

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Determinação do estado nutricional da soja *in situ* por fluorescência de raios X**

**Thainara Rebelo da Silva**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração: Engenharia  
de Sistemas Agrícolas

**Piracicaba  
2022**

**Thainara Rebelo da Silva**  
**Bacharel em Engenharia Agrícola e Ambiental**

**Determinação do estado nutricional da soja *in situ* por fluorescência de raios X**  
versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **MURILO MESQUITA BAESSO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração: Engenharia  
de Sistemas Agrícolas

**Piracicaba**  
**2022**

Silva, Thainara Rebelo da

Determinação do estado nutricional da soja *in situ* por fluorescência de raios X/ Thainara Rebelo da Silva. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

70p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Fertilização foliar 2. XRF 3. Análise direta 4. Estatística multivariada

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me apresentado pessoas tão dedicadas em me apoiar. Por ter me dado uma família que sustenta meus passos e acredita nos meus sonhos.

Agradeço meu pai por nunca ter deixado faltar o suporte financeiro. Agradeço à minha mãe, por ser força nos momentos de fraqueza e por ter me ensinado tanto a correr atrás do que acredito. E à minha irmã, por sempre acreditar em mim e vibrar tanto com qualquer conquista minha, por menor que seja. Você é minha inspiração, minha irmã.

Aos meus amigos, que não me deixaram faltar consolo, carinho, suporte e alegrias: Max, Thamyres, Bia, Ju, Jéssica e Fabiano (vocês foram essenciais). Ao Tiago, por ter me acolhido desde que cheguei em Piracicaba, por ter me apresentado pessoas tão incríveis e por sempre estar presente (cara, obrigada de verdade!).

Agradeço ao meu orientador de iniciação científica da UFRRJ por ter me ensinado tanta coisa, por sempre respeitar minha escrita e sempre me moldar para melhorar. Anderson Gomide, parte dessa história é sua também, sou extremamente grata por todos ensinamentos que me formaram como profissional.

Ao meu orientador do mestrado, Murilo Baesso, obrigada por ter me dado a liberdade de traçar meu caminho nessa jornada de dois anos. Ao Hudson, por ter aberto as portas do LIN, que me acolheu com todo amor. Obrigada por toda dedicação, por me entender, ouvir, aconselhar e me mostrar, mais uma vez, que profissionais que se dedicam a ensinar com amor ao que faz, transformam tudo.

À ESALQ/USP por me fornecer um espaço tão casa e permitir minha formação. À CAPES por proporcionar recurso financeiro para que essa formação fosse possível. À FARMRESULT que me concedeu o espaço de crescer profissionalmente e aprender tantas coisas incríveis. À ICL que cedeu o espaço do experimento, amostras e sempre me receberam com muito carinho.

Ao LIN, que me apresentou pessoas excepcionais, inteligentes, capacitadas e humildes. Vocês me fizeram me sentir em casa. Em especial: Du (inclusive, você merecia um capítulo nessa dissertação, obrigada por sempre me ajudar com muita paciência), Gabrielzinho (obrigada por me responder até depois de meia noite, sempre com muito cuidado e dedicação) e Cami. E agradeço a mim, que me esforcei, me dediquei e dei tudo de mim pra que isso se tornasse possível. À vida: fica aqui minha eterna gratidão pelo caminho traçado.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>1.INFORMAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>9</b>
1.1. INTRODUÇÃO GERAL .....	9
1.2. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	11
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>13</b>
<b>2. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO <i>IN SITU</i> DE NUTRIENTES NA SOJA .....</b>	<b>14</b>
2.1. INTRODUÇÃO .....	17
2.1.1. CULTURA DA SOJA .....	17
2.1.2. DIAGNOSE FOLIAR.....	17
2.1.3. ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA POR PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE (ICP OES) .....	18
2.1.4. AGRICULTURA DE PRECISÃO (AP).....	19
2.1.5. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (XRF) .....	19
2.1.6. VARIÁVEIS LIMITANTES.....	21
2.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
2.2.1. OTIMIZAÇÃO DO TEMPO E NÚMERO DE PONTOS PARA DETERMINAÇÃO DE MACRO E MICRONUTRIENTES EM FOLHA DE SOJA .....	23
2.2.2. INFLUÊNCIA DA LAVAGEM DAS FOLHAS .....	26
2.2.3. INFLUÊNCIA DA UMIDADE FOLIAR .....	26
2.2.4. EFEITO DA NERVURA.....	26
2.2.5. INFLUÊNCIA DA IDADE DAS FOLHAS .....	28
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
2.3.1. OTIMIZAÇÃO DO TEMPO E NÚMERO DE PONTOS PARA DETERMINAÇÃO DE MACRO E MICRONUTRIENTES EM FOLHA DE SOJA .....	29
2.3.2. INFLUÊNCIA DA LAVAGEM DAS FOLHAS .....	32
2.3.3. INFLUÊNCIA DA UMIDADE FOLIAR .....	33
2.3.4. EFEITO DA NERVURA.....	37
2.3.5. INFLUÊNCIA DA IDADE DAS FOLHAS .....	37
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

<b>3.DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES <i>IN SITU</i> EM FOLHAS DE SOJA USANDO O EQUIPAMENTO DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X PORTÁTIL .....</b>	<b>44</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>44</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>45</b>
3.2.1. DETERMINAÇÃO DE MACRO E MICRONUTRIENTES <i>IN SITU</i> COM O XRF PORTÁTIL EM FOLHAS DE SOJA .....	49
3.2.2. PREPARO DA AMOSTRA E ANÁLISE XRF NO EQUIPAMENTO DE BANCADA.....	51
3.2.3. MODELAGEM ESTATÍSTICA: MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO.....	53
3.2.4. RECUPERAÇÃO DO MÉTODO A PARTIR DA METODOLOGIA CONVENCIONAL (ICP OES).....	54
3.3.1. RECUPERAÇÃO DO MÉTODO A PARTIR DA METODOLOGIA CONVENCIONAL (ICP OES).....	55
3.3.2. MODELAGEM ESTATÍSTICA: MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO.....	59
3.4 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS .....	65
<b>APÊNDICES – APÊNDICE A – .....</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>69</b>

## RESUMO

### **Determinação do estado nutricional da soja *in situ* por fluorescência de raios X**

Este trabalho teve dois objetivos principais, sendo o primeiro deles, verificar como parâmetros previamente estabelecidos afetavam a razão sinal/fundo espectral, bem como a precisão do sinal analítico da fluorescência de raios X, na determinação do estado nutricional *in situ* em folhas de soja. Foram investigados os efeitos do tempo de análise, da nervura foliar, lavagem das folhas, umidade foliar e idade das folhas, na determinação dos nutrientes. Em seguida, o estudo teve por objetivo o desenvolvimento de um método para transformar a fluorescência de raios X mensurada *in situ* nas folhas em concentração de macro (P, S, K e Ca) e micronutrientes (Fe, Mn, Cu e Zn). Sendo assim, o trabalho está composto por três capítulos, onde o primeiro é uma visão geral, contendo as informações que contemplam toda pesquisa. O segundo capítulo aborda o primeiro objetivo do trabalho, com a otimização dos parâmetros como tempo de análise, verificação da influência do uso de vácuo nas intensidades dos elementos, número de pontos de análise, e a influência das variáveis limitantes (nervura, lavagem, umidade e idade das folhas). O terceiro capítulo, aborda o segundo objetivo, com a comparação de quatro modelos diferentes, utilizando análises estatísticas de regressão linear simples, regressão linear múltipla, e multivariada “*Partial Least Square Regression*” (PLSR). O tempo de análise que apresentou menor coeficiente de variação para todos os elementos determinados foi de 60 s. O uso do vácuo demonstrou que os elementos leves, como P e S são os mais afetados. Ao comparar a análise em três pontos para macronutrientes e dois pontos para micronutrientes, não houve diferença significativa. A nervura foliar influenciou todos os macronutrientes e a intensidade do Cu. Folhas lavadas e não lavadas não apresentaram diferença significativa. A alteração da umidade foliar demonstrou uma variação de intensidade principalmente no P e S, no decorrer do tempo. E, já a idade da folha apresentou diferença significativa para P e Ca. Dos modelos comparados não houve grande diferença entre eles, e o desempenho avaliando o menor erro quadrado médio para macronutrientes foi utilizando regressão linear múltipla com as intensidades dos elementos e o Compton para P, S e K; e, PLSR com pré-processamento centrado na média para Ca. No caso dos micronutrientes, o melhor modelo para Fe e Zn, foi utilizando regressão linear simples com a intensidade do elemento; o Cu apresentou o mesmo erro para todos os modelos; para o Mn o PLSR com pré processamento de autoescalamento, obteve o menor erro. Os resultados demonstraram a possibilidade da determinação de nutrientes *in situ* utilizando o equipamento portátil de espectrometria de fluorescência de raios X (XRF). Visto que, as variáveis estudadas não demonstraram ser limitantes para o uso da técnica *in situ*, e os modelos preditivos apresentaram bons resultados.

**Palavras-chave:** Fertilização foliar, XRF, Análise direta, Estatística multivariada

## ABSTRACT

### **Determination of the nutritional status of soybean *in situ* by X-ray fluorescence**

This work had two main objectives, the first of which was to verify how previously established parameters affected the signal/spectral background ratio, as well as the precision of the X-ray fluorescence analytical signal, in determining the nutritional status *in situ* in soybeans leaves. The effects of analysis time, leaf vein, leaf washing, leaf moisture and leaf age on nutrient determination were investigated. Then, the study aimed to develop a method to transform the X-ray fluorescence measured *in situ* in the leaves into macro (P, S, K and Ca) and micronutrient (Fe, Mn, Cu and Zn) concentration. Thus, the work is composed of three chapters, where the first is an overview, containing the information that covers the entire research. The second chapter is about the first objective of the work, with the optimization of parameters such as analysis time, verification of the influence of the use of vacuum on the intensities of the elements, number of analysis points, and the influence of the limiting variables (vein, washing, moisture and age of the leaves). The third chapter, addresses the second objective, with the comparison of four different models, using statistical analyses of simple linear regression, multiple linear regression, and multivariate Partial Least Square Regression (PLSR). The analysis time that showed the lowest coefficient of variation for all the elements determined was 60 s. The use of vacuum showed that light elements such as P and S are the most affected. When comparing the analysis in three points for macronutrients and two points for micronutrients, there was no significant difference. Leaf vein influenced all macronutrients and Cu intensity. Washed and unwashed leaves showed no significant difference. The alteration of leaf moisture showed a variation of intensity, especially for P and S, over time. The age of the leaf showed a significant difference for P and Ca. Of the models compared there was no major difference between them, and the performance evaluating the smallest mean square error for macronutrients was using multiple linear regression with the element intensities and Compton for P, S and K; and, PLSR with mean centering preprocessing for Ca. For micronutrients, the best model for Fe and Zn, was using simple linear regression with element intensity; Cu showed the same error for all models; for Mn the PLSR with autoscaling preprocessing, obtained the lowest error. The results demonstrated the possibility of *in situ* nutrient determination using portable X-ray fluorescence spectrometry (XRF) equipment. Since the variables studied did not prove to be limiting for the use of the *in situ* technique, and the predictive models presented good results.

**Keywords:** Leaf fertilization, XRF, Direct analysis, Multivariate statistics





## 1. INFORMAÇÕES GERAIS

### 1.1. Introdução Geral

A soja (*Glycine max* (L) Merrill) é uma planta herbácea pertencente à família das leguminosas. De acordo com o IBGE (2021), a soja compõe os três principais produtos, juntamente com arroz e milho, do grupo de cereais, leguminosas e oleaginosas. Além disso, apresentou uma variação positiva de produção de 9,4% em relação ao ano anterior, com uma estimativa de 132,9 milhões de toneladas. Dentre as maiores regiões produtoras no Brasil em 2021, destacam-se o Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Paraná.

Os elementos essenciais na planta, ou seja, macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S) e micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Zn, B, Mo, Ni e Cl) desempenham uma função decisiva na nutrição das plantas, podendo afetar seu rendimento. Por isso, recomenda-se sua determinação em materiais vegetais para avaliar o estado nutricional das culturas econômicas (TREVIZAN *et al.*, 2009).

A utilização da fertilização foliar está relacionada ao manejo sustentável e a produtividade das culturas. Esta abordagem é utilizada quando a disponibilidade dos nutrientes é afetada pelas condições do solo; quando há altas taxas de perda de nutrientes; ou quando a demanda de acordo com o estágio de crescimento da planta, juntamente com as condições ambientais, age de forma a limitar a entrega de nutrientes aos órgãos mais críticos da planta (FERNÁNDEZ; BROWN, 2013). Sendo assim, a fertilização via foliar serve como alternativa para atenuar o problema de deficiência nutricional nos estádios nos quais a planta demanda uma maior quantidade de nutrientes, visando maiores produtividades e, também, reduzindo a quantidade de fertilizante aplicado ao solo (JEMO *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2020; SUZANA *et al.* 2012).

A técnica de espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES) é uma técnica amplamente utilizada para diagnose foliar. Ela se baseia no princípio de emissão atômica, utilizando como fonte de excitação o plasma de argônio, produzindo em um jato gasoso da amostra, átomos excitados dos elementos contidos, os quais emitem radiações em comprimentos de onda específicos. Devido a necessidade de a amostra estar no estado líquido e sem a presença de particulados, é de suma importância a etapa de preparação da amostra (SKOOG *et al.*, 2006). Deste modo, esta técnica requer mineralização da amostra com uso de ácidos fortes em sistemas de micro-ondas, é destrutiva, demorada e de custo elevado (CHOJNACKA *et al.*, 2018).

A espectroscopia de fluorescência de raios X surge como uma técnica alternativa, podendo ser utilizada tanto para aplicação científica quanto para industrial. Atualmente, XRF é uma técnica altamente aplicada nas ciências ambientais, mineração, química, metalurgia, além da agronomia. Tendo assim muitas vantagens, quando comparada a outras técnicas, como não ser destrutiva ao analisar amostras sólidas, capacidade de determinar múltiplos elementos, fácil uso, alta velocidade e precisão, e custo relativamente baixo (WEINDORF *et al.*, 2014).

