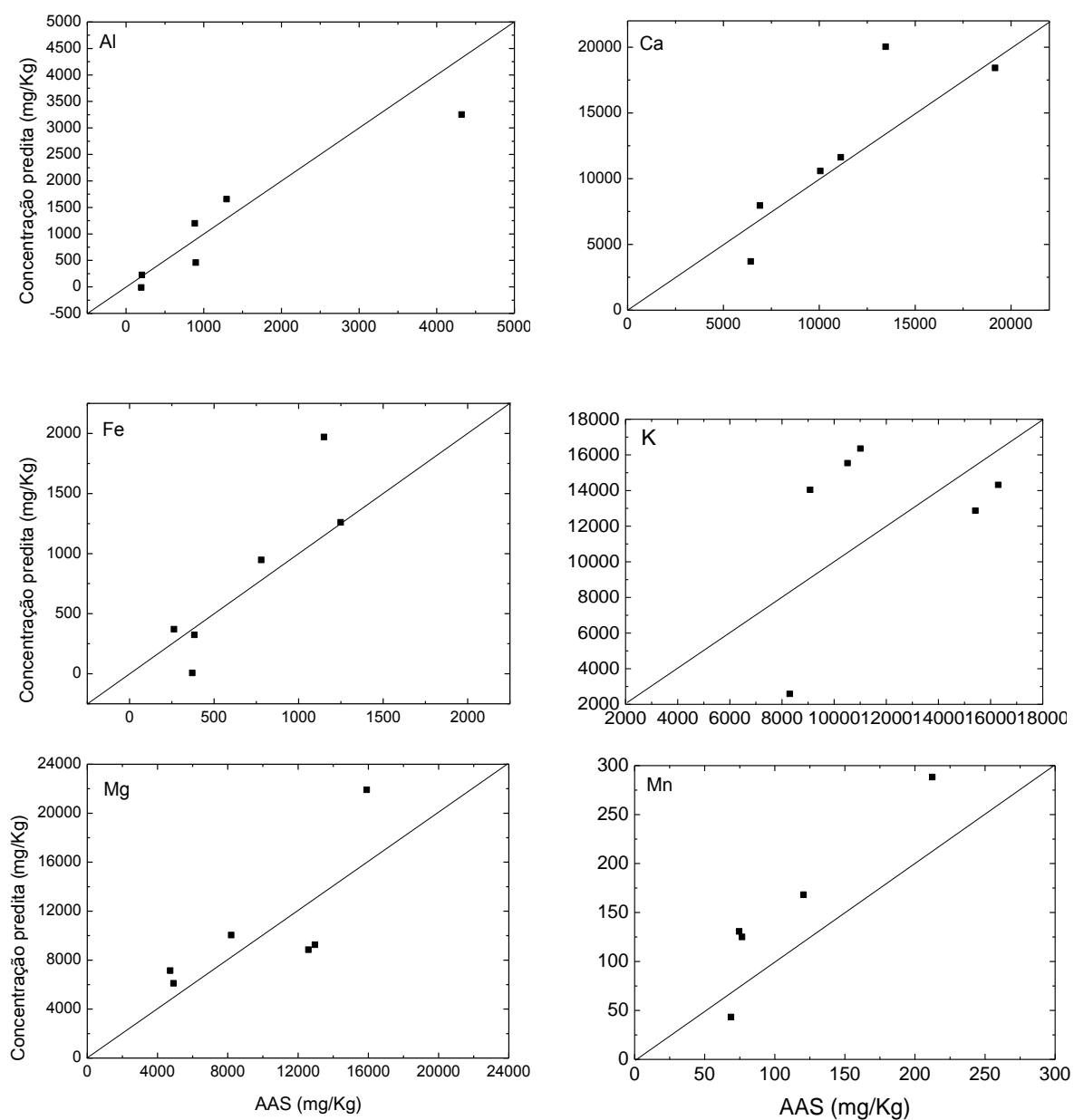


Figura 40 – Curvas de validação obtidas a partir de amostras externas para os elementos indicados e concentração predita a partir dos dados DP LIBS operando com geometria colinear.

Fonte: Elaborada pela autora.

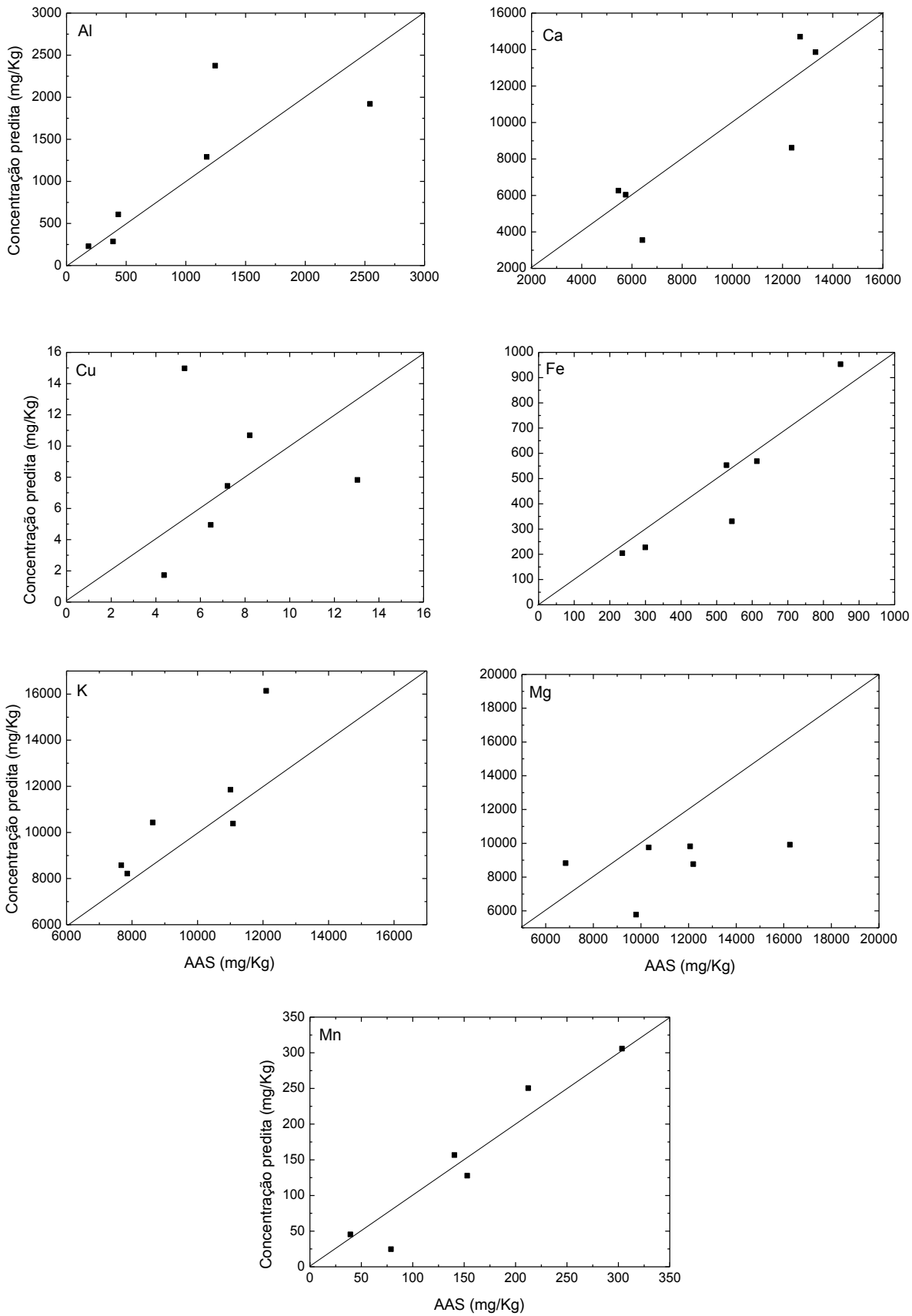


Figura 41 - Curvas de validação obtidas a partir de amostras externas para os elementos indicados e concentração predita a partir dos dados DP LIBS operando com geometria ortogonal.
 Fonte: Elaborada pela autora.

Tanto os resultados obtidos pelo sistema de geometria colinear, quanto para geometria ortogonal, foram considerados satisfatórios. Quanto menor os valores de concentração do elemento na amostra, maior a dificuldade de ajustar um modelo consistente para quantificação univariada, porém, ainda assim isso foi possível para o conjunto avaliado. Além de trazer à tona os desafios relacionados à quantificação de modo geral, esse primeiro exercício com os dados permitiu checar a qualidade das linhas de emissão com as quais trabalhamos, trazendo maior segurança para os resultados alcançados nas próximas etapas do trabalho. Vale ressaltar que, apesar de não validar com sucesso e garantir a LTE em todas as amostras do sistema ortogonal, ainda assim, os resultados de quantificação alcançados foram satisfatórios por análise univariada.

5.8.2 Método Livre de calibração

A partir do método CF, usando as determinações de Ca das amostras como elemento padrão, foi possível determinar as concentrações dos demais analitos, sem a necessidade de construção de curvas de calibração. Para isso, o primeiro passo foi o cálculo da quantidade de emissores atômicos e iônicos presentes no plasma. Apenas para ilustrar, a Tabela 9 mostra a média da densidade de emissores de todas as amostras encontradas para cada elemento estudado. A coluna N_{Total}^S representa a soma da densidade de emissores atômicos e iônicos.

Tabela 9 – Números de emissores médios encontrados nas amostras do conjunto Xingu II medidas pelo sistema DP LIBS colinear e ortogonal, bem como a massa atômica utilizada para cada elemento nas quantificações por CF.

Analito	Colinear (cm^{-3})			Ortogonal (cm^{-3})			Massa Atômica (u.m.a.*)
	$N_{0_S}G$	$N_{0_{S+}}G$	N_{Total}^S	$N_{0_S}G$	$N_{0_{S+}}G$	N_{Total}^S	
Al	1,61E+11	1,69E+06	1,61E+11	7,15E+11	1,03E+06	7,15E+11	26,982
Ca	6,69E+11	1,06E+07	6,69E+11	4,27E+12	5,02E+07	4,27E+12	40,078
Cu	--	--	--	6,76E+06	8,54E-01	6,76E+06	63,546
Fe	9,24E+10	3,63E+05	9,24E+10	3,45E+11	1,07E+05	3,45E+11	55,847
K	2,12E+11	1,39E+07	2,12E+11	4,92E+11	4,07E+07	4,92E+11	39,098
Mg	1,13E+12	5,49E+06	1,13E+12	1,70E+13	1,17E+07	1,70E+13	24,305
Mn	1,93E+09	5,83E+03	1,93E+09	1,69E+10	9,08E+03	1,69E+10	54,938

* Unidades de massa atômica – u.m.a.

Fonte: Elaborada pela autora

A partir das densidades totais, da massa atômica, e considerando a concentração do elemento padrão para cada amostra analisada, foram obtidos os valores de concentração dos

analitos. As Figura 42-45 mostram os gráficos de correlação (coluna da esquerda) entre os valores de concentração obtidos através dos cálculos pelo método CF e medidos pela técnica de referência para as medidas do conjunto Xingu II pelo DP LIBS nas geometrias colinear e ortogonal. A reta evidenciada no gráfico representa a curva $x = y$, ou seja, a condição ideal esperada para os valores absolutos de concentração. As figuras mostram ainda, na coluna da direita, em um gráfico de linhas e símbolos, as concentrações obtidas para cada amostra, que estão representadas no *eixo x* de 1 a 71, da mesma maneira para AAS e CF, de modo que, o ideal seria a sobreposição de cada ponto do gráfico, ou seja, linhas pretas (concentrações obtidas por AAS) e linhas azuis (concentrações obtidas por CF) sobrepostas. Ambos os gráficos (coluna da esquerda e da direita) ilustram duas formas de visualizar o mesmo resultado, em uma comparação AAS e CF.