A maior problemática atualmente na análise foliar para possíveis correções a base de fertilizantes, é que ao utilizar análises laboratoriais convencionais, a resposta não é imediata, e com isso a correção do problema só será estabelecida na safra que a sucede. O método não destrutivo, a partir da análise via sensor XRF, pode ser uma alternativa que atenda essa demanda de resposta em tempo real, sem a necessidade de preparo de amostra, permitindo a correção do problema durante o ciclo da cultura e, conseqüentemente, aumentando a produtividade da lavoura.

Todavia, ainda há alguns limitantes na utilização de sensores *in situ*. Por exemplo, quais são os fatores que podem influenciar a determinação dos elementos em condições reais diretamente em campo? Estabelecidos esses fatores, como corrigi-los? Esses pontos são cruciais para a concretização de um modelo que permita coletar uma amostra em campo e realizar a medida dos dados em tempo real, reduzindo custos com análises laboratoriais, tempo de preparo de amostra e tempo de resposta.

Nesse contexto, esse trabalho teve dois objetivos abordados. O primeiro deles buscou verificar como parâmetros previamente estabelecidos afetavam a razão sinal/fundo espectral, bem como a intensidade do sinal analítico da fluorescência de raios X. Foram investigados os efeitos do tempo de análise, da nervura foliar, lavagem das folhas, umidade foliar e idade das folhas, na determinação dos nutrientes P, S, K, Ca, Cu, Mn, Fe e Zn. Em seguida, o estudo teve por objetivo o desenvolvimento de um método para transformar a fluorescência de raios X mensurada *in situ* nas folhas em concentração de nutriente.

## 1.2. Considerações Gerais

O presente trabalho será composto por três capítulos, os quais são: (i) Capítulo I: que compreende este capítulo, com introdução geral sobre o que será abordado no trabalho, seguido do objetivo geral, e as considerações gerais sobre o trabalho; (ii) Capítulo II: contempla a otimização de parâmetros analíticos para determinação *in situ* de nutrientes na soja, detalhando cada parâmetro analisado; (iii) Capítulo III: contempla a parte de determinação da concentração de nutrientes *in situ* em folhas de soja usando o equipamento de fluorescência de raios X portátil, o qual expõe o modelo de calibração dos dados obtidos a partir de análises estatísticas.

Os equipamentos utilizados foram disponibilizados pelo Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN), pertencente ao CENA/USP e coordenado pelo Prof. Dr. Hudson Wallace Pereira de Carvalho. As análises químicas de ICP OES foram realizadas no Laboratório de Análises Ambientais do Departamento de Ciência do Solo - ESALQ/USP, coordenado pelo Luis Reynaldo Ferracciú Alleoni. Todas as amostras de folhas de soja foram coletadas no Centro de Inovação e Pesquisa ICL, situado em Iracemápolis – SP.

O equipamento de fluorescência de raios X portátil que foi utilizado em todas as etapas é o modelo “Tracer III-SD BRUKER”. A tecnologia é baseada na energia dispersiva de fluorescência de raios X, com tubo de raios X com anodo de ródio (Rh) como fonte de excitação e um “*silicon drift detector*” (SDD). Os componentes básicos do equipamento estão representados na Figura 1.



**Figura 1.** XRF portátil Tracer III-SD Bruker e seus componentes, adaptado de User Guide Bruker



## REFERÊNCIAS

CHOJNACKA, K.; SAMORAJ, M.; TUHY, L.; MICHALAK, I.; MIRONIUK, M.; MIKULEWICZ, M. Using XRF and ICP-OES in biosorption studies. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 2076, 2018.

FERNÁNDEZ, V.; BROWN, P. H. From plant surface to plant metabolism: the uncertain fate of foliar-applied nutrients. **Frontiers in plant science**, v.4, p.289, 2013.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE: Levantamento Sistemático da Produção Agrícola Estatística da Produção Agrícola**. Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag\\_2021\\_maio.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2021_maio.pdf)>. Acesso em: 5 abr. 2022.

JEMO, M.; NWOKE, C.; PYPERS, P.; VANLAUWE, B. Response of maize (*Zea mays*) to the application of foliar fertilizers in the Sudan and Guinea savanna zone of Nigeria. **Journal of Plant Nutrition Soil Science**, v. 178, p. 374–383, 2015.

MACHADO, F.R.; POSSENTI, J.C.; FANO, A.; VISMARRA E.S.; DEUNER, C. Desempenho de sementes de soja em função da época de aplicação de diferentes adubos foliares. **Vivências**, v. 16, n. 31, p. 107-122, 2020.

SKOOG, D. A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J; CROUCH, S.R. Fundamentos de Química Analítica. Ed. São Paulo: **Editora Thomson**, 2006.

SUZANA, C.S.; BRUNETTO, A.; MARANGON, D.; TONELLO, A.A.; KULCZYNSKI, S. M. Influência da Adubação foliar sobre a qualidade fisiológica das sementes de soja armazenadas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 2385-2392, 2012.

TREVIZAN, L.C.; SANTOS, Jr.; Samad, R.E.; VIEIRA JR, N.D.; NUNES, L.C.; RUFINI, I. A.; KRUG, F.J. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of micronutrients in plant materials. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.64, n.5, p.369-377, 2009.

WEINDORF, D.C.; BAKR, N.; ZHU, Y. Advances in portable X-ray fluorescence (PXRF) for environmental, pedological, and agronomic applications. In: *Advances in Agronomy*. **Academic Press**, p. 1-45, 2014.

## 2. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO *IN SITU* DE NUTRIENTES NA SOJA

### Resumo

As abordagens que buscam otimizar o uso de fertilizantes têm sido cada vez mais estudadas no sistema de produção agrícola, sendo a Espectrometria de Fluorescência de Raios X uma alternativa potencial, visto que permite determinar micro e macronutrientes com um desempenho satisfatório e preparo mínimo de amostra. Desta forma, considerando os parâmetros que podem influenciar no desempenho da análise *in situ*, o objetivo deste capítulo é otimizar o tempo de análise para determinar macro e micronutrientes e avaliar a influência das possíveis variáveis limitantes (lavagem das folhas, umidade foliar, nervura e idade das folhas). Foram feitos testes *in situ* em folhas de soja, para cada um dos parâmetros avaliados. O menor tempo de varredura considerando o menor coeficiente de variação para os macro e micronutrientes foi de 60 s. O uso do vácuo demonstrou que os elementos leves, como P e S são os mais afetados. Ao comparar a análise em três pontos para macronutrientes e dois pontos para micronutrientes, não houve diferença significativa. Das variáveis limitantes, as amostras não lavadas e as lavadas não apresentaram diferença significativa. A alteração da umidade foliar demonstrou uma variação de intensidade principalmente no P e S, no decorrer do tempo. A nervura da folha influenciou todos os macronutrientes e a intensidade do Cu, devendo assim ser evitada quando se utiliza a técnica XRF. Já a idade da folha apresentou diferença significativa para P e Ca, ambos da folha nova/folha diagnóstico e, folha diagnóstico/folha velha apenas para P. Em suma, as variáveis estudadas não demonstraram ser limitantes para o uso da técnica *in situ*, evidenciando apenas a necessidade de se estabelecer procedimentos padrões de análise.

**Palavras- chave:** Tempo de medida; Intensidade XRF; Variáveis limitantes

## Abstract

Approaches that seek to optimize the use of fertilizers have been increasingly studied in the agricultural production system, and X-ray Fluorescence Spectrometry being a potential alternative, since it allows the determination of micro and macronutrients with satisfactory performance and minimal sample preparation. Thus, considering the parameters that can influence the performance of *in situ* analysis, the objective of this chapter is to optimize the analysis time to determine macro and micronutrients and evaluate the influence of possible limiting variables (leaf washing, leaf moisture, leaf vein and leaf age). *In situ* tests were performed on soybean leaves for each of the parameters evaluated. The shortest scan time considering the lowest coefficient of variation for macro and micronutrients was 60 s. The use of vacuum showed that light elements such as P and S are the most affected. When comparing the three-point analysis for macronutrients and two-point analysis for micronutrients, there was no significant difference. Of the limiting variables, the unwashed and the washed samples showed no significant difference. The change in leaf moisture showed a variation in intensity mainly in P and S over time. The leaf vein influenced all macronutrients and the intensity of Cu, and should be avoided when using the XRF technique. The age of the leaf showed significant differences for P and Ca, both in the new leaf/ diagnostic leaf and in the diagnostic leaf/old leaf only for P. In conclusion, the variables studied have not proved to be limiting for the use of the *in situ* technique, highlighting only the need to establish standard procedures for analysis.

**Keywords:** Measurement time; XRF intensity; Limiting variables





## **2.1. Introdução**

### **2.1.1. Cultura da soja**

Considerando as principais variedades comerciais de soja cultivadas no Brasil, estas apresentam caule híspido, pouco ramificado e com a raiz de eixo principal com muitas ramificações. As folhas são trifolioladas, exceto o primeiro par de folhas simples, e possuem flores de fecundação autógama, desenvolvendo vagens. São classificadas em grupos de maturação que dependem do seu ciclo e, variando de acordo com a região (EMBRAPA).

Devido ao seu alto teor proteico, é a principal oleaginosa cultivada no mundo e, seu crescimento em comercialização em grande escala, iniciou a partir de 1970, quando houve um aumento da demanda internacional pelo grão (MEDEIROS; NAAS *et al.*, 2016; HOLTZ *et al.*, 2019). De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), no relatório de 2022, o Brasil atingiu o estágio de maior produtor e exportador mundial de soja. A Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), informa que a estimativa da safra de grãos 2021/22 poderá atingir 269,3 milhões de toneladas, sendo aproximadamente 142 milhões de toneladas referente à soja.

### **2.1.2. Diagnose foliar**

Os nutrientes desempenham funções essenciais nas plantas. Eles podem ser componentes estruturais, ativadores enzimáticos, reguladores de potenciais eletroquímicos e osmóticos, dentre outros papéis. A avaliação do estado nutricional de plantas geralmente é realizada através da diagnose foliar, devido ao fato da folha ser o órgão que melhor reflete o estado nutricional da cultura, tendo uma maior resposta às variações nos suprimentos de nutrientes. Além disso, a diagnose foliar química permite identificar deficiências nutricionais que provocam sintomas semelhantes, os quais podem dificultar a diagnose visual (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997; MALAVOLTA, 2006). A interpretação dos resultados de análise foliar tem sido discutida e utilizada com o intuito de possibilitar intervenções mais assertivas em sistemas de produção vegetal, utilizando métodos de manejo e adubação (URANO *et al.*, 2006).

### 2.1.3. Espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES)

Para a determinação quantitativa dos elementos traços em materiais vegetais, geralmente é utilizada a espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES) ou a espectrometria de massas (ICP MS). No entanto, essas técnicas requerem um tratamento químico da amostra que antecede a análise, a fim de decompor o material orgânico, na qual uma das mais utilizadas é a digestão assistida por micro-ondas com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (KALRA, 1998; CAMPOS *et al.*, 2015). A preparação da amostra é uma etapa importante quando se trata de análise elementar através de processos utilizando espectrometria de absorção atômica, devido ao tempo de preparação e as possibilidades de erros. Por isso, a amostra geralmente é digerida por ácido úmido ou por aquecimento em forno de micro-ondas, sendo esse com a vantagem de menor tempo de digestão, consumo de reagente e maior precisão (CINDRIĆ *et al.*, 2012).

O processo de digestão é a primeira etapa de uma análise química, que consiste em decompor a amostra na presença de um ácido, geralmente utilizando uma mistura de um ácido oxidante ( $\text{HNO}_3$ ) e um oxidante auxiliar ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  funciona de forma a melhorar a eficiência da digestão (SANTOS *et al.*, 2019). Para técnica de ICP OES a amostra deve se apresentar no estado líquido e sem a presença de particulados. (COSTA, 2018). Sendo assim, o emprego de micro-ondas como fonte de energia para a mineralização de amostras reduz o tempo de preparo das amostras e os problemas relacionados com as perdas dos componentes mais voláteis (ARRUDA; SANTELLI, 1997).

A ICP OES é uma técnica analítica que pode ser utilizada tanto para elementos majoritários quanto para traços, ela é multielementar e capaz de determinar uma ampla faixa de concentração dos elementos em uma mesma amostra. A amostra, em solução, é introduzida em um plasma de alta temperatura, por meio de um sistema nebulizador. A alta temperatura do plasma e a atmosfera inerte do gás argônio agem para diminuir as interferências não espectrais. O mecanismo de excitação é feito através da colisão, fazendo com que haja a passagem de elétrons do nível de menor energia para um nível de maior energia, formando espécies atômicas ou iônicas excitadas. Uma vez que os elétrons retornam ao seu estado fundamental, o excesso de energia é emitido na forma de radiação eletromagnética, onde os comprimentos de onda são característicos de cada elemento, e a intensidade está relacionada à sua concentração na amostra (SANTOS, 2007).

#### **2.1.4. Agricultura de precisão (AP)**

A AP surge como uma forma de gestão agrícola permitindo o manejo de lavouras com nível de detalhamento, considerando e tratando de forma adequada a variabilidade intrínseca (MOLIN *et al.*, 2015). Não considerar a variabilidade espacial das lavouras pode resultar em má gestão dos recursos de produção e, conseqüentemente, perdas por excesso ou uso ineficiente de insumos, além de potencialmente agredir o ambiente (KUANG *et al.*, 2012).

O sensoriamento remoto é uma das ferramentas que compõe a AP, utilizando de dispositivos capazes de extrair informações de um alvo, de acordo com o comportamento de reflectância nas diferentes regiões do espectro eletromagnético. Ele se vale, basicamente, da junção de uma fonte de radiação eletromagnética, um sistema composto por plataforma e sensor, e os objetos que serão sensoriados (FORMAGGIO; SANCHES, 2017).

Como o período em que a taxa de absorção de nutrientes é mais elevada compreende o início da floração (R1) e o início do enchimento dos grãos (R5), e a diagnose foliar é realizada na fase R2, o período de tomada de decisão é muito curto (Staut, 2007). E, para otimizar as práticas de fertilização, é essencial que os produtores avaliem a disponibilidade de nutrientes para as plantas, bem como monitore o desempenho das culturas, com tempo hábil para intervir no manejo. Sendo assim, é possível agir de acordo com as necessidades das culturas, não dependendo da fertilização por tradição ou por interpretações duvidosas.

A partir desse contexto, buscam-se métodos precisos, com menor custo e mais acessíveis para análises minerais de plantas e solos, dentre eles a técnica de espectroscopia de fluorescência de raios X para análise de plantas, pois oferece resultados rápidos, com pouca manipulação de amostras e menor custo (MAARSCHALKERWEERD; HUSTED, 2015).

#### **2.1.5. Espectroscopia de fluorescência de raios X (XRF)**

A análise instrumental por XRF é uma técnica qualitativa e quantitativa baseada na medida das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos químicos presentes na amostra, quando excitada. Após a excitação de elétrons das camadas internas dos elementos, ocorre o processo de relaxação, que pode ser radiativo, onde a energia é liberada na forma de um fóton na região de raios X (fluorescência), ou não-radiativo pela ejeção de um elétron Auger. A predominância de emissões de fótons de fluorescência ou elétrons Auger, depende basicamente, do número atômico do elemento na amostra, ou seja, em átomos leves a probabilidade de emissões de raios X é baixa, ao passo que em átomos mais pesados,  $Z > 30$ ,

a probabilidade de emissão de raios X é mais alta (FORMOSO; GOMES, 1984; PAREDES, 2012).

Resumidamente, os raios X primários emitidos pelo tubo de raios X, interagem com a amostra excitando os elementos que a constituem. Cada elemento emite uma linha espectral com energia característica, a qual está relacionada com a concentração deste elemento na amostra. Sendo assim, a análise XRF consiste em três fases principais ao interagir com a amostra: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios X característicos emitidos pela amostra e detecção desses raios X (NASCIMENTO, 1999).

A instrumentação XRF pode ser dividida em dois grupos baseados no sistema de detecção, sendo eles: modo dispersivo em comprimento de onda, proveniente do inglês *wavelength dispersive X-ray fluorescence* (WDXRF); e modo dispersivo em energia, do inglês *energy dispersive X-ray fluorescence* (EDXRF). O WDXRF apresenta alta resolução, maior sensibilidade, exatidão e precisão, devido ao fato de empregar um cristal analisador que seleciona os comprimentos de onda dos fótons de raios X. Em relação ao EDXRF, este utiliza detectores que são capazes de discriminar a energia dos raios X que atingem o detector, fazendo com que seja ideal para análises exploratórias e de amostras que sofrem danos pela incidência de radiação (ADAME, 2018; CARVALHO *et al.*, 2018).

Os raios X também podem ser espalhados pela amostra por meio de dois processos: dispersão coerente, onde não há perda de energia; e espalhamento Compton, onde há uma pequena perda de energia. O espalhamento Compton está relacionado com a matriz da amostra, ou seja, matrizes mais pesadas tem menos problemas com o *background* comparadas a matrizes mais leves. Isto, porque matrizes mais pesadas absorvem mais os raios X e dispersam menos, e o contrário acontece com matrizes mais leves, ou seja, dispersam mais e absorvem menos os raios X (FROTA, 2011). Montanha *et al.* (2020), utilizaram a região do Compton (Rh Ka) para normalizar as intensidades de Mn e Zn, utilizando o XRF, sendo uma das vertentes do estudo, analisar o transporte desses elementos ao longo de caules e folhas de soja. Byers *et al.* (2019), também utilizaram o Compton para corrigir o efeito matriz na quantificação de metais pesados em vegetais.

O sensor XRF portátil tem sido recentemente utilizado, demonstrando bons resultados para fins pedológicos, agrônômicos e ambientais, mostrando correlações eficientes com métodos laboratoriais padrão (WEINDORF *et al.*, 2014). No âmbito agrônômico, esse sensor tem sido explorado tanto para análises de solo quanto para análise foliar. Diversos trabalhos apresentaram que o sensor XRF tem grandes possibilidades de aplicação em avaliações de rotina para análise de fertilizante de solos (O'ROURKE *et al.*, 2016);

monitoramento de contaminação por metais pesados (SCOTT; WEINDORF; MATTHEWS, 2013; ROUILLON; TAYLOR, 2016); determinação da composição elementar em solos tropicais (RIBEIRO *et al.*, 2017); entre outros.

Alguns estudos utilizando a técnica de fluorescência de raios X estão sendo aplicados para análise foliar. Costa *et al.* (2020), utilizaram o sensor XRF para determinação de nutrientes em folhas de soja com o objetivo de demonstrar a viabilidade e os desafios do XRF portátil, para acessar o estado nutricional das folhas de soja em condições secas e *in vivo*. Gomes *et al.* (2019), conseguiram a partir da técnica de fluorescência de raios X, entender o processo de absorção e cinética de distribuição do Zn em curta distância, em folhas de soja.

#### **2.1.6. Variáveis Limitantes**

De acordo com Asfora (2010), na técnica de EDXRF alguns parâmetros fundamentais podem afetar o resultado das medidas, destacando-se a tensão e corrente do tubo de raios X. O fator de absorção da radiação pela amostra pode aumentar ou diminuir a intensidade dos sinais de fluorescência de raios X, ou seja, quanto menor o caminho percorrido pelos raios X e a densidade eletrônica da amostra, menor a probabilidade de influência. Além disso, os raios podem interagir com o ambiente antes de atingirem o detector, por isso o detector e o tubo de raios X devem estar posicionados o mais perto possível da amostra, fazendo com que as perdas por atenuação da radiação no ar diminuam.

A umidade da amostra influencia na magnitude do sinal da fluorescência de raios X. Isso ocorre devido à água presente na amostra absorver a radiação fluorescente e espalhar a radiação primária. Turner *et al.* (2018), identificaram que As e Zn foram detectados em amostras de folhas com diferentes concentrações entre os estados fresco e seco, atribuídas à massa de água presente e sua propensão a atenuar raios X. Dao (2016) também observou, ao contabilizar a água das folhas nos espectros de fluorescência de raios X, em milho cultivado em solos alterados por adubo e fertilizante, que onde houve presença de água na folha atenuou a fluorescência de raios X, dispersando a radiação significativamente.

O feixe vascular é o canal que conduz o aporte de nutrientes ao longo do tecido foliar. Dessa forma, é de se esperar que nele haja maior concentração de elementos. Montanha *et al.* (2020) observaram através da fluorescência de raios X essa diferenciação de nutrientes, utilizando um escaneamento linear 2D, nos quais dois elementos (Mn e Zn) estavam mais concentrados no veio da folha.

A idade da folha interfere na absorção de nutrientes da solução, ou seja, folhas mais novas tendem a absorver mais nutrientes do que folhas mais velhas. Em caso de folhas mais

velhas, devido o aumento da espessura da cutícula, a resistência a penetração de soluções a partir de aplicações foliares tende a aumentar. Além disso, folhas mais novas apresentam maior atividade metabólica, o que faz com que os nutrientes sejam consumidos mais rapidamente nos processos de síntese. Em relação aos sintomas que aparecem nas folhas por deficiência de nutrientes, elementos muito móveis como N, P, K e Mg apresentam primeiro sintomas em folhas velhas e elementos pouco móveis como S, Cu, Fe, Mn, Zn e Mo em folhas mais novas, devido ao sistema de redistribuição de nutrientes (FAQUIN, 2005).

A sujidade presente na amostra, devido a exposição das folhas no campo, pode causar interferências principalmente em elementos mais leves porque estes emitem radiação menos energética (CAETANO, 2018). A análise de planta utilizando o sensor XRF, em geral, requer algumas etapas de preparação, como: limpeza do material (lavagem); secagem; e homogeneização, que é feita através da moagem. E, quando se utiliza planta *in vivo*, recomenda-se que a amostra seja lavada (CARVALHO *et al.*, 2018).

Ao se tratar de agricultura de precisão e análise diretamente no campo o tempo de análise é um fator determinante. Como, normalmente, demoram alguns dias desde a coleta das amostras de folha até os resultados obtidos por métodos tradicionais, representa um desafio para o tempo de intervenção e possíveis correções de deficiências nutricionais. Estudos anteriores aplicando a técnica XRF, utilizaram tempo de integração de 90 s, todavia já existem metodologias que permitem a redução desse tempo (TAVARES *et al.*, 2020).

Frank *et al.* (1992) introduziram o uso do sensor XRF para análise direta em folhas, utilizando um método simultâneo para determinações de micronutrientes (Fe, Cu, Mn e Zn) e macronutrientes (P, K, Ca, Mg e S), tendo por objetivo comparar os resultados obtidos por folhas não-moídas, folhas moídas e folhas inteiras. Neste caso, os resultados obtidos para folhas não moídas foram concordantes com as folhas moídas. Em seguida, outros estudos foram feitos utilizando essa técnica, para avaliação de doenças em folhas de citrus com amostra *in natura* e material cominuído (BLONSKI *et al.*, 2007); comparação entre espectrômetro de bancada e sistema portátil para a determinação de Si, P, S, K, Ca, Mn e Fe, utilizado em variedades de cana-de-açúcar (GUERRA *et al.*, 2014); determinação de teores totais de elementos em milho, algodão, soja e trigo (MCLAREN; GUPPY; TIGUE, 2012); análise da folha de milho fresca, cultivadas em solos com diferentes condições de P (DAO *et al.*, 2016) e determinação de K, Ca, S e Si em folhas de cana-de-açúcar, utilizando EDXRF (GUERRA *et al.*, 2018).

Desta forma, considerando os parâmetros que podem influenciar no desempenho da análise *in situ*, o objetivo deste capítulo é otimizar o tempo de análise para determinar macro e micronutrientes e avaliar a influência das possíveis variáveis limitantes.

## 2.2. Material e Métodos

### 2.2.1. Otimização do tempo e número de pontos para determinação de macro e micronutrientes em folha de soja

A otimização do tempo de varredura foi estabelecida em uma amostra de folha de soja, analisada *in vivo*, utilizando o equipamento portátil de fluorescência de raios X, modelo Tracer III-SD BRUKER (Figura 2). Para escolha do tempo de varredura ideal, utilizou-se o coeficiente de variação (CV) de três medidas em cada tempo, na mesma área do limbo da folha. Foram considerados oito diferentes tempos: 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 e 240 segundos.



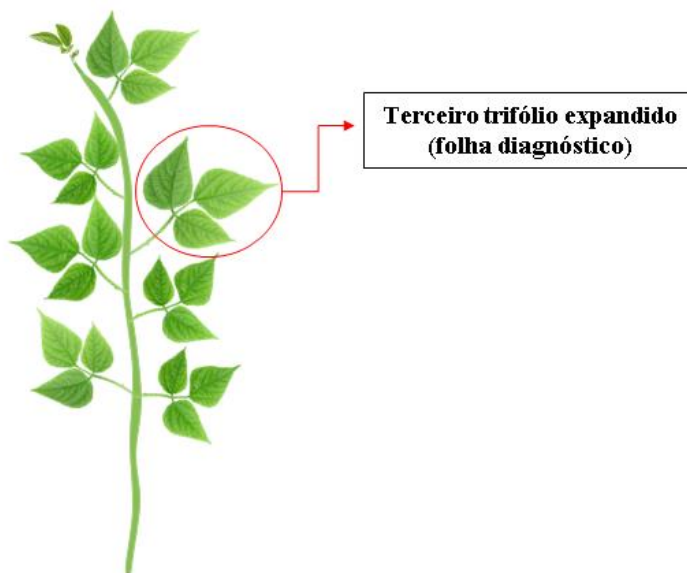
**Figura 2.** Aparato para otimização do tempo com XRF portátil da folha *in vivo*

Foram coletados os sinais dos macronutrientes: P, S, K e Ca; e os micronutrientes: Mn, Fe, Cu e Zn. A tensão e corrente utilizadas foram de 40 kV e 30  $\mu$ A, respectivamente, conforme sugerido por Montanha *et al.* (2020). Também foram avaliadas as condições com



vácuo e sem vácuo, através da relação da intensidade líquida do sinal com a radiação de fundo do espectro (sinal/fundo).

Em seguida, otimizaram-se o número de pontos, considerando um número mínimo que permitisse a determinação representativa de uma folha de soja, para macro e micronutrientes. Foram utilizadas dez amostras de folhas de soja de diferentes plantas, cultivadas sob as mesmas condições. As plantas estavam no estágio reprodutivo R2 e cada amostra coletada corresponde a folha diagnóstica (terceiro trifólio expandido), conforme disposto na Figura 3. As amostras foram lavadas com água deionizada, antes das medidas, a fim de remover possíveis interferências de sujeira.

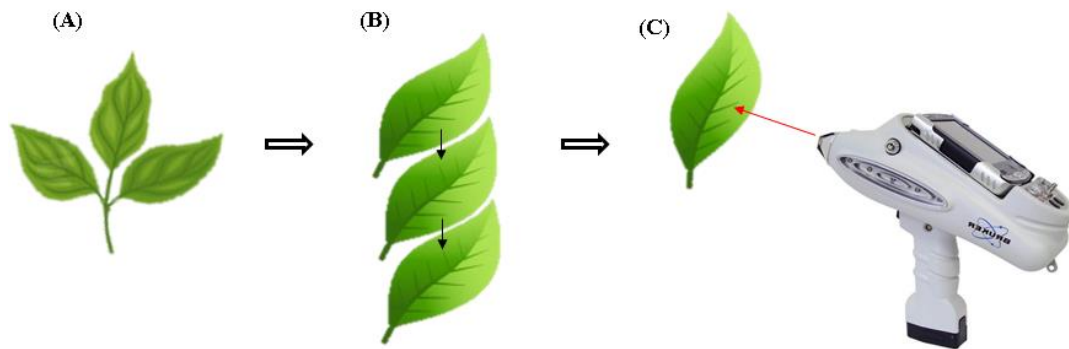


**Figura 3.** Representação do terceiro trifólio expandido (folha diagnóstica)

Considerando que as análises posteriores foram feitas *in situ* e, sendo assim, deve-se adotar um aparato simplificado para aquisição dos dados, no que diz respeito à estrutura, não foi utilizada a condição à vácuo nas etapas seguintes. Utilizaram-se duas condições nesta etapa: (i) para determinação de micronutrientes (Mn, Fe, Cu e Zn) e (ii) para macronutrientes (P, S, K, Ca). O tempo de varredura adotado em ambos os casos foi de 60 s.