Na Figura 42 observamos os casos do Al, Fe e Mg, para as medidas DP LIBS colinear. Para o caso do Al, foi alcançado um valor elevado de correlação a partir do método CF, nas quais as concentrações calculadas por CF se apresentaram pouco acima dos valores esperados. No gráfico b) da Figura 42 as setas em vermelho indicam as duas amostras que não haviam passado pelo critério de McWhirter, porém cujos valores de concentração calculados estiveram próximos aos medidos. O mesmo ocorreu para o caso do Fe, que apesar de ter uma relação evidentemente linear com a técnica de referência, os valores calculados pelo CF se apresentaram superestimados em relação aos valores medidos por AAS. A linha do Fe utilizada nos cálculos (358,12 nm), e que pode ser vista facilmente no espectro LIBS, está em uma região do espectro que contém inúmeras linhas de emissão deste mesmo elemento, como listado na base de dados do NIST (64) Uma possível justificativa para os valores superestimados calculados, pode estar relacionada ao fato de mais de uma linha de emissão estar influenciando a linha utilizada, provocando um leve alargamento e/ou aumento de intensidade relativa para a linha 358,12 nm. Se isso ocorre, os valores de área obtidos a partir do ajuste Lorentziano podem ser maiores do que os reais para este elemento, resultando em valores de concentração maiores do que os medidos. Vale comentar ainda que esta é uma linha forte, com alto coeficiente de Einstein ($1,02 \cdot 10^8$) e boa acurácia (A), o que faz dela uma linha com alguma chance de ser auto absorvível em amostras com alta concentração de Fe. Como os valores de concentração obtidos por CF estão superestimados e não subestimados, entendemos que não se trata de um caso de auto absorção da linha. Além disso, em plantas, a concentração de Fe não é muito alta quando comparada a outros elementos, como Carbono e Cálcio, e, portanto, a influência da auto absorção consideramos ser praticamente inexistente. Em relação ao Mg a correlação entre CF e AAS também foi alta, o que fez com que praticamente os

valores de concentração sobrepusessem os resultados para as duas técnicas no gráfico f) da Figura 42. Para este caso, a média de recuperação dos valores de concentração ficou em torno dos 94% a partir do método CF, demonstrando potencialidade e sucesso.

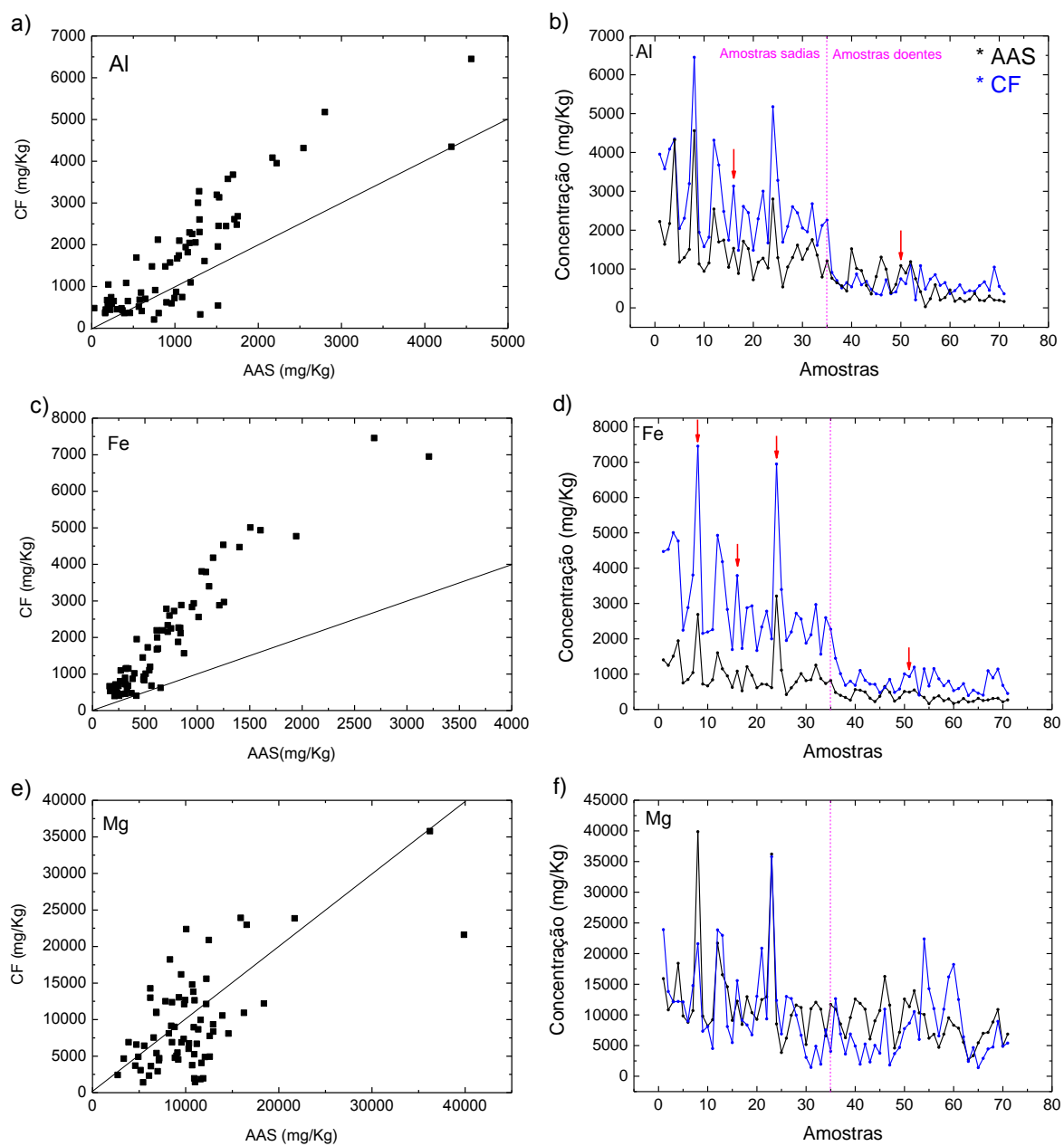


Figura 42 – Os gráficos a, c e e apresentam a correlação entre os valores de concentração obtidos através dos cálculos pelo método CF, e medidos pela técnica de referência para as aquisições do conjunto Xingu II pelo DP LIBS na geometria colinear, para os elementos Al, Fe, e Mg. A coluna da direita mostra, para os mesmos elementos, um gráfico de linhas e símbolo, evidenciando as concentrações AAS (preta) e CF (azul), obtidas para cada amostra representada no eixo X (1 a 71). As setas em vermelho indicam as amostras que não passaram pelo critério de McWhirter para possibilidade de assunção de LTE. A divisão em magenta aponta de 0-35 amostras sadias e 36-71 amostras doentes. Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 43 mostra as ilustrações para os casos do K e Mn. Em relação ao K apesar dos dados dispersos impossibilitando a definição de linearidade, os valores de concentração calculados por CF estão relativamente próximos aos medidos por AAS, como ilustrado no gráfico b da Figura 43.

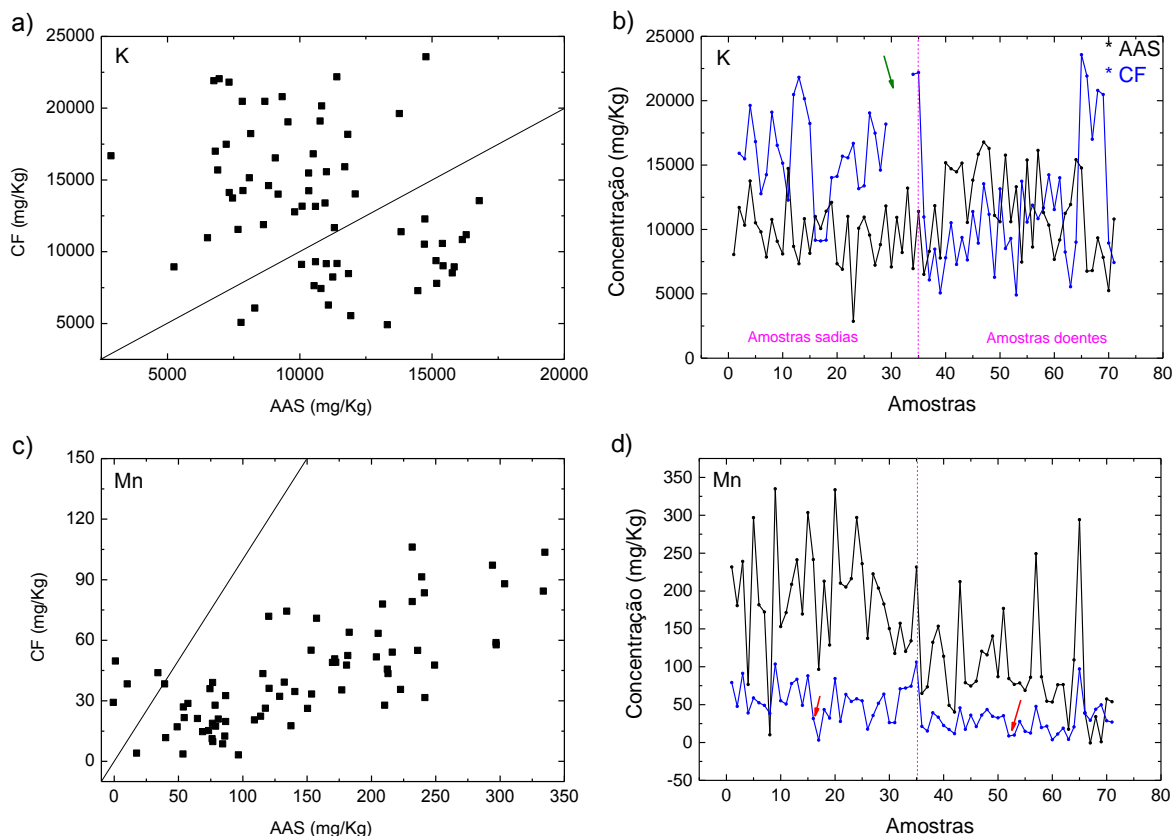


Figura 43 - Os gráficos a e c apresentam a correlação entre os valores de concentração obtidos através dos cálculos pelo método CF, e medidos pela técnica de referência para as aquisições do conjunto Xingu II pelo DP LIBS na geometria colinear para os elementos K e Mn. A coluna da direita mostra, para os mesmos elementos, um gráfico de linhas e símbolo, evidenciando as concentrações AAS (preta) e CF (azul), obtidas para cada amostra representada no eixo X (1 a 71). As setas em vermelho indicam as amostras que não passaram pelo critério de McWhirter para possibilidade de assunção de LTE. A seta em verde indica um intervalo de 4 outliers excluídos do gráfico, cujos erros de ajuste da curva Lorentziana no pico superaram os 10% aceitáveis. A divisão em magenta aponta de 0-35 amostras sadias e 36-71 amostras doentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para o Mn a situação foi um pouco diferentes, já que os valores encontrados por CF estão subestimados para este analito, o que pode ser observado na Figura 43c. Uma possível justificativa para o que encontramos está relacionada à própria concentração do elemento, que é baixa na amostra em questão. Dessa maneira, o fato de a intensidade dos picos ser baixa pode fazer com que os ruídos da radiação de fundo prejudiquem o estabelecimento da linha de base e obtenção da área, subestimando seu valor e conseqüentemente os valores de concentração

calculados por CF. Para elementos traço desse tipo, já era esperado um desafio muito grande para alcance de sucesso na quantificação por CF, já que, estes são também um desafio para a própria técnica de referência. Apesar disso, as condições otimizadas proporcionadas pelo sistema DP LIBS permitiram a avaliação deste elemento por CF com valores relativos entre as amostras bastante coerentes (Figura 43d).