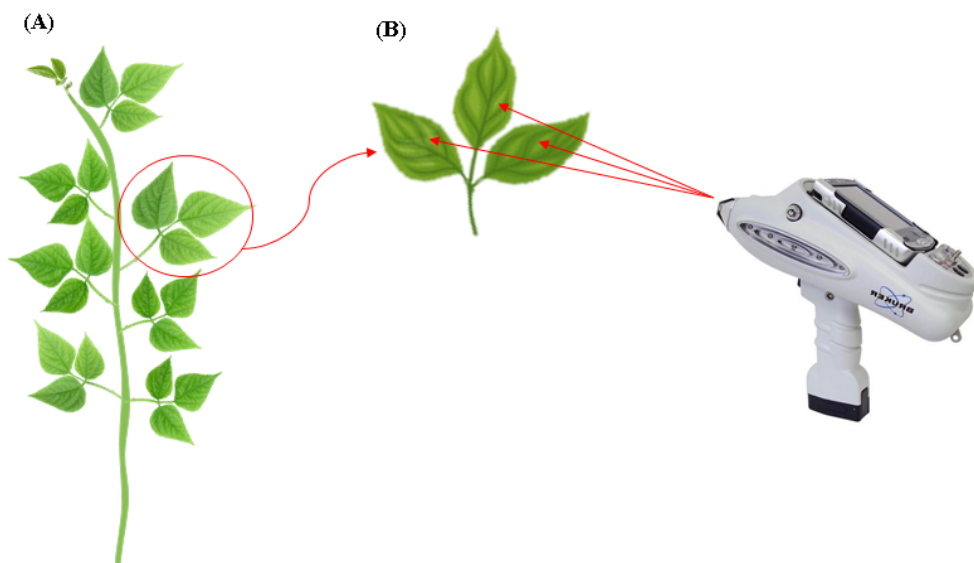
Na primeira condição (i), os três folíolos de uma folha de soja foram sobrepostos e dois pontos no limbo foram lidos (Figura 4). A sobreposição foi adotada neste caso, para otimizar o resultado da intensidade dos elementos, visto que a concentração desses elementos é baixa nas folhas (KIRKBY; ROMHELD, 2007). Além disso, foi utilizado o Filtro Amarelo da Bruker, com composição de 304,8  $\mu\text{m}$  de Al + 25,4  $\mu\text{m}$  de Ti, por apresentar uma maior

relação sinal/ruído para micronutrientes quando comparado aos outros filtros disponíveis, conforme verificado por Costa *et al.* (2020).



**Figura 4.** (A) folha diagnóstica; (B) folíolos destacados e sobrepostos; (C) medida em um ponto com os folíolos sobrepostos

Já na segunda condição (ii) foram analisados três pontos, um em cada folíolo, no limbo da folha (Figura 5). Neste caso, não foi utilizado nenhum filtro, uma vez que os filtros absorvem as linhas de emissão que apresentam maior probabilidade de excitação de P e S (COSTA *et al.*, 2020).



**Figura 5.** (A) folha diagnóstica; (B) medida em 3 pontos no limbo de cada folíolo

Para comparação de médias foi utilizado teste F para os macronutrientes (três pontos) e o teste t para os micronutrientes (dois pontos), com nível de significância de 5%, avaliando o p-valor para identificar se houve diferença significativa entre as médias.

### 2.2.2. Influência da lavagem das folhas

Foram medidas cinco amostras de folha de soja (folha diagnóstico) antes e após a lavagem com água deionizada. Duas condições foram utilizadas, considerando macronutrientes e micronutrientes, como já descrito no item 2.2.1. Na determinação de micronutrientes foram lidos dois pontos antes e dois pontos após a lavagem, com os folíolos sobrepostos. Já para macronutrientes foram medidos três pontos, um em cada folíolo, antes e após a lavagem da folha.

Para avaliar se houve diferença significativa entre os dois grupos (antes de lavar e após lavar a folha), utilizou-se do teste t para comparação de médias, considerando um nível de significância de 5%.

### 2.2.3. Influência da umidade foliar

Para análise da influência da umidade foliar foram coletadas cinco amostras de folha de soja em diferentes plantas para macro (uma medida no folíolo central) e micronutrientes (uma medida com os três folíolos sobrepostos). Cada amostra foi coletada e analisada em uma mesma área, durante uma hora, considerando os tempos: 0, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 min; totalizando 11 medidas por amostra. Antes de cada medida com o equipamento de XRF portátil, as amostras foram pesadas em uma balança semi analítica para o posterior cálculo da perda de umidade acumulada (%) em base úmida, como disposto na Equação 1.

$$U(\%) = \frac{(M_i - M_n)}{M_i} \times 100 \quad (1)$$

Onde,

U (%) = Perda de umidade acumulada, em porcentagem;

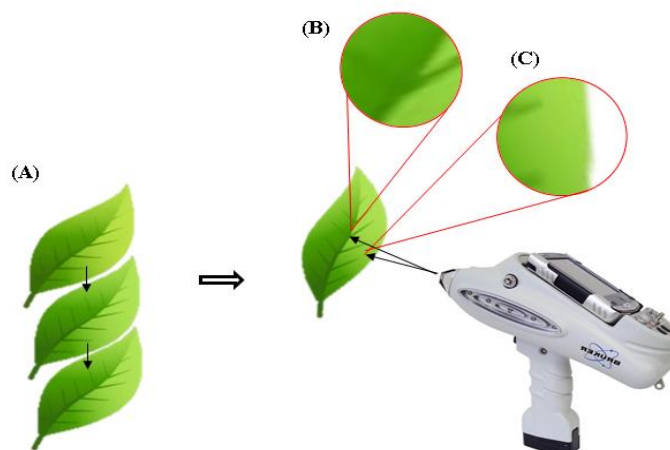
$M_i$  = massa inicial da amostra, em g (0 min);

$M_n$  = massa em g, nos diferentes tempos.

O comportamento das intensidades líquidas dos elementos foi avaliado no decorrer do tempo e perda de umidade na folha.

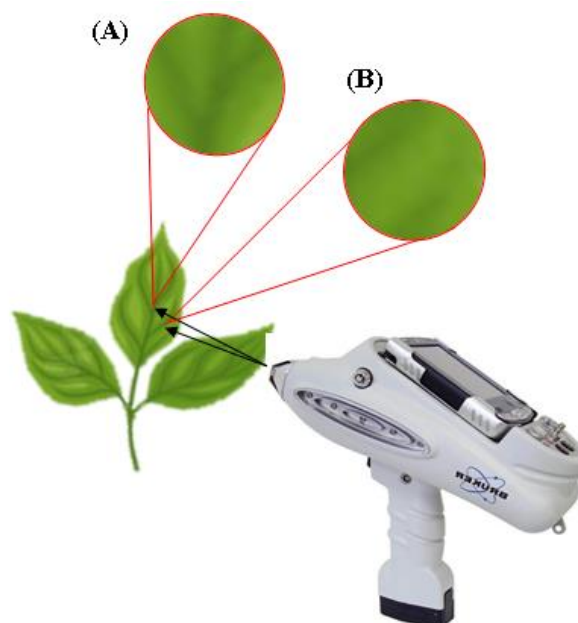
### 2.2.4. Efeito da nervura

Foram coletadas 5 amostras de folha de soja (folha diagnóstico) de diferentes plantas. A determinação de micronutrientes foi conduzida em folíolos sobrepostos (Figura 6A), em um ponto na nervura da folha (Figura 6B) e um ponto no limbo da folha (Figura 6C).



**Figura 6.** (A) folíolos sobrepostos; (B) medida em um ponto da nervura; (C) medida em um ponto do limbo

Já no caso dos macronutrientes, foi feita a medida em um ponto na nervura (Figura 7A) e um ponto no limbo do folíolo central (Figura 7B).

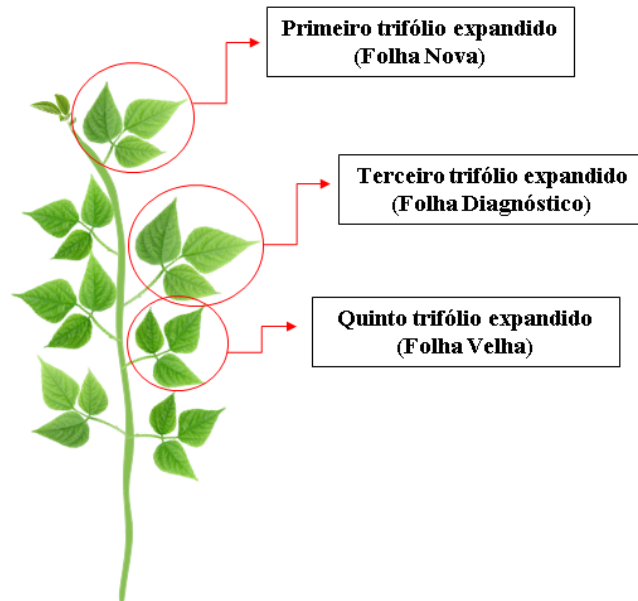


**Figura 7.** (A) medida em um ponto da nervura do folíolo central; (B) medida em um ponto do limbo do folíolo central

Para avaliar se houve diferença significativa entre os dois grupos (limbo e nervura), utilizou-se do teste t para comparação de médias, considerando um nível de significância de 5%.

### 2.2.5. Influência da idade das folhas

Foram coletadas amostras de cinco plantas diferentes, com subamostras considerando três idades foliar, sendo elas: Folha Nova (primeiro trifólio expandido), Folha Diagnóstico (terceiro trifólio expandido) e Folha Velha (quinto trifólio expandido), como disposto na Figura 8. As amostras foram lavadas com água deionizada antes das medidas.



**Figura 8.** Esquema das diferentes idades das folhas coletadas

Para determinação de micronutrientes foi lido um ponto, com os três folíolos sobrepostos, após a lavagem. No caso dos macronutrientes foi feita a medida em um ponto do folíolo central, após a lavagem. Foi aplicado o teste F para comparação das médias, considerando um nível de significância de 5% e, quando necessário, posterior aplicação do teste t para comparação dos pares.

## 2.3. Resultados e Discussão

### 2.3.1. Otimização do tempo e número de pontos para determinação de macro e micronutrientes em folha de soja

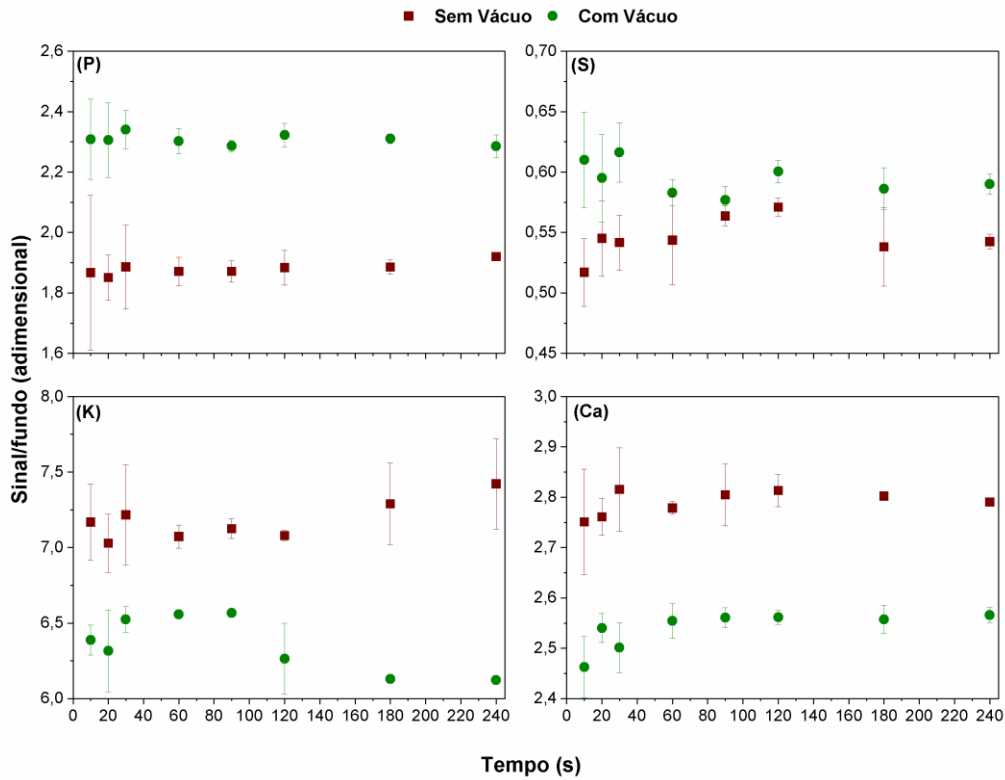
Os valores do CV da triplicata dos macronutrientes (P, S, K, Ca) e os micronutrientes (Mn, Fe, Cu e Zn), nos diferentes tempos analisados, estão dispostos na Tabela 1, considerando a condição sem vácuo.

**Tabela 1.** Coeficiente de variação, em porcentagem (CV), dos macronutrientes (P, S, K, Ca) e micronutrientes (Mn, Fe, Cu, Zn) em diferentes tempos, sem vácuo

Tempo (s)	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn
10	6,4	3,5	1,4	1,4	1,1	4,0	21,4	15,2
20	2,0	4,1	0,1	1,4	1,6	2,4	11,1	26,9
30	3,6	2,9	0,5	2,2	1,6	3,5	6,6	14,4
60	1,6	5,6	0,1	0,8	1,0	0,7	5,2	9,2
90	0,9	1,5	0,2	0,8	0,3	3,0	5,5	5,8
120	1,3	0,3	0,1	0,5	0,5	1,5	6,6	1,5
180	0,3	2,7	0,2	0,4	0,8	2,0	5,3	1,5
240	0,3	1,2	0,1	0,2	0,5	1,1	2,3	6,3

De acordo com os resultados do CV dos macronutrientes, em todos os tempos foi considerado como baixo (<10%). Em relação aos micronutrientes, Cu e Zn apresentaram valores médios ( $10\% < CV < 20\%$ ) e altos ( $CV > 20\%$ ). Sendo assim, o menor tempo que se adequaria um CV baixo para todos os elementos, tanto micronutrientes quanto macronutrientes é o de 60 s.