Na sequência serão apresentados e discutidos os resultados de CF obtidos para o caso do DP LIBS na geometria ortogonal. A Figura 44 traz as análises para os seguintes analitos: Al, Fe e Mg. O comportamento em relação às quantificações alcançadas foi bastante semelhante ao encontrado para as aquisições do sistema colinear. O Al apresentou alta correlação dos dados CF e dos dados de referência.

O Fe, apesar da alta linearidade, teve a quantificação pelo método CF superestimada quando comparada com a referência para altas concentrações. Conforme mencionado para o caso do sistema colinear, isso pode estar acontecendo pela associação de mais de uma linha de Fe no intervalo do pico, já que quanto maior a concentração de Fe encontrada, mais os valores quantificados pelo CF estavam superestimados. É importante lembrar que não temos outras linhas de Fe em condições boas como esta para que fosse possível uma substituição. De fato, tentativas de quantificação utilizando outras duas linhas de Fe foram conduzidas, mesmo sabendo que não seriam linhas adequadas pela alta intensidade relativa e características das transições, porém sem sucesso. Dessa maneira, conhecendo o problema de resultados superestimados do Fe, constatamos a demanda de uma maior exploração métodos que possam corrigir e posteriormente aplicar essa linha para quantificações absolutas. Uma descoberta desse tipo, nos coloca mais próximos a situações reais de análises de materiais biológicos complexos, sem um grande preparo de amostra e a partir de modelos de quantificação que dispensam o uso de conjuntos de calibração e todas as dificuldades intrínsecas desse processo.

O Mg apresentou também comportamento semelhante ao observado para o caso do sistema colinear. A grande maioria dos valores encontrados estava acima dos valores determinados por AAS, e apesar da dispersão vista no gráfico e) da Figura 44, é possível notar a tendência de linearidade nos dados. A recuperação nesse caso ficou em torno dos 200%, enquanto que para o Fe os valores oscilaram em média nos 160% e para o Al estiveram em torno de 120%.

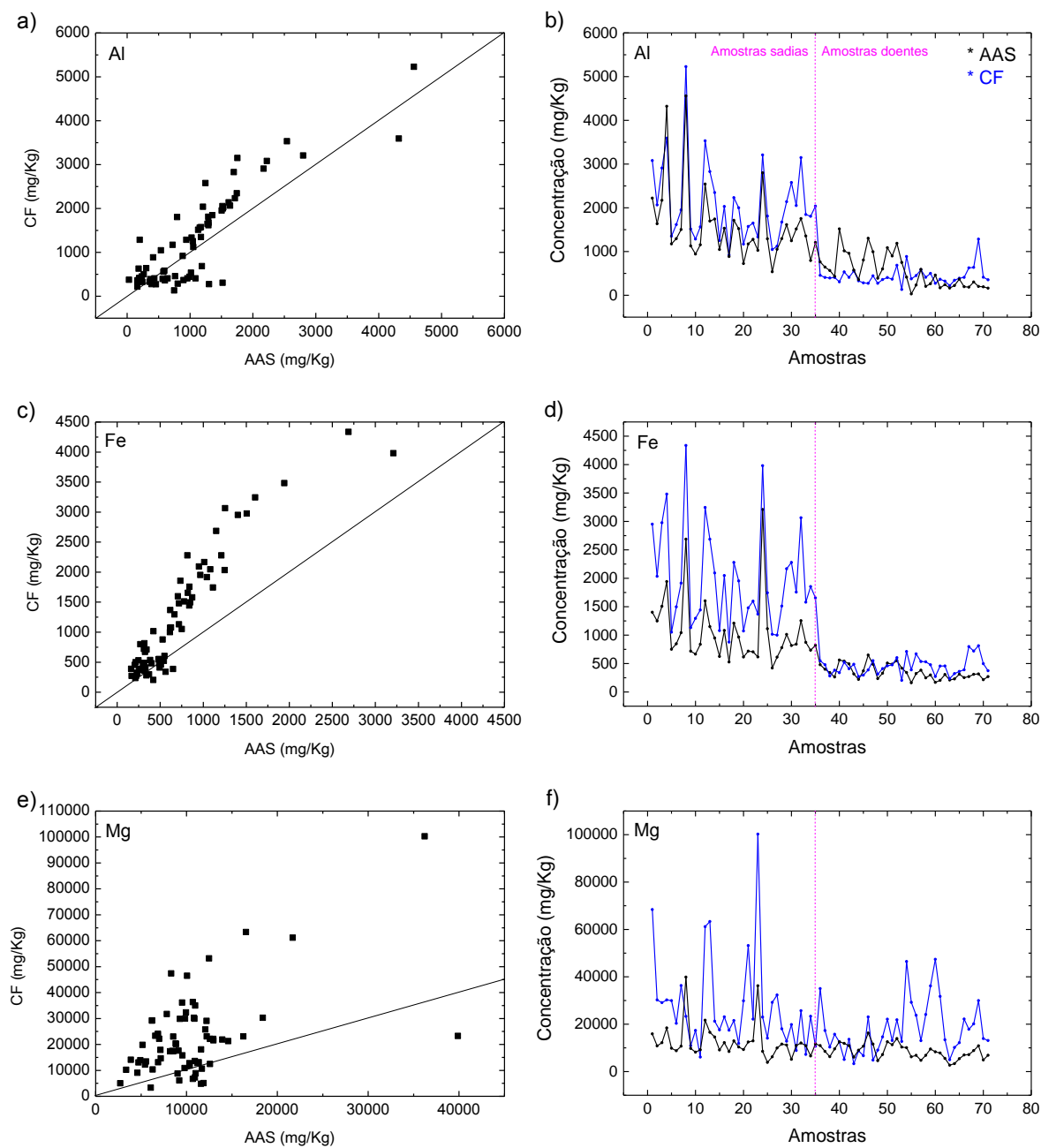


Figura 44 – Na coluna da esquerda vemos os gráficos de correlação entre os valores de concentração obtidos através dos cálculos pelo método CF, e medidos pela técnica de referência para as aquisições do conjunto Xingu II pelo DP LIBS na geometria ortogonal, para os elementos Al, Fe, e Mg. A coluna da direita mostra, para os mesmos elementos, um gráfico de linhas e símbolo, evidenciando as concentrações AAS (preta) e CF (azul), obtidas para cada amostra representada no eixo X (1 a 71). A divisão em magenta aponta de 0-35 amostras saudias e 36-71 amostras doentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 45 mostra os gráficos comparando os dados de quantificação por CF e AAS para os microelementos Mn e Cu, e também para o K.

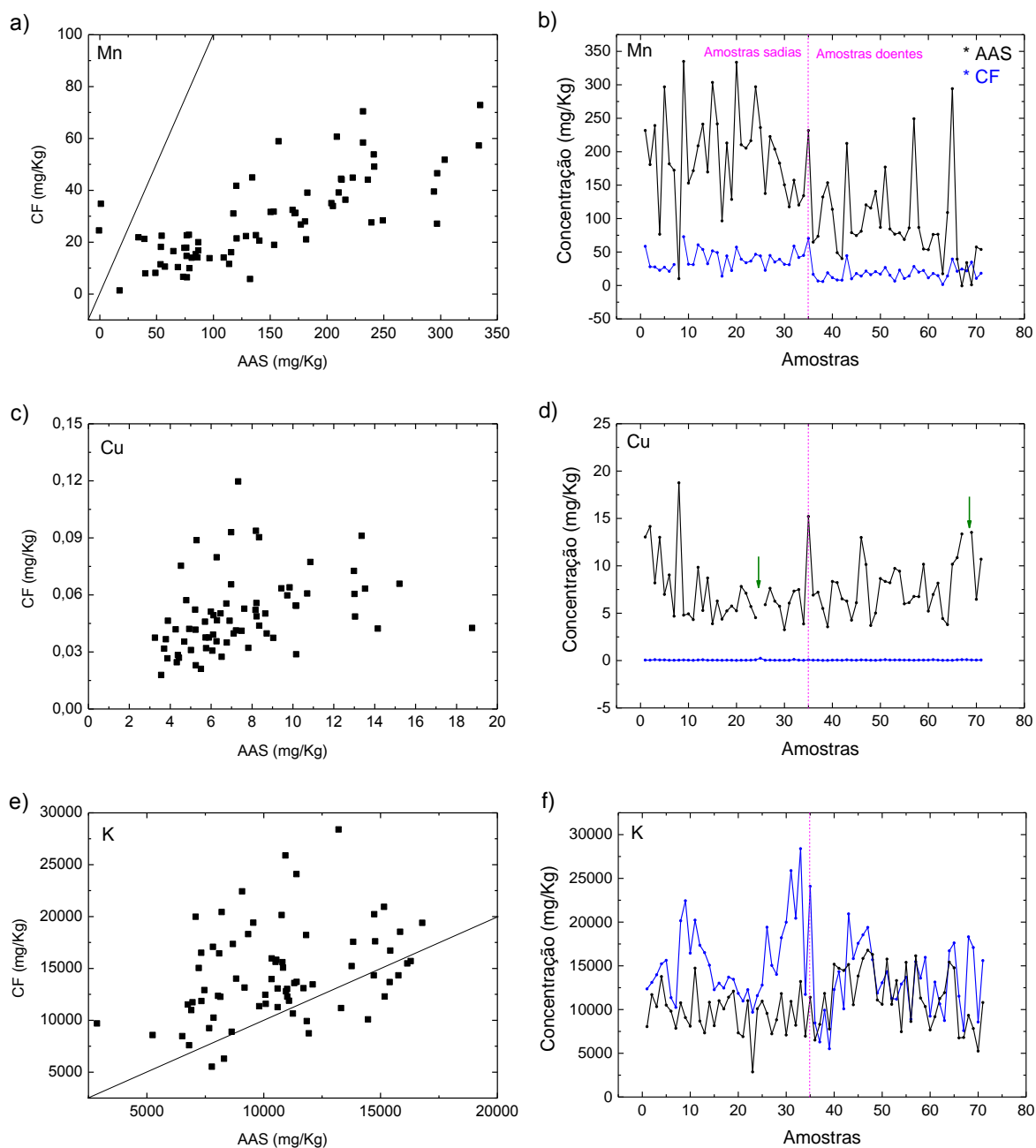


Figura 45 – Na coluna da esquerda vemos os gráficos de correlação entre os valores de concentração obtidos através dos cálculos pelo método CF, e medidos pela técnica de referência para as aquisições do conjunto Xingu II pelo DP LIBS na geometria ortogonal para os elementos Mn, Cu e K. A coluna da direita mostra, para os mesmos elementos, um gráfico de linhas e símbolo, evidenciando as concentrações AAS (preta) e CF (azul), obtidas para cada amostra representada no eixo X (1 a 71). A divisão em magenta aponta de 0-35 amostras sadias e 36-71 amostras doentes. As setas em verde indicam 2 amostras excluídas como outliers das medidas de AAS por apresentarem valores muito altos e discrepantes das demais.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para o Mn obtivemos comportamento parecido com o obtido para as medidas com o sistema colinear. Os valores absolutos calculados por CF estão subestimados em relação à referência, apesar de coerência apontada pelo comportamento das linhas no gráfico b), que

seguem um desempenho bastante semelhante quando comparamos as variações entre uma amostra e outra. Para o caso do Cu, os valores calculados pelo método CF através dos espectros LIBS e suas propriedades, foram ainda mais subestimados em relação à técnica de referência. Apesar das dificuldades de encontrar e trabalhar com essa linha de Cu, a análise na busca de um possível resultado de quantificação foi mantida, mesmo que não tenha sido fácil obter um bom ajuste para esse pico pouco intenso no espectro (cujo erro de ajuste oscilou em torno dos 10% toleráveis). Conforme o esperado, não foi possível alcançar a quantificação por este método para este microelemento da planta de soja.

No caso do K a dispersão dos pontos em torno da curva ideal foi grande, ou seja, sem alcançar linearidade esperada. Apesar disso, os valores calculados por CF estiveram oscilando próximos aos valores medidos por AAS, demonstrando a potencialidade do método na determinação deste analito a partir das medidas DP LIBS operando na geometria ortogonal.

O K foi o nutriente que apresentou comportamento disperso para as duas geometrias em estudo. Por ser um elemento cuja concentração na planta não é pequena, a dificuldade na quantificação deste chamou a atenção. Inicialmente, acreditamos que os efeitos não lineares observados poderiam ser devido à auto absorção do pico do elemento utilizado nas investigações, apesar de todo estudo feito anteriormente para a seleção da linha. Para por fim a essa dúvida, realizamos um estudo de correlação de cada ponto de intensidade em torno do pico de potássio em 693 nm com a concentração deste elemento obtida por AAS, observamos que o maior coeficiente de correlação de Pearson obtido coincide exatamente com o centro do pico de K. Isso acontece tanto para o caso do DP LIBS colinear quanto para o ortogonal, e pode ser observado nos gráficos da Figura 46. Esta constatação permite concluir que, o pico de K em análise não se encontra auto absorvido e, portanto, os fenômenos não lineares observados não se devem a esta hipótese.

Tendo sido observado resultados ligeiramente melhores para o DP LIBS ortogonal quando comparamos, para ambas as geometrias do sistema, as quantificações via CF e via AAS, uma outra hipótese levantada está relacionada às diferenças encontradas entre a formação do plasma em cada uma das configurações. Assim, sabendo que o sistema colinear proporciona um plasma mais denso do que o plasma gerado pela geometria ortogonal (o que pôde ser comprovado pelos valores de densidade eletrônica encontrados), e que as intensidades de ambos operando de forma otimizada, não apresentaram grandes diferenças (Figura 46), acreditou-se que o espalhamento de luz por particulado seja o responsável pelos fenômenos não lineares que estão ocorrendo no caso do K, para as medidas realizadas no DP LIBS colinear. Em outras palavras, por apresentar um plasma mais denso, já que o sistema operando na

geometria colinear consegue ablacionar uma maior quantidade de amostra, este deveria proporcionar um sinal também maior. Isto não é observado, e pode ser verificado nas intensidades espectrais representadas nas Figuras 46 e 47, o que leva a acreditar que parte da luz não esteja atingindo o detector, e que isto pode estar ocorrendo devido à presença de particulados no plasma, que devem, por sua vez, estar funcionando como espalhadores de luz, resultando em um plasma não opticamente fino para este elemento.

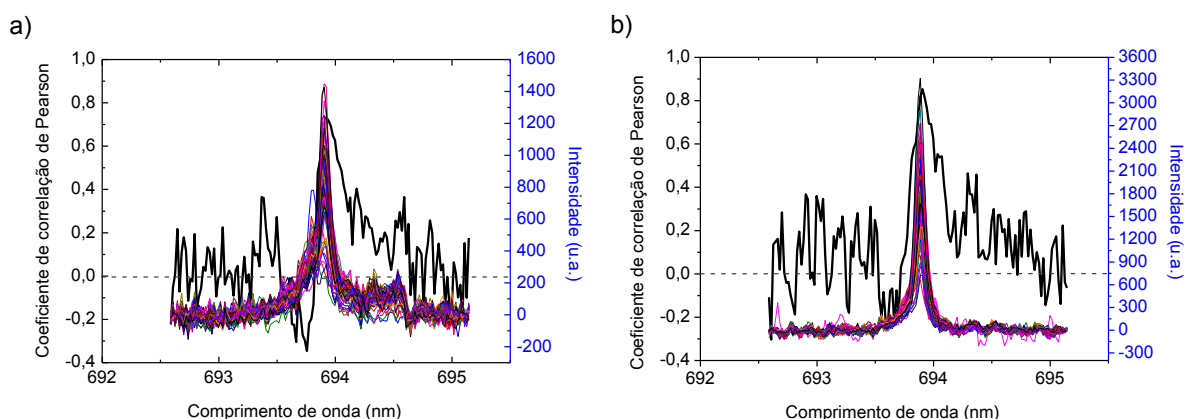


Figura 46 – Gráficos de coeficiente de correlação de Pearson (linha espessa em preto) entre os valores de intensidade e a concentração do K obtida pela técnica de referência, para cada um dos comprimentos de onda possíveis de medir através do espectrômetro Echelle, para o caso das avaliações DP LIBS colinear, em a), e ortogonal, em b). O eixo y à direita é referente aos valores de intensidade do espectro LIBS, para que fosse possível a visualização do perfil do pico no intervalo de estudo, após correção da linha de base.

Fonte: Elaborada pela autora.

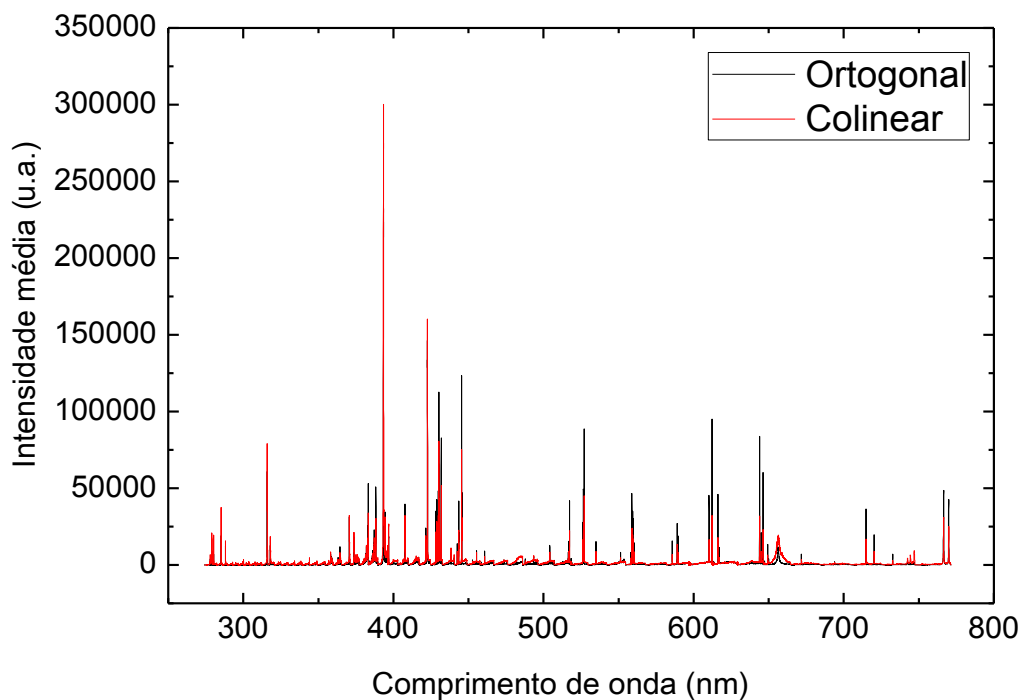


Figura 47 - Espectro médio das amostras sadias do conjunto Xingu II medidas no sistema DP LIBS colinear (em vermelho) e ortogonal (em preto).
Fonte: Elaborada pela autora.

Vale ressaltar que, para o caso dos espectros obtidos a partir do sistema operando na geometria ortogonal, a grande maioria das amostras não atenderam as condições de LTE segundo o critério de McWhirter. Porém, os comportamentos observados em relação à comparação de quantificação obtida pelo sistema no colinear e no ortogonal foram muito parecidas, e até superiores em relação à geometria ortogonal algumas vezes. Tal fato nos levou a acreditar que talvez esse critério não seja tão robusto na avaliação do estabelecimento da LTE, e ainda, que realmente as condições em que um plasma é gerado por LIBS levam a um plasma em LTE para um determinado intervalo de tempo. (86,88)

5.9 Avaliação diagnóstica

5.9.1 Quantitativa: perfil nutricional

Após todas as determinações nutricionais das amostras do conjunto Xingu II por ambas as geometrias do sistema DP LIBS, tentamos associar as diferentes concentrações dos analitos à presença ou ausência da doença HVRF. Para isso, como usado para os dados do LIBS comercial, foram construídos modelos de classificação via regressão associado ao método dos

mínimos quadrados parciais, e tais modelos foram avaliados segundo uma validação cruzada dos dados. Como forma de comparação, os dados de quantificação pela técnica de referência também foram utilizados na construção de um modelo. Para que essa comparação fosse equânime, isso foi feito incluindo as quantificações do Cu para o caso do DP LIBS ortogonal, e também não as incluindo, a fim de comparar com as determinações obtidas através do DP LIBS colinear. Feito isso, e comparando os classificadores gerados entre si para os dados AAS, vimos que os resultados foram exatamente os mesmos na aproximação de uma casa após a vírgula, e que, portanto, o Cu não apresenta grandes diferenças de concentração entre as classes de amostras sadia e HVRF, não efetuando papel fundamental nessa distinção.

Ainda em relação ao Cu, o fato de que este elemento não deve ajudar a distinguir as amostras sadias e doentes pode ser confirmado pelo gráfico do Cu na Figura 38, nela, as amostras sadias e HVRF estão todas misturadas, independente das concentrações. O Cu tem o papel de ativar algumas enzimas envolvidas na síntese de lignina, e é essencial em diversos sistemas enzimáticos da planta. Ele é necessário para o processo de fotossíntese, essencial na respiração e ajuda no metabolismo de carboidratos e proteínas, porém, aparentemente não é alterado durante um estresse biótico. Além disso, altas concentrações de Cu no meio são tão prejudiciais quanto a falta deste nutriente. (107)

Conforme vimos no caso das análises com o LIBS comercial e a utilização da ferramenta PCA nos dados, Ca, Mg e K são nutrientes que variam as concentrações, em média, quando as duas classes de amostras são comparadas. O Ca tem papel importante na construção das paredes celulares, auxiliando no crescimento de raízes e brotos. Por ser um nutriente que tem baixa mobilidade na planta de soja, sua má distribuição e deficiência pode levar ao aborto de flores e vagens, reduzindo a produtividade da planta. (108-109) Além disso, Ca é frequentemente chamado de primeira linha de defesa da planta. Muitos organismos infectam as plantas, os fazem penetrando o tecido da parede celular por meio de pectinases (enzimas que digerem pectinas). (110) Quanto maior a concentração de Ca na planta, maior a concentração de pectinas que mantém as células juntas e, portanto, maior a habilidade de resistir à tais enzimas. A doença em estudo, por ter como agente um nematoide que aparentemente ataca e hospeda a raiz das plantas, pode estar prejudicando a absorção de alguns nutrientes através da raiz, como o Ca, resultando em deficiências e um conjunto de sintomas da doença. Assim, o que observamos, é uma concentração menor do Ca nas plantas HVRF quando comparadas às sadias.

Além da própria doença, a deficiência de um determinado nutriente pode levar a alterações de concentração dos demais. Como é o caso da concentração de K que pode ser afetada pela

concentração de Ca disponível na planta. À baixas concentrações de Ca, Rayar e colaboradores (108) mostraram que, a absorção de K é maior, corroborando para os resultados qualitativos obtidos para o K durante as análises dos dados do sistema LIBS comercial, que apontou uma tendência de aumento da concentração de K nas amostras doentes. Para os resultados do DP LIBS, tanto colinear quanto ortogonal, as amostras sadias e doentes ficaram um tanto quanto sobrepostas, não sendo possível visualizar essa diferenciação em um simples gráfico de correlação direta das técnicas avaliadas (CF x AAS), ainda que a média das concentrações de K possa apontar para esta hipótese.