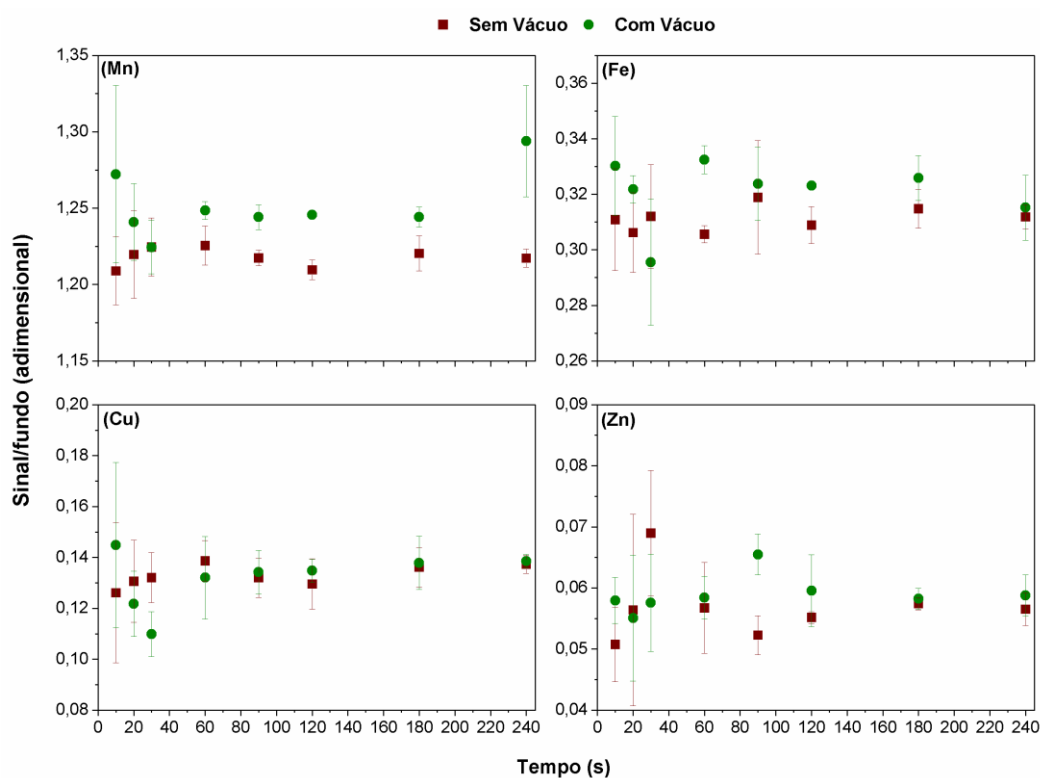
Na Figura 9 está disposta a comparação da condição sem vácuo e com vácuo, considerando a relação sinal/fundo, que consiste na intensidade do sinal em razão da radiação de fundo do espectro, no decorrer do tempo para macronutrientes.



**Figura 9.** Sinal/fundo (adimensional) x tempo (s) da condição com vácuo e sem vácuo, para macronutrientes

Ao avaliar a influência do uso do vácuo na intensidade do XRF em amostras padrões de S e quartzo, Bac *et al.* (2003) perceberam que para elementos de baixo número atômico, como Si e S o efeito do vácuo nas intensidades das linhas  $K\alpha$  no espectro de raios X apresentou um incremento na intensidade quando utilizado o vácuo. Além disso, a utilização do vácuo elimina completamente o efeito da linha  $K\alpha$  do argônio (BAC *et al.*, 2003). Este resultado também foi observado neste trabalho, o elemento S apresentou um incremento utilizando o vácuo, juntamente com o P que possui características químicas próximas. Já o Ca e K apresentaram comportamentos parecidos, visto que possuem número atômico próximo,  $Z=20$  e  $Z=19$ , respectivamente.

Na Figura 10 está disposta a mesma comparação, todavia com os micronutrientes para condição de vácuo e sem vácuo.



**Figura 10.** Sinal/fundo (adimensional) x tempo (s) da condição com vácuo e sem vácuo, para micronutrientes

Ao observar a comparação das duas condições, com e sem vácuo, para micronutrientes, é possível observar que nos diferentes tempos, em sua maioria, os dados não seguem um padrão, demonstrando não haver uma influência forte como observado anteriormente para os elementos de baixo número atômico (S e P).

Os valores apresentados na Tabela 2 são referentes a média das intensidades de dez folhas, em contagem por segundo (cps), para cada elemento, na medida de um ponto, a média de dois pontos e a média de três pontos, além do p-valor para cada elemento. No caso dos micronutrientes, como os folíolos foram sobrepostos foram analisados somente dois pontos, sendo assim não há resultado na média de três pontos.



**Tabela 2.** Intensidade dos elementos (cps) das dez folhas com um, dois e três pontos e o p-valor

Elemento	1 ponto	2 pontos	3 pontos	p-valor
Mn	4,8	4,8	-	0,859
Fe	19,3	19,4	-	0,705
Cu	14,7	15,0	-	0,033*
Zn	12,8	13,0	-	0,274
P	34,2	32,7	33,6	0,934
S	52,5	53,0	55,5	0,754
K	2190,2	2197,3	2249,6	0,929
Ca	1174,6	1173,8	1201,5	0,848

\* Diferença estatística significativa com nível de significância de 0,05.

O p-valor é considerado significativo quando menor que 0,05, considerando esse nível de significância. Dessa forma, somente o elemento Cu, através do teste t, obteve diferença significativa, obtendo p-valor de 0,033, todavia obtendo uma média muito próxima de 14,7 cps, com somente um ponto e de 15,0 cps na média de dois pontos.

### 2.3.2. Influência da lavagem das folhas

Após coletar os dados de cinco folhas de soja, obteve-se a média das intensidades para cada elemento em cps e foi feito o teste t para comparação das médias através do p-valor (Tabela 3).

**Tabela 3.** Média da intensidade dos elementos (cps) das cinco folhas antes e após a lavagem, e o p-valor

Elemento	Média sem lavar	Média após lavagem	p-valor
Mn	4,3	4,7	0,179
Fe	19,8	19,9	0,754
Cu	14,3	14,6	0,097
Zn	11,3	12,2	0,188
P	33,9	33,6	0,915
S	51,2	52,2	0,679
K	2260,8	2140,5	0,333
Ca	1138,3	1152,2	0,722

\* Diferença estatística significativa com nível de significância de 0,05.

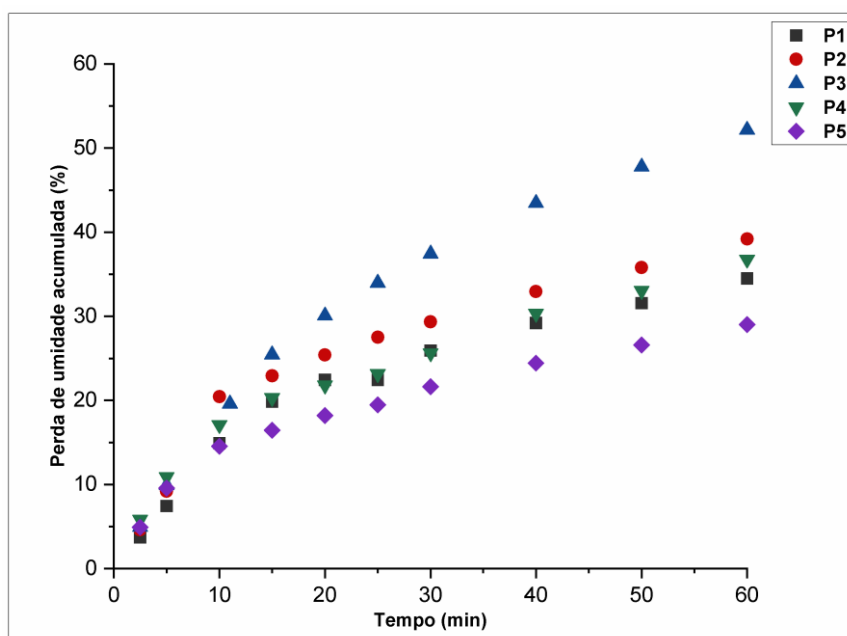
A partir dos resultados obtidos é possível observar que nenhum elemento foi afetado pela lavagem da folha. Quando se utiliza planta *in vivo*, recomenda-se que a amostra seja lavada superficialmente (CARVALHO *et al.*, 2018), no entanto, neste caso, não houve

diferença significativa entre as médias. Hargrove *et al.* (1985) observaram que a contaminação do solo nas folhas milho, soja, sorgo e trigo, só influenciaram significativamente na concentração de Fe e Al, não sendo necessária a lavagem da folha para a análise dos outros nutrientes essenciais.

Apesar de não ter apresentado diferença significativa, neste estudo, entre não lavagem e a lavagem das folhas, nas próximas etapas as folhas foram lavadas com água deionizada antes das medidas. Isto, porque por se tratar da criação de um método, o ideal é minimizar as variáveis que podem (visto que outras pesquisas encontraram interferências) influenciar o resultado final.

### 2.3.3. Influência da umidade foliar

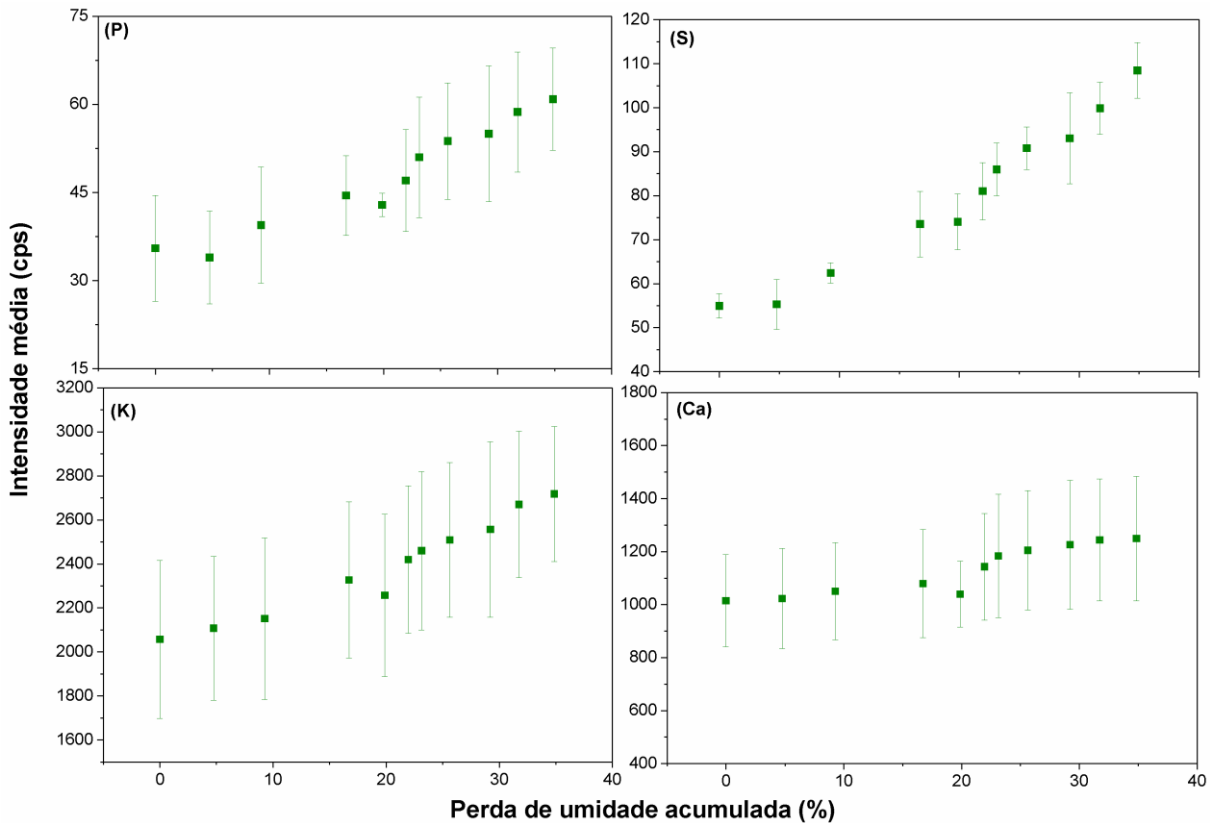
Cinco amostras de folha foram coletadas, pesadas e, analisadas no equipamento portátil XRF, em diferentes tempos. Na Figura 11 está disposta a relação da perda de umidade acumulada (%) no decorrer do tempo, nas amostras utilizadas para determinação de macronutrientes.



**Figura 11.** Perda de umidade acumulada (%) x tempo (min), para macronutrientes.

Ao observar o comportamento da perda de umidade acumulada (%) no decorrer do tempo, constata-se que nos primeiros 10 min nos quais a folha foi retirada da planta, a folha perdeu de 15 a 20% de umidade, demonstrando ser o momento mais crítico.

Na Figura 12, tem-se no eixo das ordenadas a média das intensidades dos macronutrientes P, S, K e Ca *versus* a média da perda de umidade acumulada (%) no decorrer do tempo.



**Figura 12.** Média da intensidade dos macronutrientes x perda de umidade acumulativa (%)

Os elementos K e Ca obtiveram comportamento similar conforme a perda de umidade da folha, tendo o K aumentado ligeiramente mais quando comparado ao ponto inicial e final dos dois elementos. No caso do P e S, o S foi mais sensível a variação de umidade, apesar de serem elementos com características químicas parecidas, com baixa energia. Sapkota *et al.* (2020), avaliaram a influência da umidade em estrume, utilizando o XRF portátil em análise de composição elementar. Eles perceberam que o aumento da umidade afetou os elementos de baixa energia, devido a atenuação dos raios X.

Apesar dos diferentes comportamentos na variação da intensidade em decorrência da perda de umidade, todos os elementos apresentaram uma intensidade maior após 60 min em relação o tempo inicial, o que demonstra que a umidade influenciou a magnitude do sinal. Considerando a análise *in situ*, no qual o cenário inicial seria a coleta da folha e análise no equipamento XRF portátil, foi avaliado se houve diferença significativa nas intensidades, nos primeiros tempos: quando coletada (0 min), após 2 min e 30 s e após 5 min; foi feito o teste F, para os elementos P, S, K e Ca (Tabela 5).