Apesar dessa observação das diferenças encontradas nas concentrações de K para amostras sadias e doentes, ainda assim, os níveis podem estar baixos para este nutriente, devido à doença. Este é um elemento móvel na planta, cuja deficiência pode causar justamente dois dos principais sintomas da HVRF: caules verdes e a retenção foliar. (111)

O Mg e o Fe são nutrientes também essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. O magnésio, de modo geral, é um íon móvel na planta, e tem papel fundamental na formação de carboidratos, na biossíntese de proteínas, e na estabilização de ácidos nucleicos funcionais, sem contar que, como um nutriente móvel, é essencial na regulação da balança cátion-ânion e é um íon osmoticamente ativo para regulação do turgor das células. (112) Assim, o desbalanço desse nutriente na planta pode resultar em diversos problemas e alterações na mesma. Para o Fe, a situação não é muito diferente. Ele é um micronutriente envolvido na formação de proteínas e diversas enzimas, além de estar envolvido no processo de transferência de energia, de respiração e metabolismo da planta. Observamos que nas amostras de soja doentes, a concentração de Fe é menor do que nas amostras sadias. Menores teores de Fe na planta podem resultar em sintomas como clorose, que afeta principalmente as folhas mais novas da planta, seu crescimento, e faz com que a produtividade decaia. (113)

Após essa pequena avaliação das mudanças nutricionais que a doença pode estar causando nas amostras de planta de soja, seguimos com a geração dos modelos de classificação das amostras através do método CVR+PLSR, e consequente verificação de que, os perfis nutricionais quantificados podem ser indicativos da presença ou ausência da HVRF. A Tabela 10 traz as matrizes de confusão obtidas na validação cruzada durante a avaliação dos modelos de classificação via regressão, associado ao método dos mínimos quadrados parciais, para os dados de quantificação pela técnica de referência AAS, e pelas concentrações elementares obtidas através do CF para os dados do DP LIBS colinear e ortogonal.

Tabela 10 –Matriz de confusão obtida na validação cruzada durante a avaliação dos modelos de classificação via regressão, associado ao método dos mínimos quadrados parciais, para os dados de quantificação pela técnica de referência (coluna 1: AAS), pelas concentrações elementares obtidas através do CF para os dados do DP LIBS colinear (coluna 2) e ortogonal (coluna 3).

Classe nominal (↓)	AAS		DP LIBS Colinear		DP LIBS Ortogonal	
	Sadia	HVRF	Sadia	HVRF	Sadia	HVRF
Sadia	89%	11%	86%	14%	83%	17%
HVRF	0	100%	3%	97%	3%	97%

Fonte: Elaborada pela autora.

Considerando as amostras doentes como nossa classe de maior interesse e, portanto, a classe positiva, calculamos o índice *kappa*, a sensibilidade (também conhecida por revocação), especificidade e precisão dos modelos para cada um dos três casos para que pudéssemos compará-los de maneira confiável. A partir das taxas, VP, FP, VN e FN, é que foram estabelecidas as métricas de avaliação dos modelos de classificação que se encontram na Tabela 11.

Tabela 11 – Métricas de avaliação dos modelos de classificação gerados para os dados de quantificação por AAS (coluna 1), pelas concentrações elementares obtidas através do CF para os dados do DP LIBS colinear (coluna 2) e ortogonal (coluna 3).

	AAS	DP LIBS Colinear	DP LIBS Ortogonal
Acurácia	94%	92%	90%
Sensibilidade	100%	97%	97%
Especificidade	89%	86%	83%
Precisão	90%	88%	85%
Índice <i>kappa</i>	89%	83%	80%

Fonte: Elaborada pela autora.

Um erro crasso em uma avaliação diagnóstica de plantas como esta, está exatamente na taxa de falsos negativos, pois classificar uma amostra doente como sadia é preocupante, já que um diagnóstico desse faz com que não seja dispendida atenção necessária à esta planta, que permanecerá sem manejo, e pode agir como inóculo para disseminação da doença em campo. Um erro do tipo falso positivo é ruim, porém coloca o produtor em alerta em relação àquela planta, fazendo com que os danos sejam contidos. A taxa de falsos negativos seria, portanto, um bom parâmetro de comparação dos modelos, porém, para ambos os sistemas DP LIBS, ela ficou em 3%.

A acurácia, ou a taxa de amostras classificadas corretamente ficou em 94% para o modelo com os dados AAS, 92% para DP LIBS colinear e 90% para DP LIBS ortogonal. Assim, em uma avaliação de acertos que considera igualmente as duas classes, o sistema DP LIBS colinear

apresentou desempenho pouco superior ao ortogonal. A sensibilidade foi de 97% para ambos os modelos DP LIBS, e ela mostra a taxa com que o modelo classifica como positivo (HVRF) todas as amostras que são de fato positivas, ou seja, doentes. Já a especificidade considera a taxa com que o modelo classifica como negativas (sadias) as amostras que são de fato sadias, considerando apenas os exemplos negativos, e ficou em 86% para o modelo DP LIBS colinear e 83% para o ortogonal. Mais uma vez, o modelo DP LIBS colinear demonstrou um desempenho pouco superior. Em outras palavras, a sensibilidade mostra a capacidade que o modelo tem de diagnosticar corretamente as amostras doentes e, a especificidade mostra a capacidade do modelo em classificar corretamente as amostras sadias.

A precisão do modelo trata do índice de acerto das amostras positivas, ou índice de acerto em relação à classe HVRF, e considerando apenas essa classe para os cálculos. Nesse caso, alcançamos 88% de precisão no modelo do DP LIBS colinear e 85% no DP LIBS ortogonal. Por fim, uma última métrica avaliada em relação aos classificadores foi o índice *kappa*. Ele traz uma maneira de expressar a confiabilidade do modelo, e é uma medida de concordância usada em escalas nominais que nos fornece uma ideia do quanto as observações se afastam daquelas esperadas, fruto do acaso, indicando então o quão legítimas as interpretações são. Existe uma escala de concordância do *kappa* que diz que se o índice é menor do que 0, não existe concordância, ou seja, estamos falando de classificações feitas ao acaso, se está entre 0 e 20% a concordância é fraca, entre 21 e 40% é sofrível, entre 41 e 60% é regular, entre 61 e 80% é boa, entre 81 e 99% é ótima, e quando atinge o 100% é perfeita. No caso dos modelos gerados, a concordância foi ótima para o caso DP LIBS colinear e para o modelo AAS, e boa para o modelo DP LIBS ortogonal, indicando que, para este último modelo, a classificação concorda mais com o que seria esperado pela chance (acaso) do que o modelo DP LIBS colinear, apesar dessa diferença ser ainda muito pequena.

Assim, para todas as métricas de avaliação utilizadas podemos observar sutil superioridade do modelo gerado pelos dados de quantificação obtidos através do método CF a partir dos espectros DP LIBS colinear, sendo que os dados de quantificação obtidos pelo método de referência ainda assim levaram ao melhor classificador gerado, de maior acurácia e grande precisão. Tais resultados permitiram concluir então que, o método de quantificação proposto utilizando LIBS, em ambas as geometrias, para posterior classificação de sanidade das plantas a partir do perfil nutricional calculado, pode ser uma excelente ferramenta de análise e diagnóstico, não somente para plantas de soja, podendo ser extrapolado para outras culturas e outras doenças, de maneira que possa auxiliar o produtor em campo, de maneira rápida, eficaz, sem a necessidade de grande preparo de amostra e produção de resíduos químicos.

5.9.2 Semiquantitativa: uma relação entre os nutrientes presentes na planta

O fato de tentarmos trabalhar com amostras que não tiveram nada adicionado como elemento padrão ou controle, está relacionado à tentativa de facilitar avaliações de amostras em condições de campo, de maneira rápida. Pensando nisso, minimizar ou eliminar o preparo de amostras é extremamente relevante. Nesse sentido, desejando a investigação das necessidades nutricionais de uma plantação com finalidade diagnóstica, é possível aplicar o método de quantificação em estudo, o CF, trabalhar apenas com as razões de um elemento por outro, e dessa maneira, conhecer as necessidades nutricionais da planta. Fazendo isso, ou seja, não desejando a determinação absoluta de cada nutriente da planta, a última etapa de aplicação do método CF é dispensada, não havendo necessidade de se conhecer a concentração de nenhum analito para a determinação dos demais, já que estamos interessados nas relações de um nutriente por outro.

Entendendo as condições ideais de uma planta saudável em campo, e como se comportam as razões de um elemento por outro no caso ideal e quando apresentam a doença em estudo, as próprias razões podem ser parâmetros de avaliação da necessidade da plantação, não precisando envolver nenhuma análise química complexa, com o dispêndio de tempo e produção de resíduos químicos, ou até mesmo a adição de um componente no preparo da amostra, quando o que se deseja é uma avaliação rápida para tomada de decisão imediata no campo. Assim, nesta última etapa do trabalho, houve a tentativa de simplificação do último passo do método CF, e a partir da equação (18), chegamos na razão de um elemento por outro. A partir das diversas razões obtidas (calculamos todas as possíveis a partir dos elementos que identificamos e trabalhamos no espectro LIBS) tentamos fazer a geração dos modelos e classificação usando CVR + PLSR, como anteriormente.

Para o estudo, foram obtidas as seguintes razões entre os macronutrientes: K/Ca , K/Mg e Ca/Mg . Para os micronutrientes, foram calculados os seguintes índices: Al/Fe , Al/Mn e Fe/Mn . Como foi baixa a predição para o elemento Cu nos dois estudos anteriores de quantificação, ficou decidido que este elemento ficaria de fora dessas análises. Por este motivo, não foram contabilizadas razões entre elementos que envolvessem o Cu. Por fim, os índices entre macro e micronutrientes também foi considerada: Ca/Fe , Ca/Mn , Ca/Al , Mg/Fe , Mg/Mn , Mg/Al , K/Fe , K/Mn e, K/Al . O estudo foi conduzido considerando as determinações

a partir do CF para os dados DP LIBS colinear e ortogonal, e também para os quantificados pela técnica de referência.

Observando as razões, verificamos que, por exemplo, K/Ca é maior, em média nas amostras doentes, sugerindo um aumento na concentração do K ou decréscimo na concentração do Ca devido à presença da doença. Isso foi observado para os três casos avaliados. Já a razão Ca/Mg foi pouco menor em média nas amostras doentes, sugerindo uma diminuição da concentração de Ca e/ou aumento do Mg. Para o K/Mg houve uma diferença em relação aos dados de referência e os demais. Para os dados DP LIBS, praticamente não houve variação dessa razão, de maneira que podem estar aumentando ou diminuindo em proporção suas concentrações na amostra avaliada, enquanto que, para os dados AAS, o fator referente a esses nutrientes apareceu maior nas amostras HVRF, reforçando a possibilidade de aumento na concentração de K e/ou diminuição na concentração de Mg. Apesar do observado através da média e desvio calculado para esses dados, foi assumida a normalidade dos dados e homogeneidade da variância (confirmada pelo teste de Levene para alguns casos) e em seguida, os dados foram avaliados estatisticamente, com 95% de confiança, pelo teste de comparação de médias denominado Teste de Tukey. Através dele, não foi observada diferença estatística significativa entre as amostras HVRF e sadias.

Diferente do que houve para o caso dos macronutrientes, as razões entre os micronutrientes apresentaram diferença estatística significativa para o caso dos dados DP LIBS, tanto medidos a partir da geometria colinear, quanto ortogonal. O que não aconteceu para os dados obtidos a partir da técnica de referência. Como as medidas DP LIBS foram realizadas intercalando amostras sadias e amostras HVRF, não existiu enviesamento dos dados por classe. Concluímos assim, que o LIBS pôde, com maior rigor, detectar as diferenças das razões dos nutrientes das plantas.