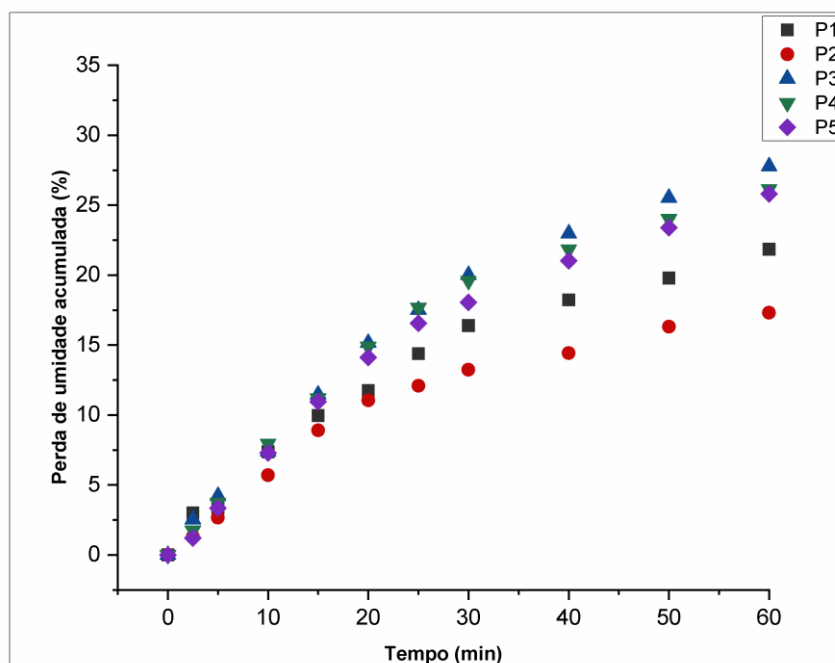
**Tabela 5.** Média das intensidades (cps) dos macronutrientes P, S, K e Ca em 3 tempos (0 min, 2 min 30 s, 5 min) e o p-valor de cada um

Elemento	Média 0 min	Média 2 min 30 s	Média 5 min	p-valor
P	34,8	35,2	40,2	0,514
S	53,8	55,0	62,2	0,008*
K	2101,2	2151,5	2228,5	0,830
Ca	1060,7	1063,5	1106,0	0,915

\* Diferença estatística significativa com nível de significância de 0,05.

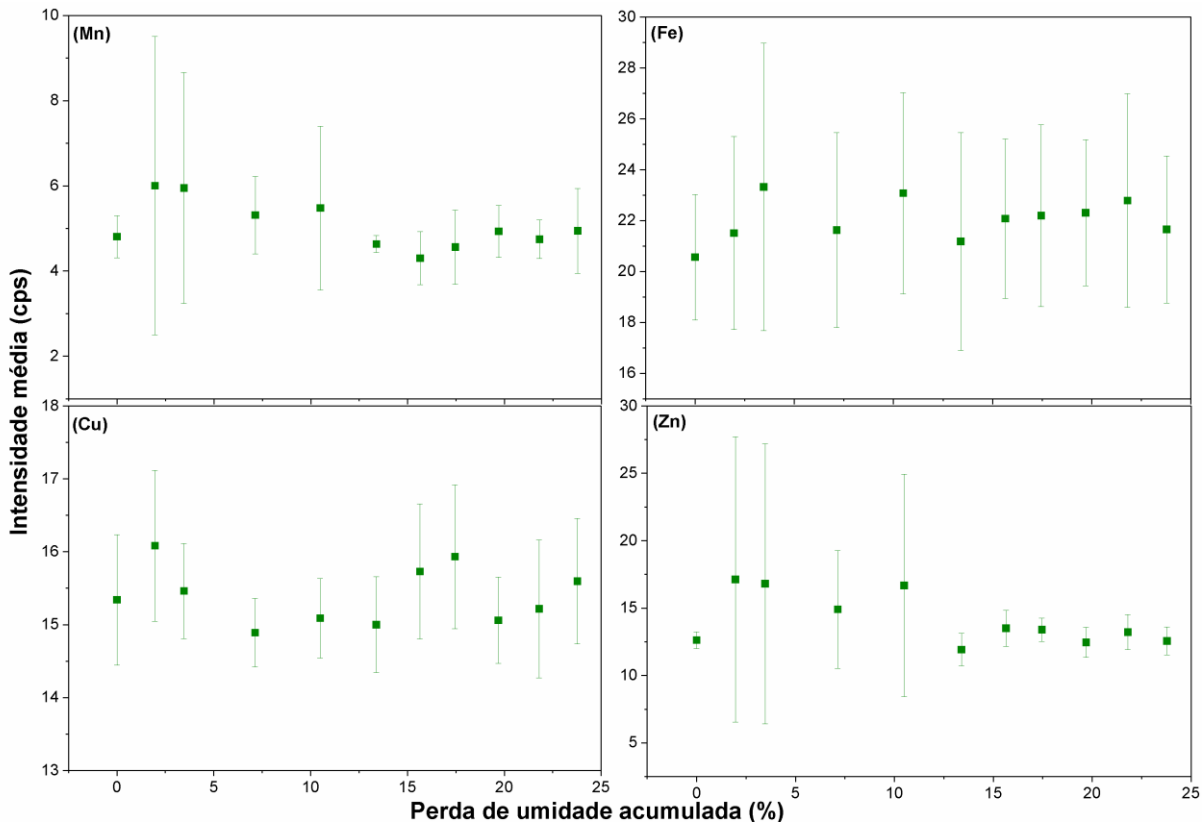
Nos três primeiros tempos, considerando da coleta até os primeiros 5 min, o S foi o único elemento que apresentou diferença significativa em pelo menos um dos pares. Para identificar em qual par, foi feito o teste t com o tempo de 0 min/2 min 30s e 0 min/5 min. O que apresentou diferença significativa foi de 0 min/5 min, com p-valor de 0,008; enquanto o tempo 0 min/2 min 30 s, apresentou um p-valor de 0,271. Sendo assim, o ideal ao analisar *in situ*, caso a análise não seja feita diretamente na planta, é analisar entre 2 min 30 s e 3 min após a coleta da folha, para que não haja interferência da umidade em um conjunto de amostras.

No que se refere aos micronutrientes, na Figura 13 está a perda de umidade acumulada (%) de 5 amostras e os diferentes tempos, em minutos.



**Figura 13.** Perda de umidade acumulada (%) x tempo (min), para micronutrientes

Na Figura 14, tem-se no eixo y a média das intensidades dos micronutrientes Mn, Fe, Cu e Zn de cinco plantas *versus* a média da perda de umidade acumulada (%) no decorrer do tempo.



**Figura 14.** Média da intensidade dos micronutrientes x perda de umidade acumulativa (%) em 5 folhas de soja.

O comportamento dos micronutrientes difere do comportamento dos macronutrientes, em relação a variação de intensidade com a perda de umidade, visto que apesar de haver variação também nos micronutrientes nos diferentes tempos, o ponto inicial e o ponto final não destoam muito.

Zhou *et al.* (2020) relata sobre as plantas apresentarem um conteúdo alto de água na sua composição, o que difere de outras matrizes, como solo ou rochas. Sendo assim, em seu trabalho, os pesquisadores visaram descrever como alguns fatores (por exemplo, umidade, espessura, densidade) influenciam na medida utilizando o XRF portátil quando analisada uma matriz vegetativa. Eles sugerem que uma abordagem para corrigir o efeito da umidade pode ser analisar algumas amostras úmidas e as secas e moídas desse conjunto via XRF portátil. E, nesse caso, as concentrações em amostras secas podem ser previstas *in situ* para amostras úmidas, sem calcular o teor de umidade.

### 2.3.4. Efeito da nervura

Na Tabela 7 estão dispostas as médias das intensidades (cps) de 5 folhas analisadas no limbo e na nervura, para micro e macronutrientes, além do p-valor.

**Tabela 7.** Médias da intensidade dos elementos das 5 folhas, considerando o limbo, a nervura e o p-valor

Elemento	Limbo	Nervura	p-valor
Mn	6,8	6,9	0,865
Fe	20,8	22,6	0,188
Cu	14,9	16,6	0,009*
Zn	14,1	14,0	0,951
P	26,4	52,7	2,0 E-05*
S	48,6	41,9	0,026*
K	1554,9	2337,8	1,3 E-04*
Ca	1251,8	1699,1	4,8 E-04*

\* Diferença estatística significativa com nível de significância de 0,05.

De todos os elementos, os únicos que não demonstraram diferença significativa na medida do limbo e da nervura foram Mn, Fe e Zn, com p-valor de 0,865, 0,188 e 0,951, respectivamente.

O feixe vascular está no veio e serve de aporte de nutrientes para os demais tecidos da folha, onde a absorção foliar é maior nas regiões da nervura principal e nas margens da folha, sendo menos intensa nas regiões do ápice e da base. Desta forma, é de se esperar que uma maior concentração de elementos nesta região. Frank *et al.* (1992) destacaram a influência da nervura central quando as frações de massas de nutrientes estão próximas ao nível crítico. Campos *et al.* (2015), ao utilizar a espectrometria de fluorescência de raios X para avaliar o acúmulo e distribuição espacial de As e P em samambaias, perceberam que o arsênio foi acumulado principalmente na nervura mediana, veias secundárias e regiões apicais e marginais da folha, causando alterações na distribuição de P.

### 2.3.5. Influência da idade das folhas

Na Tabela 8 está a média da intensidade (cps) de cinco plantas, cada uma com uma folha nova (FN), folha diagnóstico (FD) e folha velha (FV), além do p-valor obtido pelo teste F.

**Tabela 8.** Intensidade dos elementos das cinco folhas, considerando a FN, FD e FV e o p-valor.

<b>Elemento</b>	<b>FN</b>	<b>FD</b>	<b>FV</b>	<b>p-valor</b>
Mn	6,4	6,8	8,0	0,312
Fe	16,4	20,3	18,9	0,077
Cu	16,0	14,9	15,1	0,214
Zn	13,7	14,1	14,6	0,691
P	55,6	25,5	18,1	1,6 E-06*
S	33,6	45,7	47,1	0,165
K	1413,9	1547,4	1633,9	0,119
Ca	777,9	1254,9	1763,7	3,1 E-04*

\* Diferença estatística significativa com nível de significância de 0,05.

Os únicos elementos que apresentaram diferença significativa em pelo menos uma relação de par, foram o P e o Ca. Sendo assim, realizaram-se análises estatísticas adicionais com o teste t para comparação da média em par, avaliando-se o p-valor novamente (Tabela 9).

**Tabela 9.** P-valor da relação FN/FD e FD/FV.

<b>Elemento</b>	<b>FN/FD</b>	<b>FD/FV</b>
P	6,3 E-04*	0,040*
Ca	1,1 E-04*	0,099

\* Diferença estatística significativa com nível de significância de 0,05.

O P obteve diferença significativa tanto quando comparada a FN/FD, quanto a FD/FV. Já o Ca só demonstrou diferença significativa da FN/FD.

Em suma, o tempo que apresentou menor CV para todos os elementos determinados (P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn) foi 60 s, sendo este o tempo adotado em todo experimento; o uso de vácuo demonstrou maior influência em elementos mais leves como P e S; a lavagem das folhas não apresentou diferença significativa, nesta pesquisa, entretanto foi adotada a fim de eliminar qualquer possível interferência das posteriores análises; a nervura e idade das folhas, não apresentou diferença significativa para todos os elementos. De acordo com os resultados obtidos, a umidade foliar foi a que apresentou maior relevância, visto que afeta a magnitude de alguns elementos, principalmente os de menor número atômico (P e S). Foi adotado um padrão de análise, limitando um tempo de 2 min e 30 s após a coleta para análise das folhas de soja para determinar os macronutrientes.

As variáveis estudadas neste capítulo foram essenciais para estabelecer um método de análise das folhas de soja *in situ*, a fim de criar um modelo de predição para determinação

dos macronutrientes (P, S, K e Ca) e os micronutrientes (Mn, Fe, Cu e Zn), descritos no Capítulo 3.

## REFERÊNCIAS

- ADAME, A. 2018. **Análise direta de folhas de soja por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) e por fluorescência de raios X dispersiva em energia (EDXRF)**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2018.
- ARRUDA, M.A.Z.; SANTELLI, R.E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 638-643, 1997.
- ASFORA, V.K. 2010. **Fluorescência de Raios X por dispersão de energia aplicada à caracterização de tijolos de sítios históricos de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas Nucleares. Universidade Federal de Pernambuco, 2010.
- BAC, Vuong Thu; KREGSAMER, P.; MARKOWICZ, A. Elemental sensitivity method in XRF analysis of PM10 aerosol filters. **Nuclear Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 18-28, 2003.
- BLONSKI, M. S.; APPOLONI, C. R.; PARREIRA, P. S.; ARAGÃO, P. H. A.; NASCIMENTO FILHO, V. F. Elementary chemical analysis in leaves infected by fumagina by X-Ray fluorescence technique. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 851-860, 2007.
- BYERS, H.L.; MCHENRY, L.J.; GRUNDL, T.J. XRF techniques to quantify heavy metals in vegetables at low detection limits. **Food Chemistry: X**, v. 1, p. 100001, 2019.
- CAETANO, T. J. A. 2018. **Estudo de Otimização da Técnica XRF para Identificação de Ligas Metálicas em Partículas de Motores**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e Bioquímica, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2018.
- CAMPOS, N. V.; GUERRA, M.B.B.; MELLO, J.W.V.; SCHAEFER, C.E.G.; KRUG, F.J.; ALVES, E.E.; AZEVEDO, A.A. Accumulation and spatial distribution of arsenic and phosphorus in the fern *Pityrogramma calomelanos* evaluated by micro-X-ray fluorescence spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.30, n.12, p.2375-2383, 2015.
- CARVALHO, G.G.A.; GUERRA, M.B.B.; ADAME, A.; NOMURA, C.S.; OLIVEIRA, P.V.; CARVALHO, H.W.P.; KRUG, F.J. Recent advances in LIBS and XRF for the analysis of plants. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, n. 6, p. 919–944, 2018.



- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Produção nacional de grãos é estimada em 269,3 milhões de toneladas na safra 2021/2022.** Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4579-producao-nacional-de-graos-e-estimada-em-269-3-milhoes-de-toneladas-na-safra-2021-22#:~:text=A%20s%C3%A9tima%20estimativa%20da%20safra,obtida%20na%20safra%202020%2F21.>>. Acesso em: 12 abr. 2022.
- CINDRIĆ, I. J.; KRIZMAN, I.; ZEINER, M.; KAMPIĆ, Š.; MEDUNIĆ, G.; STINGEDER, G. ICP-AES determination of minor-and major elements in apples after microwave assisted digestion. **Food chemistry**, v.135, n.4, p.2675-2680, 2012.
- COSTA, G.T.J.; NUNES, L.C.; FERESIN GOMES, M.H.; ALMEIDA, E.; CARVALHO, H.W.P. Direct determination of mineral nutrients in soybean leaves under vivo conditions by portable X-ray fluorescence spectroscopy. **X-Ray Spectrometry**, v.49, n.2, p.274-283, 2020.
- COSTA, W.K.O.C. 2018. **Determinação de metais por ICP OES: decomposição por micro-ondas e análise direta de farinhas e desodorantes.** Tese (Doutorado) – Curso de Doutorado em Química, Universidade Federal de Pernambuco, 2018.
- DAO, T. H. Instantaneous accounting for leaf water in X-ray fluorescence spectra of corn grown in manure-and fertilizer-amended soils. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.129, p.84-90, 2016.
- EMBRAPA. **Características da soja.** Disponível em: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONTAG01\\_24\\_271020069131.html](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONTAG01_24_271020069131.html)>. Acesso em: 5 abr. 2022.
- FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas.** Lavras: UFLA, 2005.
- FORMAGGIO, A. R.; SANCHES, I. D. Sensoriamento remoto em agricultura. **Oficina de Textos**, 2017.
- FORMOSO, M. L. L.; GOMES, C.B. **Técnicas analíticas instrumentais aplicadas à geologia.** Ed. Blucher LTDA, p. 105-118, 1984.
- FRANK, K. D; BURCH, J.; DENNING, J. Mineral analysis of corn leaves by x-ray fluorescence on ground versus unground leaf samples. **Communications on Soil Science a Plant Analysis**, v.23, n. 17-20, p.2415-2424, 1992.
- FROTA, M. N. **Confiabilidade metrológica na determinação de espécies químicas em materiais siderúrgicos por espectrometria de fluorescência de raios-X.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Metrologia. PUC-Rio, 2011.
- GOMES, M. H.; MACHADO, B.A.; RODRIGUES, E.S.; MONTANHA, G.S.; ROSSI, M.L.; OTTO, R.; CARVALHO, H.W.P. In vivo evaluation of Zn Foliar uptake and transport in soybean using X-ray absorption and fluorescence spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.67, n.44, p.12172-12181, 2019.

- GUERRA, M. B. B.; ALMEIDA, E.; CARVALHO, G. G.; SOUZA, P. F.; NUNES, L. C.; JÚNIOR, D. S.; KRUG, F. J. Comparison of analytical performance of benchtop and handheld energy dispersive X-ray fluorescence systems for the direct analysis of plant materials. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 9, p. 1667-1674, 2014.
- GUERRA, M. B. B.; ADAME, A.; ALMEIDA, E. D.; BRASIL, M. A.; SCHAEFER, C. E.; KRUG, F. J. *In situ* determination of K, Ca, S and Si in fresh sugar cane leaves by handheld energy dispersive X-Ray fluorescence spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 29, p. 1086-1093, 2018.
- HARGROVE, W. L.; OHKI, K.; WILSON, D. O. Influence of washing on elemental analysis of leaves of fieldgrown crop plants. **Plant and soil**, v. 88, n. 1, p. 93-100, 1985.
- HOLTZ, V.; GRELLMANN, D.H.; AZEVEDO, R.O.; KOESTER, B.E.G.; JARDIM, C.C.S.; MASSOLA, M.P.; REIS, R.D.G.E. Perdas na colheita mecanizada de soja utilizando diferentes mecanismos na plataforma de corte. **PUBVET**, v.13, p.170, 2019.
- KALRA, Y. **Handbook of reference methods for plant analysis**. CRC Press, 1998.
- KIRKBY, E.A.; RÖMHELD, V. Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. **Informações Agronômicas**, v. 118, n. 2, p. 1-24, 2007.
- KUANG, B. MAHMOOD, H.S.; QURAIISHI, M.Z.; HOOGMOED, W.B.; MOUAZEN, A.M.; VAN HENTEN, E.J. Sensing Soil Properties in the Laboratory, In Situ, and On-Line: A Review. **Advances in Agronomy**, v. 114, n. 1, p. 155-223, 2012.
- MAARSCHALKERWEERD, M.V.; HUSTED, S. Recent developments in fast spectroscopy for plant mineral analysis. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 169, 2015.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Agronômica Ceres, 2006.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997.
- MCLAREN, T. I.; GUPPY, C. N.; TIGHE, M. K. A rapid and nondestructive plant nutrient analysis using portable X-ray fluorescence. **Soil Science Society of America Journal**, v. 76, n. 4, p. 1446-1453, 2012.
- MEDEIROS, P.; NAAS, I.D.A.; VENDRAMETTO, O.; SOARES, M. Post-harvest soybean loss during truck transport: a case study of Piauí State, Brazil. In: **IFIP International Conference on Advances in Production Management Systems**. Springer, Cham, 2016. p. 606-611.
- MOLIN, J. P.; AMARAL, L. R.; COLAÇO, A. **Agricultura de precisão**. São Paulo: Oficina de Textos, 2015.

- MONTANHA, G.S.; RODRIGUES, E.S.; MARQUES, J.P.R.; ALMEIDA, E.; REIS, A.R.; CARVALHO, H.W.P. X-ray fluorescence spectroscopy (XRF) applied to plant science: challenges towards in vivo analysis of plants. **Metallomics**, v. 12, n. 2, p. 183-192, 2020.
- NASCIMENTO FILHO, V. F. **Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) e por reflexão total (TXRF)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
- O'ROURKE, S. M.; STOCKMANN, U.; HOLDEN, N. M.; MCBRATNEY, A. B.; MINASNY, B. An assessment of model averaging to improve predictive power of portable vis-NIR and XRF for the determination of agronomic soil properties. **Geoderma**, v. 279, p. 31–44, 2016.
- PAREDES, Y.D.R.A. 2012. **Desenvolvimento e caracterização de dispositivos fosforescentes baseados em compostos orgânicos de baixo peso molecular**. Tese (Doutorado) – Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro-RJ, 2012.
- RIBEIRO, B. T.; SILVA, S.H.G.; SILVA, E.A; GUILHERME, L.R.G. Portable X-ray fluorescence (pXRF) applications in tropical Soil Science. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, n. 3, p. 245-254, 2017.
- ROUILLON, M.; TAYLOR, M. P. Can field portable X-ray fluorescence (pXRF) produce high quality data for application in environmental contamination research? **Environmental Pollution**, v. 214, p. 255–264, 2016.
- SANTOS, E.J. 2007. **Determinação de elementos formadores de hidretos e mercúrio em amostras ambientais e biológicas com amostragem em suspensão por geração química de vapor acoplada à espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- SANTOS, H. M.; COUTINHO, J.P.; AMORIM, F.A.C; LOBO, I.P.; MOREIRA, L.S.; NASCIMENTO, M.M.; JESUS, R.M. Microwave-assisted digestion using diluted HNO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for macro and microelements determination in guarana samples by ICP OES. **Food chemistry**, v.273, p.159-165, 2019.
- SAPKOTA, Y.; DRAKE, B.L.; MCDONALD, L.M.; GRIGGS, T.C.; BASDEN, T.J. Elemental composition and moisture prediction in manure by portable X-ray fluorescence spectroscopy using random forest regression. **Journal of Environmental Quality**, v. 49, n. 2, p. 472-482, 2020.
- SCOTT, J.; WEINDORF, D.C.; MATTHEWS, E.C. Lead contamination in schoolyard soils. **Soil Horiz**, 54, 2013.
- STAUT, L. A. Adubação foliar com nutrientes na cultura da soja. **Embrapa Agropecuária Oeste-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2007.

- TAVARES, T.R.; MOLIN, J.P.; JAVADI, S.H.; CARVALHO, H.W.P.; MOUAZEN, A.M. Combined use of vis-NIR and XRF sensors for tropical soil fertility analysis: Assessing different data fusion approaches. **Sensors**, v. 21, n. 1, p. 148, 2020.
- TURNER, A.; CHAN, C. C.; BROWN, M. T. Application of field-portable-XRF for the determination of trace elements in deciduous leaves from a mine-impacted region. **Chemosphere**, v. 209, p. 928-934, 2018.
- URANO, E. O. M.; KURIHARA, C.H.; MAEDA, S.; VITORINO, A.C.T.; GOLÇALVES, M.C., MARCHETTI, M.E. Avaliação do estado nutricional da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 9, p. 1421-1428, 2006.
- USDA – United States Department of Agriculture. **Oilseeds and products update**. Disponível em: <[https://usdabrazil.org.br/wp-content/uploads/2022/02/Oilseeds-and-Products-Update\\_Brasilia\\_Brazil\\_01-31-2022.pdf](https://usdabrazil.org.br/wp-content/uploads/2022/02/Oilseeds-and-Products-Update_Brasilia_Brazil_01-31-2022.pdf)>. Acesso em: 5 abr. 2022.
- WEINDORF, D.C.; BAKR, N.; ZHU, Y. Advances in portable X-ray fluorescence (PXRF) for environmental, pedological, and agronomic applications. In: **Advances in Agronomy**. Academic Press, p. 1-45, 2014.
- ZHOU, S.; WEINDORF, D.C.; CHENG, Q.; YANG, B.; YUAN, Z.; CHAKRABORTY, S. Elemental assessment of vegetation via portable X-ray fluorescence: Sample preparation and methodological considerations. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 174, p. 105999, 2020.

### 3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES *IN SITU* EM FOLHAS DE SOJA USANDO O EQUIPAMENTO DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X PORTÁTIL

#### Resumo

O uso da fluorescência de raios X para determinação de nutrientes em tecidos vegetais, sem processamento de amostras, tem demonstrado ser uma alternativa potencial para obter uma resposta rápida e direta no campo e servir como base para recomendação de manejo. A automatização e informatização de laboratórios, refletindo em volumes de dados cada vez maiores contendo informações relevantes à química das amostras, demonstra a necessidade de buscar métodos de processamento adequados para cada situação. Sendo assim, objetivou-se com este capítulo desenvolver um método de quantificação para transformar os espectros obtidos em concentração de cada nutriente. Os modelos preditivos de concentração apresentaram resultados satisfatórios com menores erros quadrático médios (RMSE) para macronutrientes de 432,5 (P), 204,0 (S) e 1956,6 (K) mg kg<sup>-1</sup>, utilizando regressão linear múltipla com as intensidades dos elementos e o compton. Já para Ca o menor RMSE (518,9) foi utilizando o PLSR com pré-processamento centrado na média. No caso dos micronutrientes, os valores de RMSE foram próximos para todos os elementos, sendo assim foi utilizado a regressão linear simples apenas com a intensidade do elemento. Os resultados dos modelos de predição demonstraram ser viável a utilização do XRF portátil para análise direta *in situ* para determinação de P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn.

**Palavras- chave:** Quimiometria; Modelos preditivos; Regressão Linear; PLSR

## Abstract

The use of X-ray fluorescence for the determination of nutrients in plant tissues, without sample processing, has shown to be a potential alternative to obtain a quick and direct response in the field and to serve as a basis for management recommendations. The automatization and informatization of laboratories, reflecting the ever-increasing volumes of data containing information relevant to the chemistry of the samples, demonstrates the need to look for suitable processing methods for each situation. Thus, the objective of this chapter was to develop a quantification method to transform the spectra obtained into concentrations of each nutrient. In addition, the method developed was validated against the reference method used, benchtop EDXRF, with the conventional method based on ICP OES. The concentration predictive models showed satisfactory results with lower RMSE for macronutrients of 432.5 (P), 204.0 (S) and 1956.6 (K) mg kg<sup>-1</sup>, using multiple linear regression with the element intensities and the Compton. Whereas for Ca the lowest RMSE (518.9) was using PLSR with mean centering preprocessing. In the case of micronutrients, the RMSE values were close for all elements, thus simple linear regression was used only with the intensity of the element. The results of the prediction models demonstrated the feasibility of using portable XRF for direct *in situ* analysis for the determination of P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, and Zn.

**Keywords:** Chemometrics; Predictive models; Linear Regression; PLSR



### 3.1. Introdução

A técnica de fluorescência de raios X para determinação de nutrientes em material vegetal na folha *in vivo* tem demonstrado resultados satisfatórios. Montanha *et al.* (2020) empregaram o XRF portátil e de bancada para avaliar as alterações na distribuição elementar dos tecidos vivos das plantas expostas aos raios X, além da cinética de captação em tempo real de  $Zn^{2+}_{(aq)}$  e  $Mn^{2+}_{(aq)}$  no caule e folhas da planta de soja, durante 48 horas. A partir deste estudo, eles concluíram que o XRF consiste numa ferramenta conveniente para estudos nutricionais *in vivo* e pode, inclusive, ser associado a outras técnicas analíticas. Adame (2018) utilizou em seu estudo a análise direta de folhas de soja por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) e por fluorescência de raios X dispersiva em energia (EDXRF), com o objetivo de acessar o estado nutricional da cultura da soja. Os resultados obtidos foram promissores visto que abriram a possibilidade de quantificação dos nutrientes em campo.

Costa *et al.* (2020) fizeram sua pesquisa na determinação de nutrientes minerais em folhas de soja sob condições *in vivo* utilizando XRF portátil. Os parâmetros instrumentais foram otimizados, a medida foi feita no tempo de 60 s sob condição de vácuo e 180 s em condição atmosférica, utilizaram o filtro de Ti para micronutrientes. Foram analisadas folhas secas e frescas, identificando linhas de emissão de P, K, Ca, Mn, Fe, Cu, e Zn e demonstrando que o XRF portátil é uma ferramenta simples e eficaz para determinação de nutrientes em plantas.

No contexto no qual os laboratórios analíticos estão sendo cada vez mais automatizados e informatizados, nota-se que o volume de dados adquiridos tem aumentado, dando origem a um conceito chamado “*big data science*”. Este conceito se refere a conjuntos de dados com alto volume e complexos, contendo informações úteis relacionadas à química (PARASTAR; TAULER, 2018). Contudo, possuir grande quantidade de dados não está relacionada a um resultado adequado, caso não sejam utilizadas as ferramentas de processamento de dados que condizem com o objetivo da análise. Esses dados devem ser previamente tratados, para posterior interpretação e retirada de informações úteis (JIMÉNEZ-CARVELO *et al.*, 2019).