Avaliações semelhantes foram conduzidas com as demais razões calculadas, e para praticamente todas, houve diferença estatística significativa entre a classe sadia e HVRF a partir do teste de comparação de médias com 95% de confiança. Um estudo mais agrônômico e fisiológico da planta a partir das razões encontradas poderia levar às alterações que estão sendo observadas, ajudando na compreensão da doença e no manejo pelo produtor.

A partir das razões obtidas, induzimos três diferentes classificadores e verificamos seu desempenho através as mesmas métricas que usamos para o caso dos valores absolutos quantificados por CF. A Tabela 12 traz as matrizes de confusão obtidas para os três casos avaliados.

Tabela 12 –Matriz de confusão obtida na validação cruzada durante a avaliação dos modelos de classificação via regressão, associado ao método dos mínimos quadrados parciais, para as razões das concentrações obtidas pela técnica de referência (coluna 1: AAS), e pelos dados semiquantitativos obtidos por CF para os dados do DP LIBS colinear (coluna 2) e ortogonal (coluna 3).

Classe nominal (↓)	AAS		DP LIBS Colinear		DP LIBS Ortogonal	
	Sadia	HVRF	Sadia	HVRF	Sadia	HVRF
Sadia	94%	6%	86%	14%	91%	9%
HVRF	6%	94%	22%	78%	8%	92%

Fonte: Elaborada pela autora.

As métricas também foram calculadas considerando a classe doente como a de maior interesse, e os resultados estão expostos na Tabela 13.

Tabela 13 – Métricas de avaliação dos modelos de classificação gerados para as razões dos dados de quantificação por AAS (coluna 1), e pelas avaliações semiquantitativas obtidas por CF para os dados do DP LIBS colinear (coluna 2) e ortogonal (coluna 3).

	AAS	DP LIBS Colinear	DP LIBS Ortogonal
Acurácia	94%	82%	92%
Sensibilidade	94%	78%	92%
Especificidade	94%	86%	91%
Precisão	94%	85%	92%
Índice <i>kappa</i>	89%	63%	83%

Fonte: Elaborada pela autora.

Como mencionado anteriormente, a taxa de falsos negativos alta é algo que preocupa em uma proposta diagnóstica como esta. Trabalhando com as razões dos nutrientes, esta ficou bastante superior para o caso do sistema DP LIBS colinear (22%), indicando que, esse modelo pôde, no caso do DP LIBS ortogonal, evidenciar melhor as diferenças nutricionais encontradas entre as amostras sadias e HVRF, mantendo a taxa de falsos positivos em 8%, bastante próxima à alcançada nas análises com AAS (6%).

Ao observar a acurácia, foi possível notar que houve queda de desempenho acentuada apenas para o caso DP LIBS colinear, enquanto que para os demais, a taxa de acerto ficou próxima à obtida anteriormente para o caso das amostras quantificadas em valores absolutos. Assim, em uma avaliação de acertos que considera igualmente as duas classes, o sistema DP LIBS ortogonal acabou se destacando em relação ao colinear.

Quanto à sensibilidade, houve queda nas porcentagens para todos os casos quando comparamos com as métricas da Tabela 11, porém, o valor que chama atenção é a queda de desempenho nesse quesito para o sistema DP LIBS colinear. Já em relação à especificidade do

modelo, não notamos queda, e podemos notar a sua maior assertividade na classificação das amostras sadias, o que é importante. Mais uma vez, para o caso das razões nutricionais, o modelo DP LBS ortogonal demonstrou um desempenho pouco superior.

Quanto à precisão dos modelos, foram alcançados 85% para DP LBS colinear e 92% no DP LBS ortogonal, o que representou também uma piora de desempenho do sistema na geometria colinear em análises desse tipo. E por último, a partir do índice *kappa* avaliamos a confiabilidade do modelo, e verificamos que a concordância foi ótima para os dados AAS e DP LBS ortogonal e boa para o DP LBS colinear.

Assim, de modo geral, para a construção de modelos diagnósticos da doença HVRF em soja a partir de dados semiquantitativos calculados a partir do rigor do método CF, o sistema DP LBS apresentou um melhor desempenho. Tais resultados permitiram concluir então que, o método semiquantitativos de diagnóstico proposto utilizando LIBS, foi mais sensível e assertivo na geometria ortogonal, apesar do bom desempenho também na geometria colinear. Vale ressaltar a importância dessa descoberta, que possibilita o uso da técnica LIBS como ferramenta diagnóstica, de maneira extremamente rápida, sem a necessidade de adição de compostos químicos para preparo da amostra, e muito menos a produção de resíduos prejudiciais ao meio ambiente a partir das técnicas usuais. O método diagnóstico semiquantitativo a partir da aplicação do CF, dispensa totalmente o uso padrões ou materiais certificados, supera as dificuldades relacionadas aos efeitos de matriz e permite o diagnóstico da HVRF com taxas de acerto superiores a 80%.

6 CONCLUSÃO

Através do primeiro estudo, que envolveu a aplicação do sistema LIBS de baixa resolução, foi possível uma avaliação qualitativa das variações em três macroelementos presentes nas folhas de soja, e através destes dados foram alcançados, em média, 90% de acerto na classificação entre amostras doentes com soja louca II e amostras sadias. Além disso, o emprego do PCA nos dados LIBS permitiu inferir que a doença provoca relativa diminuição da concentração de Ca e Mg, e um aparente pequeno aumento nos níveis de K. Assim, tendo este estudo sido conduzido paralelamente em dois conjuntos de amostras, de diferentes cultivares de soja, e cujos resultados corroboraram entre si, foi possível demonstrar a potencialidade da ferramenta para o diagnóstico de plantas de soja.

A avaliação dos dados obtidos a partir de variações nos parâmetros do sistema LIBS de alta resolução permitiu concluir que o modo de operação DP LIBS colinear tem sinal até 400% superior do que o proporcionado pelo SP LIBS com mesma densidade de potência total, ao operar com atraso entre os pulsos de 500 ns, tempo de atraso do espectrômetro também de 500 ns e tempo total de aquisição de 10 μ s. Além disso, as condições do plasma formado e re-excitado no DP LIBS, como temperatura e densidade de elétrons, são minimamente suficientes para o possível estabelecimento do equilíbrio termodinâmico local, atestado pela satisfação do critério de McWhirter. As medidas DP LIBS ortogonal permitiram obtenção de dados de qualidade a partir de baixas energias do laser de excitação em 532 nm, tendo sido consideradas boas as medidas com energia em 16 mJ, e tempo de atraso de 600 ou 3000 ns. Vale mencionar que as otimizações foram conduzidas de modo a melhorar o sinal obtido de maneira geral no espectro, e para verificação disso, acompanhamos duas linhas de emissão, uma de Ca e outra de Mg. Tendo, cada elemento químico suas próprias características, é possível otimizar os sistemas de modo específico para cada elemento, caso haja interesse especial por algum deles.

Dessa maneira, foi possível concluir que, a utilização dos dados DP LIBS pode trazer informações mais precisas, e que permitam avaliações quantitativas, para uma investigação das variações nutricionais causadas pela doença soja louca II (HVRF). Através do estudo de condições físicas do plasma formado pelas medidas LIBS, que envolveu o cálculo da temperatura e densidade de elétrons foi possível concluir que, o plasma gerado pelo sistema DP LIBS colinear é mais denso do que o medido no DP LIBS ortogonal. Isso ocorre porque o sistema operando na geometria colinear permite maior interação do segundo laser com a

amostra, o que não acontece com o segundo disparo do sistema DP LIBS ortogonal, que acaba por ter maior acoplamento do laser com a pré-pluma do plasma formada. Como consequência, o plasma pouco denso formado, mesmo com o sistema operando no regime de altas energias, ficou a pouco de atingir a densidade mínima necessária para considerar a possibilidade de existência de LTE segundo o critério de McWhirter. Apesar disso ter sido constatado para a maioria dos elementos avaliados, e na maioria das amostras do conjunto Xingu II medidas, aparentemente a densidade alcançada não foi crítica para as análises quantitativas, permitindo boas correlações para elementos como Al, Fe e Mg, tanto para as análises tradicionais por meio da construção de curvas de calibração univariada, como através do método CF proposto nessa tese para este tipo de análise.

As quantificações obtidas pelo método CF foram consideradas satisfatórias uma vez que foram pioneiras nas análises de amostras de folhas de soja puras, uma matriz complexa o bastante, e que apresenta dificuldades de quantificação LIBS também através dos métodos tradicionais por problemas de compatibilização de matriz, homogeneidade, entre outros. Para a maioria dos nutrientes avaliados por CF, tanto para os dados DP LIBS colinear, quanto ortogonal, as concentrações obtidas pelo método proposto se apresentaram superiores às concentrações medidas pela técnica de referência. Após esta constatação, acreditamos que estamos no caminho para o desenvolvimento desse método para quantificações nutricionais de amostras vegetais, sendo necessários estudos mais específicos para a correção deste tipo de erro para cada elemento que se deseja quantificar.

Os bons resultados de classificação obtidos para as amostras sadias e doentes, cujos atributos utilizados para desenvolvimento e avaliação dos modelos foram os próprios valores de concentração dos nutrientes estudados por meio do CF, nos fizeram acreditar também que os resultados de quantificação foram bastante positivos. As métricas obtidas para os classificadores construídos a partir do perfil nutricional quantificado da planta de soja obtido com as medidas de AAS, DP LIBS colinear e DP LIBS ortogonal, foram extremamente próximas. Para os três modelos, a acurácia alcançada foi de 94%, 92% e 90%, respectivamente, demonstrando a boa capacidade de discriminação das amostras de soja sadias e HVRF. Estudos futuros podem, e devem ser conduzidos no sentido de caracterizar nutricionalmente outras doenças da cultura de soja, para que além desta, também outras possam fazer parte do diagnóstico preciso e completo da lavoura.

Outro recurso que tem sido utilizado para facilitar o tratamento dos dados quantitativos em LIBS através do método CF, porém que deve dificultar um pouco o preparo da amostra, é a adição de um elemento de forma padrão nas amostras, que tenha concentração conhecida nas

mesmas, e que não esteja presente naturalmente nas amostras a serem avaliadas. Os picos de emissão desse elemento podem ser usados para o cálculo da temperatura e densidade de elétrons no plasma, bem como deverá ser o elemento padrão para determinação das concentrações dos demais nutrientes por CF, não requerendo nenhuma determinação a posteriori pela técnica de referência. Na tentativa de facilitar todo o processo e ainda assim permitir o correto diagnóstico da doença em estudo utilizando LIBS como ferramenta, passou-se a trabalhar com dados semiquantitativos importantes obtidos, também, a partir da aplicação do método CF. Isso permitiu minimizar ao máximo o preparo da amostra, dispensando a adição de qualquer outro composto químico, e permitiu o diagnóstico da doença com taxas superiores a 80% para o caso do sistema DP LIBS colinear, e superiores a 90% para o sistema DP LIBS operando na geometria ortogonal. Esse estudo permitiu eliminar ainda o uso da técnica de referência para a determinação da concentração de um elemento padrão na amostra, para que a partir dele, fossem determinados os demais analitos para posterior classificação a partir do perfil nutricional absoluto. O desenvolvimento de tal metodologia para diagnóstico agrega muito ao sistema atual, quando o que se deseja é uma avaliação rápida para tomada de decisão imediata no campo.

Portanto, o desenvolvimento deste trabalho pôde confirmar a hipótese de que a doença HVRF leva a alterações químicas na planta de soja, que podem por fim, serem detectadas através de medidas LIBS. O método proposto que considera a relação entre os nutrientes semiquantificados pelo método CF a partir de medidas DP LIBS operando na geometria ortogonal apresentou acurácia de 92% no diagnóstico, enquanto que as razões calculadas a partir das quantificações por AAS proporcionaram um modelo com 94% de acurácia. Ou seja, a partir deste estudo foi possível a aplicação da técnica LIBS e o desenvolvimento de um método de diagnóstico que respeita 100% dos preceitos da Química Verde, não necessitando e/ou gerando produtos químicos nocivos ao meio ambiente, e que apresenta taxas diagnósticas semelhantes ao método usual empregado, que dispense grande tempo de análise e o emprego de inúmeros reagentes químicos prejudiciais.

REFERÊNCIAS

- 1 BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. *Plano agrícola e pecuário 2012/2013*. 2012 Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/plano-agricola-e-pecuario/arquivos-pap/pap2012-2013_livroweb-atualizado.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2016.
- 2 UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. *PIB do agronegócio brasileiro - dados de 1995 a 2017*. 2018. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>>. Acesso em: 30 out. 2018.
- 3 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Agência IBGE Notícias. *PIB avança 1,0% em 2017 e fecha ano em R\$ 6,6 trilhões*. 2018. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-noticias/releases/20166-pib-avanca-1-0-em-2017-e-fecha-ano-em-r-6-6-trilhoes.html>>. Acesso em: 30 out. 2018.
- 4 SILVEIRA, D.; GAZZONI, M. *PIB brasileiro cresce 1,0% em 2017, após 2 anos de retração*. 2018. Disponível em: <<https://g1.globo.com/economia/noticia/pib-brasileiro-cresce-10-em-2017-apos-2-anos-de-retracao.ghtml>>. Acesso em 30 out. 2018.
- 5 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio. Departamento de Acesso a Mercados e Competitividade. Coordenação-Geral de Competitividade. *Série histórica resumida da balança comercial brasileira - 1997 a 2017*. 2018. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/...do.../SERIEHISTORICABCARESUMIDA19972017.xls>. Acesso em: 30 nov. 2018.
- 6 LIS, L. *Exportações do agronegócio somam US\$ 96 bilhões em 2017, alta de 13%*. 2018. Disponível em: <<https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/exportacoes-do-agronegocio-somam-us-96-bilhoes-em-2017-alta-de-13.ghtml>>. Acesso em: 15 maio 2018.
- 7 BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Nova previsão da Conab para a safra de grãos é de 232,6 milhões de toneladas*. 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/nova-previsao-da-conab-para-a-safra-de-graos-supera-previsao-inicial>>. Acesso em 15 maio 2018.
- 8 BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Soja*. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. Acesso em: 23 jan. 2017.
- 9 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. *Soja em números (safra 2016/2017)*. 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 30 out. 2017.
- 10 ZAFALON, M. *Brasil assume liderança mundial na produção de soja, segundo EUA*. 2018 Disponível em: <<https://www1.folha.uol.com.br/mercado/2018/05/brasil-assume-lideranca-mundial-na-producao-de-soja-segundo-eua.shtml>>. Acesso em: 30 out. 2018.

- 11 TROMBINI, L. *Sanidade vegetal: manejo de doenças na cultura de soja*. Disponível em: <[http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=23571&secao=Sanidade Vegetal](http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=23571&secao=Sanidade%20Vegetal)>. Acesso em: 23 jan. 2017.
- 12 VIEIRA, D. *Agricultura de precisão: o que é, para que serve e quais os seus benefícios*. Disponível em: <<http://www.startagro.agr.br/agricultura-de-precisao-o-que-e-para-que-serve-e-quais-os-seus-beneficios/>>. Acesso em: 30 out. 2017.
- 13 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Relatório técnico anual do Centro Nacional de Pesquisa de Soja - 1982 e retrospectiva 1975 a 1981*. 1984. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/172280/1/ID30559-1-1984.pdf>>. Acesso em; 23 jan. 2017.
- 14 SOSA-GÓMEZ D. R.; MOSCARDI, F. Retenção foliar diferencial em soja provocada por percevejos (Heteroptera: Pentatomidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 24, n. 2, p. 401-404, 1995.
- 15 MASCARENHAS, H. Á. A. et al. *Deficiência de potássio em soja no estado de São Paulo: melhor entendimento do problema e possíveis soluções*. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/agronomo_000g4vf8ltd02wx5ok0dkla0ssilve3s.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2017.
- 16 MEYER, M. C. et al. Manejo integrado de doenças da soja em regiões tropicais. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PRAGAS, 1., 2009. *Anais eletrônicos ...* Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2009. 1 CD-ROM.
- 17 MEYER, M. C. et al. Soybean green stem and foliar retention syndrome caused by *Aphelenchoides besseyi*. 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs40858-017-0167-z.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2018.
- 18 DMITRIEV, A. P. Signal molecules for plant defense responses to biotic stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 50, n. 3, p. 417-425, 2003.
- 19 HSIAO, T. C. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 24, p. 519-570, 1973. doi: 10.1146/annurev.pp.24.060173.002511.
- 20 RANULFI A. C. *Utilização de técnicas espectroscópicas no estudo e caracterização de doenças em citros: HLB (greening) e cancro cítrico*. 2014. 137 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo; São Carlos, 2014.
- 21 PEREIRA, F. M. V. et al. Evaluation of the effects of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on inoculated citrus plants using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometrics tools. *Talanta*, v. 83, n. 2, p. 351–356, 2010.
- 22 PEREIRA, F. M. V.; MILORI, D. M. B. P. Investigation of the stages of citrus greening disease using micro synchrotron radiation X-ray fluorescence in association with chemometric tools. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 25, n. 3, p. 351–355, 2010.
- 23 PEREIRA, F. M. V. et al. Laser-induced fluorescence imaging method to monitor citrus greening disease. *Computers and Electronics in Agriculture*, v. 79, n. 1, p. 90–93, 2011.

- 24 FERREIRA, E. C. et al. Determination of Ca in breakfast cereals by laser induced breakdown spectroscopy. *Food Control*, v. 21, n. 10, p. 1327-1330, 2010
- 25 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori et al. *Method, apparatus and system for diagnosis of stresses and diseases in higher plants*. WO 2010069017 A1, 14.Oct. 2009, 24 June 2010.
- 26 MILORI, D. M. B. P. et al. *Índice de humificação obtido através da fluorescência induzida por laser*. 2004. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/30163/1/BPD072004.pdf>>. Acesso em 23 jan. 2017.
- 27 NICOLODELLI, G. et al. Quantification of total carbon in soil using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS): a method to correct interference lines. *Applied Optics*, v. 53, n. 10, p. 2170–2176, 2014.
- 28 NICOLODELLI, G. et al. Double-pulse laser induced breakdown spectroscopy in orthogonal beam geometry to enhance line emission intensity from agricultural samples. *Microchemical Journal*, v. 133, p. 272–278, 2017. doi: 10.1016/j.microc.2017.03.047
- 29 RANULFI, A. C. et al. Nutritional characterization of healthy and *Aphelenchoides besseyi* infected soybean leaves by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). *Microchemical Journal*, v. 141, p. 118–126, 2018. doi: 10.1016/j.microc.2018.05.008
- 30 CARDINALI, M. C. D. B. et al. Infrared spectroscopy: a potential tool in huanglongbing and citrus variegated chlorosis diagnosis. *Talanta*, v. 91, n. 1, p. 1–6, 2012.
- 31 VILLAS-BOAS, P. R. et al. Laser-induced breakdown spectroscopy to determine soil texture: a fast analytical technique. *Geoderma*, v. 263, p. 195–202, 2016.
- 32 NICOLODELLI, G. et al. Quantification of total carbon in soil using laser-induced breakdown spectroscopy: a method to correct interference lines. *Applied Optics*, v. 53, n. 10, p. 2170–2176, 2014.
- 33 MARANGONI, B. S. et al. Phosphorus quantification in fertilizers using laser induced breakdown spectroscopy (LIBS): a methodology of analysis to correct physical matrix effects. *Analytical Methods*, v. 8, n. 1, p. 78–82, 2016.
- 34 SEGNINI, A. et al. Physical and chemical matrix effects in soil carbon quantification using laser-induced breakdown spectroscopy keywords soil c content, spectral correction, soil textural classes, field-based method, atomic emission. *American Journal of Analytical Chemistry*, v. 5, n. 5, p. 722-729, 2014.
- 35 CORRÊA, A.G.; ZUIN. V.G. *Química verde: fundamentos e aplicações*. São Carlos: Edufscar; 2009. 172 p.
- 36 SENESI, G. S. et al. Elemental composition analysis of plants and composts used for soil remediation by laser-induced breakdown spectroscopy. *Clean - Soil, Air, Water*, v. 42, n. 6, p. 791–798, 2014.
- 37 SANTOS, D. et al. Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: a review. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 71–72, p. 3–13, 2012. doi: 10.1016/j.sab.2012.05.005

38 TREVIZAN, L. C. et al. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of macronutrients in plant materials. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 63, n. 10, p. 1151-1158, 2008.

39 YAO, M. et al. *Identification of nutrition elements in orange leaves by laser induced breakdown spectroscopy*. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=5453578>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

40 DA-CHENG, Z, 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*, v. 27, n. 6, p. 063202, 2010.

41 TREVIZAN, L. C. et al. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of micronutrients in plant materials. *Spectrochimica Acta Part B* v. 64, n. 5, p. 369-377, 2009.

42 SANKARAN, S.; EHSANI, R.; MORGAN, K. T. Detection of anomalies in citrus leaves using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). *Applied Spectroscopy*, v. 69, n. 8, p. 913-919, 2015. doi: 10.1366/14-07767.

43 SOUZA, P. F. et al. Determination of silicon in plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 83-84, p. 61-65, 2013. doi: 10.1016/j.sab.2013.02.004

44 GALIOVÁ, M. et al. Utilization of laser induced breakdown spectroscopy for investigation of the metal accumulation in vegetal tissues. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 62, n. 12, p. 1597-1605, 2007.

45 FERREIRA, E. C. et al. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for multielemental determination in soils under sewage sludge application. *Talanta*, v. 85, n. 1, p. 435-440, 2011.

46 NICOLODELLI, G. et al. Signal enhancement in collinear double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy applied to different soils. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 111, p. 23-29, 2015. doi: 10.1016/j.sab.2015.06.008.

47 ARAB, M. et al. Characterization of pollution indices in soil surrounding a power plant by laser induced breakdown spectroscopy. *Analytical Letters*, v. 48, n. 2, p. 360-370, 2014. doi: 10.1080/00032719.2014.942911

48 RANULFI, A. C. et al. Evaluation of the nutritional changes caused by HLB to citrus plants by laser-induced breakdown spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, v. 71, n. 7, p. 1471-1480, 2017.

49 SANTOS, D. et al. Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: a review. *Spectrochim Acta Part B*, v. 71-72, p. 3-13, 2012. doi: 10.1016/j.sab.2012.05.005.

50 PIEPMEIER, E. H.; MALMSTADT, H. V. Q-switched laser energy absorption in the plume of an aluminum alloy. *Analytical Chemistry*, v. 41, n. 6, p. 700-707, 1969.

- 51 SCOTT, R. H.; STRASHEIM, A. Laser induced plasmas for analytical spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 25, n. 7, p. 311-316, 1970.
- 52 CREMERS, D. A.; RADZIEMSKI, L. J.; LOREE, T. R. Spectrochemical analysis of liquids using the laser spark. *Applied Spectroscopy*, v. 38, n. 5, p. 721-729, 1984.
- 53 NICOLODELLI, G. et al. Double pulse laser induced breakdown spectroscopy: A potential tool for the analysis of contaminants and macro/micronutrients in organic mineral fertilizers. *Science of the Total Environment*, v. 565, p. 1116-123, 2016.
- 54 CHAVES, N. et al. Aphelenchoides besseyi Christie (Nematoda: Aphelenchoididae), agente causal del amachamiento del frijol común. *Tropical Plant Pathology*, v. 38, n. 383, p. 243-252, 2013.
- 55 SALOMÃO, R. *Identificado o provável causador da soja louca 2*. 2015. Disponível em: <<https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Agricultura/Soja/noticia/2015/06/identificado-o-possivel-causador-da-soja-louca-2.html>>. Acesso em: 30 abr 2018.
- 56 NETTO. *Informações importantes sobre Soja Louca II*. 2011. Disponível em: <<http://juparanacultivar.blogspot.com/2011/03/informacoes-importantes-sobre-soja.html>>. Acesso em: 05 fev 2018.
- 57 MUSAZZI, S.; PERINI, U. *Laser-induced breakdown spectroscopy: theory and applications*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2014. Series in Optical Sciences, v.182.
- 58 CREMERS, D. A.; RADZIEMSKI, L. J. *Handbook of laser-induced breakdown spectroscopy*. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. 407 p.
- 59 MIZIOLEK, A. W.; PALLESCHI, V.; SCHECHTER, I. *Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): fundamental and applications*. Cambridge: Cambridge University Press; 2006. 640 p.
- 60 INSTITUT FÜR PLANETOLOGIE. *Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) - how it works*. Disponível em: <<https://www.uni-muenster.de/Planetology/en/ifp/research/geologischeplanetologie/LIBS.html>>. Acesso em: 15 out 2018.
- 61 MOLL, M. et al. Inverse bremsstrahlung heating beyond the first Born approximation for dense plasmas in laser fields. *New Journal of Physics*, v. 14, n. 6, p. 065010, 2012.
- 62 ANABITARTE, F.; COBO, A.; LOPEZ-HIGUERA, J. M. Laser-induced breakdown spectroscopy: fundamentals, applications, and challenges. *ISRN Spectroscopy*, v. 2012, 2012. doi:10.5402/2012/285240.
- 63 NOLL, R. *Laser-induced breakdown spectroscopy*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. 427 p.
- 64 KRAMIDA, A.; RALCHENKO, YU.; READER, J.; NIST ASD Team. *NIST Atomic Spectra Database* (ver. 5.6.1). Disponível em: <https://physics.nist.gov/asd>. Acesso em: 20 dez 2018.

- 65 HERRERA, K. K. et al. Comparative study of two standard-free approaches in laser-induced breakdown spectroscopy as applied to the quantitative analysis of aluminum alloy standards under vacuum conditions. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 24, n. 4, p. 426, 2009.
- 66 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*, v. 74–75, p. 162-168, 2012. doi: 10.1016/j.sab.2012.06.012.
- 67 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*, v. 66, n. 4, p. 347-419, 2012.
- 68 TOGNONI, E.; CRISTOFORETTI, G. Basic mechanisms of signal enhancement in ns double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy in a gas environment. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 29, n. 8, p. 1318, 2014.
- 69 NICOLODELLI, G. et al. Determination of Pb in soils by double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy assisted by continuum wave-diode laser-induced fluorescence. *Applied Optics*, v. 57, n. 28, p. 8366, 2018.
- 70 GAUTIER, C. et al. Quantification of the intensity enhancements for the double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy in the orthogonal beam geometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 60, n. 2, p. 265-276, 2005.
- 71 AHMED, R.; BAIG, M. A. A comparative study of single and double pulse laser induced breakdown spectroscopy. *Journal of Applied Physics*, v. 106, n. 3, p. 033307, 2009.
- 72 BOGAERTS, A.; CHEN, Z.; AUTRIQUE, D. Double pulse laser ablation and laser induced breakdown spectroscopy: A modeling investigation. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 63, n. 7, p. 746–754, 2008.
- 73 BABUSHOK, V. I. et al. Double pulse laser ablation and plasma: laser induced breakdown spectroscopy signal enhancement. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 61, n. 9, p. 999-1014, 2006.
- 74 STRATIS, D. N.; ELAND, K. L.; ANGEL, S. M. Dual-pulse LIBS using a pre-ablation spark for enhanced ablation and emission. *Applied Spectroscopy*, v. 54, n. 9, p. 1270-1274, 2000.
- 75 CRISTOFORETTI, G. et al. Effect of target composition on the emission enhancement observed in double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 63, n. 2, p. 312-323, 2008.
- 76 RASHID, B. et al. A comparative study of single and double pulse of laser induced breakdown spectroscopy of silver. *Physics of Plasmas*, v. 18, n. 7, p. 073301, 2011. doi: 10.1063/1.3599591
- 77 CRISTOFORETTI, G. et al. Characterization of a collinear double pulse laser-induced plasma at several ambient gas pressures by spectrally- and time-resolved imaging. *Applied Physics B*, v. 80, n. 4–5, p. 559–568, 2005.

- 78 NOLL, R. et al. Space- and time-resolved dynamics of plasmas generated by laser double pulses interacting with metallic samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004;v. 19, n. 4, p. 419-428, 2004. doi.org/10.1039/B315718K.
- 79 KUWAKO, A.; UCHIDA, Y.; MAEDA, K. Supersensitive detection of sodium in water with use of dual-pulse laser-induced breakdown spectroscopy. *Applied Optics*, v. 42, n. 30, p. 6052–6056, 2003.
- 80 UEBBING, J. et al. Reheating of a laser-produced plasma by a second pulse laser. *Applied Spectroscopy*, v. 45, n. 9, p. 1419-1423, 1991.
- 81 ANGEL, S. M. et al. LIBS using dual- and ultra-short laser pulses. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 369, n. 3–4, p. 320–327, 2001.
- 82 TOGNONI, E. et al. From sample to signal in laser-induced breakdown spectroscopy: a complex route to quantitative analysis. In: MIZIOLEK, A. W.; PALLESCHI, V.; SCHECHTER, I. (Ed.) *Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): fundamental and applications*. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. p. 121-170.
- 83 RUSSO, R. E. Laser ablation. *Applied Spectroscopy*, v. 49, n. 9, p. 14A-28A, 1995.
- 84 CHAN, W. T.; RUSSO, R. E. Study of laser-material interactions using inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 46, n. 11, p. 1471-1486, 1991.
- 85 BORISOV, O. V.; MAO, X.; RUSSO, R. E. Effects of crater development on fractionation and signal intensity during laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 55, n. 11, p. 1693–1704, 2000.
- 86 CRISTOFORETTI, G. et al. Local thermodynamic equilibrium in laser-induced breakdown spectroscopy: beyond the mcwhirter criterion. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 65, n. 1, p. 86–95, 2010.
- 87 MCWHIRTER, R. W. P. Plasma diagnostic techniques In: HUDDLESTONE, R. H.; LEONARD, S. L. (Ed.) *Elements of plasma technology*. New York: Academic Press; 1965. cap. 5, p. 201–64.
- 88 GRIEM, H. R. *Principles of plasma spectroscopy*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 366 p.
- 89 UNNIKRISHNAN, V. K. et al. Calibration-free laser-induced breakdown spectroscopy for quantitative elemental analysis of materials. *Pramana*, v. 79, n. 2, p. 299–310, 2012.
- 90 KONJEVIĆ, N.; DIMITRIJEVIĆ, M. S.; WIESE, W. L. Experimental stark widths and shifts for spectral lines of positive ions (a critical review and tabulation of selected data for the period 1976 to 1982). *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, v. 13, n. 3, p. 619-646, 1984. doi: 10.1063/1.555716.
- 91 CARVALHO, G. G. A. et al. Recent advances in LIBS and XRF for the analysis of plants. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry Chemistry*, v. 33, n. 6, p. 919-944, 2018.

- 92 HAHN D. W.; OMENETTO, N. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), part I: review of basic diagnostics and plasmaparticle interactions: still-challenging issues within the analytical plasma community. *Applied Spectroscopy*, v. 64, n. 12, p. 335–366, 2010.
- 93 PENG J. et al. Challenging applications for multi-element analysis by laser-induced breakdown spectroscopy in agriculture: a review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 85, Part C, p. 260–272, 2016. doi: 10.1016/j.trac.2016.08.015.
- 94 CIUCCI, A. et al. New procedure for quantitative elemental analysis by laser-induced plasma spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, v. 53, n.8, p. 960–964, 1999.
- 95 TOGNONI, E. et al. Calibration-free laser-induced breakdown spectroscopy: state of the art. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 65, n. 1, p. 1–14, 2010.
- 96 FU, H. et al. *Calibration methods of laser-induced breakdown spectroscopy*. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72888>>. Acesso em: 05 nov 2018
- 97 TOGNONI, E. Towards a calibration-less ICP-AES method for the determination of trace elements in aqueous solutions: double ratio plasma diagnostics combined with an internal standard. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 24, n. 5, p. 655–662, 2009.
- 98 WANG, L.; ZHANG, C.; FENG, Y. Controlled calibration method for laser induced breakdown spectroscopy. *Chinese Optical Letters*. v. 6, n. 1, p. 5–8. 2008.
- 99 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*, v.10, n. 8, p. 7434–7468, 2010.
- 100 FRANK, E. Using model trees for classification. *Machine Learning*, v. 32, n. 1, p. 63-76, 1998.
- 101 CARDINALI, M. C. D. B. *Diagnóstico de Huanglongbing (HLB) em citros utilizando técnicas fotônicas*. 2012. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo; São Carlos, 2012.
- 102 WITTEN, I. H.; FRANK, E. *Data mining: practical machine learning tools and techniques*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 483 p.
- 103 POWERS, D. M. W. Evaluation: from precision, recall and f-measure to roc, informedness, markedness & correlation. *Journal of Machine Learning Technologies*, v. 2, n. 1, p. 37–63, 2011.
- 104 WELZ, B. *Atomic absorption spectrometry*. Weinheim: Wiley, 1999. 941 p.
- 105 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*, v. 54, n. 11, p. 1953–1957, 2011.
- 106 RADZIEMSKI, L. J. et al. Time-resolved laser-induced breakdown spectrometry of aerosols. *Analytical Chemistry*, v. 55, n. 8, p.1246–1252, 1983.

- 107 YRUELA, I. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 17, n. 1, p. 145–156, 2005.
- 108 RAYAR, A. J. Effect of calcium concentration on growth and ion uptake in soybean plants in solution culture. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, v. 105, n. 1, p. 59–64, 1981.
- 109 WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Calcium in plants. *Annals of Botany*, v. 92, n. 4, p. 487–511, 2003.
- 110 PATTERSON, G. *Calcium nutrition in plants*. Certified crop adviser. Disponível em: <<http://ccaontario.com/uploads/pdfs/CalciumNutritioninPlants.pdf>>. Acesso em: 14 jan 2019.
- 111 MASCARENHAS, H. A. A. et al. Potassium for Soybeans. *Better Crops*, v. 88, n. 3, p. 26–27, 2004. Disponível em: <[https://ipni.net/ppiweb/bcrops.nsf/\\$webindex/5721EBEA7B7DD5CF88256ED2005BF520/\\$file/04-3p26.pdf](https://ipni.net/ppiweb/bcrops.nsf/$webindex/5721EBEA7B7DD5CF88256ED2005BF520/$file/04-3p26.pdf)>. Acesso em: 20 dez 2018.
- 112 GERENDÁS, J.; FÜHRS, H. The significance of magnesium for crop quality. *Plant Soil* v. 368, n. 1–2, p. 101–28, 2013.
- 113 PIONEER. *Iron fertility in crop production*. Disponível em: <<https://www.pioneer.com/home/site/us/agronomy/iron-fertility-crop-production/>>. Acesso em: 20 dez 2018.