Dentro dos termos que envolvem este tipo de análise na química analítica, está o de “Quimiometria”. De acordo com Kowalski (1975,1978), “quimiometria é a aplicação de ferramentas matemáticas e estatísticas químicas”; e “é a disciplina química que usa métodos



matemáticos e estatísticos para: planejar ou otimizar procedimentos experimentais, e extrair o máximo da informação química relevante, através da análise dos dados”.

A análise de regressão é um método para prever um resultado, chamada de variável resposta, a partir de uma ou mais variáveis consideradas preditoras. No caso da regressão linear o objetivo da análise é prever o comportamento de uma variável quantitativa, considerada dependente, em função de uma (quando regressão linear simples) ou mais variáveis independentes (regressão linear múltipla) (MOREIRA *et al.*, 2020). Dijair *et al.* (2020), utilizaram modelos de regressão linear para conversão de teores de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{Fe}$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{V}$ ,  $\text{Ti}$  e  $\text{Zr}$  obtidos pelo XRF portátil diretamente em campo com os dados obtidos por análises em laboratório.

Técnicas de estatística multivariada são empregadas para quantificar atributos por meio de espectros, sendo a técnica mais utilizada a PLSR (*Partial Least Square Regression*). O PLSR tem se destacado por ter compreensão relativamente fácil; permite avaliar grande quantidade de variáveis preditoras (como o espectro eletromagnético), evitando o fenômeno do sobreajuste (chamado de *over-fitting*); além da disponibilidade de softwares estatísticos que permitem realizar essa análise (TOBIAS, 1995). Segundo Varmuza e Filzmoser (2009), essa técnica se baseia na obtenção de variáveis latentes para os dados espectrais, por meio de combinações lineares, realizando a regressão destas variáveis criadas com os atributos a serem modelados. Sendo assim, as variáveis latentes maximizam a covariância entre as variáveis de predição (espectros) e de resposta (micro e macronutrientes).

Após a organização dos dados experimentais é necessário o procedimento de pré processamento dos dados, considerando o mais adequado para o caso em específico. A finalidade de processar os dados antes da aplicação de alguma técnica estatística é reduzir as variações que não são desejadas e não foram removidas durante a aquisição dos dados, as quais podem influenciar o resultado final. A escolha adequada do pré processamento é decisiva para se ter uma análise multivariada bem sucedida.

Quando as variáveis possuem alta faixa de variação dos dados ou diferentes unidades, o autoescalamamento é um pré processamento recomendado, pois torna o efeito de cada variável equivalente. O autoescalamamento é a subtração de cada elemento de uma coluna da matriz pelo o valor médio dessa coluna e, posteriormente, a divisão do resultado pelo desvio padrão da coluna.

Outro tipo de pré processamento é a centragem dos dados na média, que é o mais utilizado quando se trata de dados espectrais, isso porque a direção da maior variância em torno da média pode ser outra e o intercepto do modelo, chamado de termo constante também

é eliminado. Neste caso, a variância interna dos dados não é alterada. Sendo assim, este método se baseia no cálculo do valor médio de cada coluna, subtraído de cada um dos valores desta coluna de dados (FERREIRA, 2015).

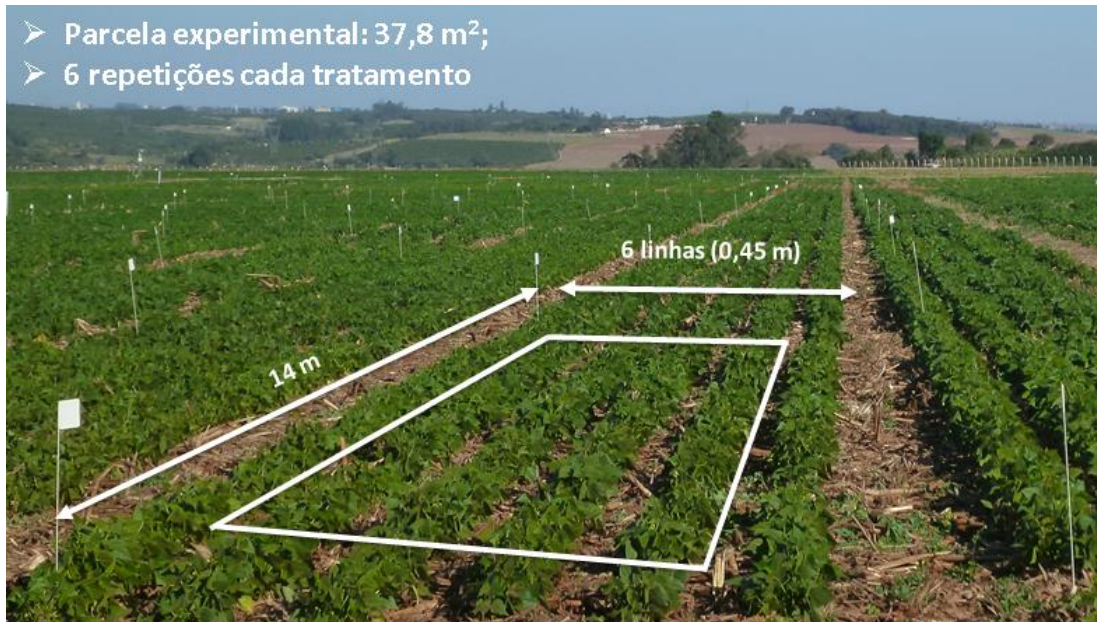
A aplicação de técnicas estatísticas por meio da quimiometria vem sendo utilizada no meio agrônomo, de forma a extrair informações a partir de dados obtidos por sensoriamento remoto. E, considerando a técnica de fluorescência de raios X, estudos combinando os métodos estatísticos com a informação espectral vem sendo explorado. Romeu *et al.* (2021) em seu trabalho, construíram mapas a partir de dados hiperespectrais adquiridos do  $\mu$ -XRF aplicados a sementes de soja, combinada com a quimiometria para rastrear a remobilização elementar. Tavares *et al.* (2020), avaliaram o desempenho do uso individual e combinado de sensores XRF e vis-NIR na predição de parâmetros de solo usando diferentes modelagens de fusão de dados, incluindo o PLSR.

Sendo assim, objetivou-se com este capítulo desenvolver um método de quantificação para transformar os espectros obtidos através do XRF em concentração de nutriente (P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn).

## **3.2. Material e Métodos**

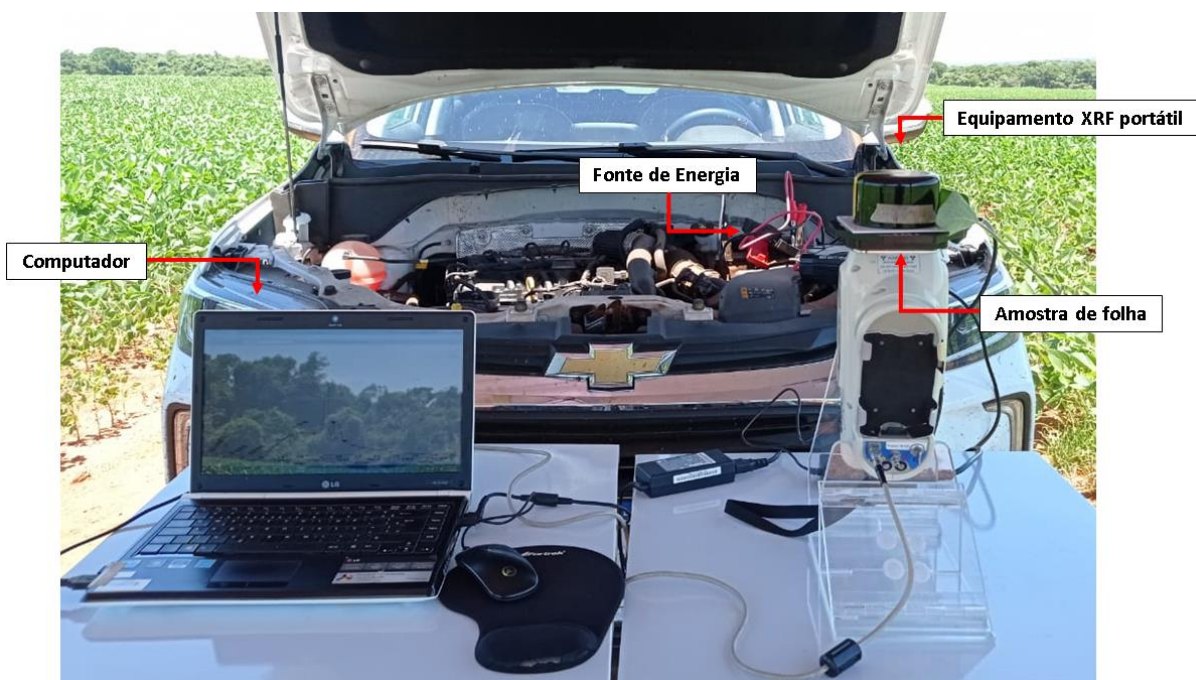
### **3.2.1. Determinação de macro e micronutrientes *in situ* com o XRF portátil em folhas de soja**

Na área experimental do Centro de Pesquisa e Inovação da ICL – Iracemápolis/SP, foram coletadas 652 amostras de folha de soja, considerando a folha diagnóstica (terceiro trifólio expandido). A distribuição da coleta foi feita em uma parcela de 37,8 m<sup>2</sup> e foram coletadas duas amostras por parcela (Figura 15).



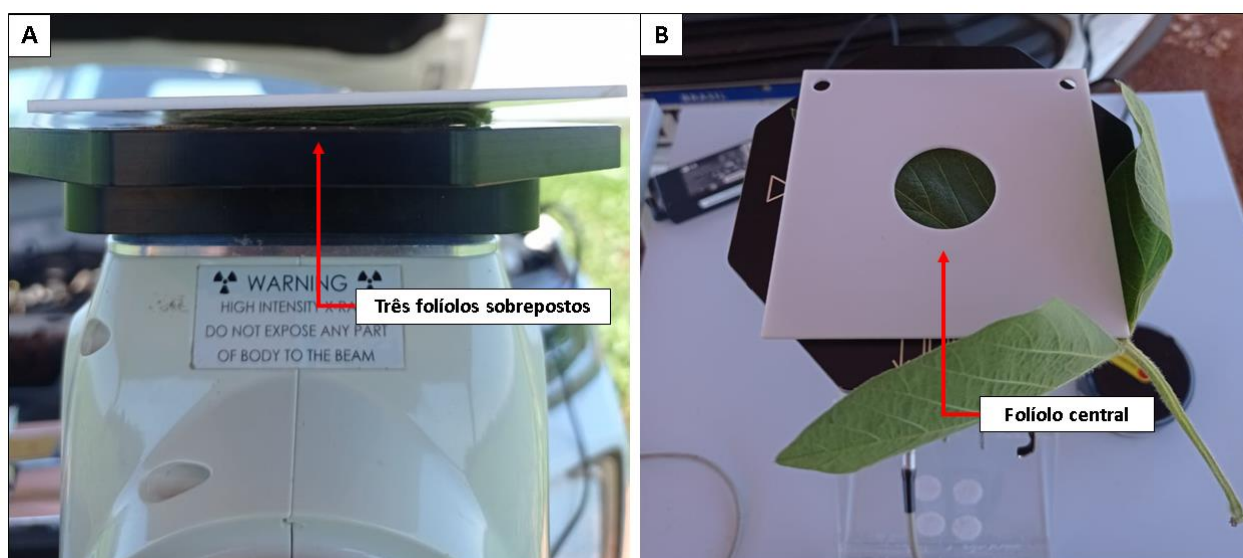
**Figura 15.** Especificações da parcela experimental.

As folhas foram lavadas com água deionizada em campo, ainda na planta, a fim de remover qualquer impureza superficial da folha, visto que esta etapa é a criação de um modelo de predição, buscando minimizar qualquer interferência que possa afetar o resultado final. As folhas foram identificadas e secas ao ar, ainda na planta. Em seguida, as amostras foram coletadas e analisadas no equipamento de XRF portátil, *in situ* (Figura 16).



**Figura 16.** Configuração do equipamento XRF portátil *in situ*.

As análises foram divididas em duas etapas: (i) uma para determinação de micronutrientes (Mn, Fe, Cu e Zn), conforme disposto na Figura 17A, na qual foram coletadas 472 amostras, medido um ponto com os folíolos sobrepostos; e outra (ii) para macronutrientes (P, S, K, Ca), representado na Figura 17B, medindo dois pontos no folíolo central, totalizando nesta etapa 180 amostras. O tempo de varredura adotado, em ambos os casos, foi de 60 s. As descrições dos parâmetros instrumentais foram as mesmas já reportadas no item 2.2.1.



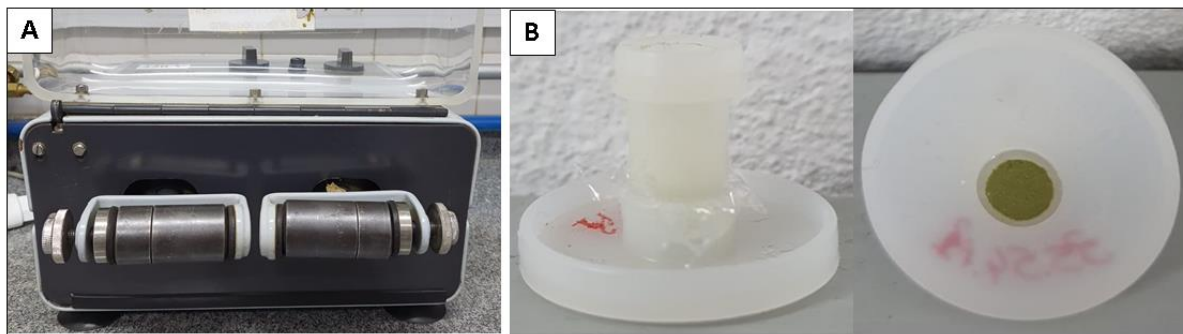
**Figura 17.** Determinação de micronutrientes (A); Determinação de macronutrientes (B).

Após as medidas, os dados de intensidade da linha de emissão  $K\alpha$  dos elementos determinados (P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn) e o Compton  $Rh-K\alpha$  foram coletados para cada amostra, utilizando o software Artax. Além disso, foi coletado o espectro completo, com 2048 canais, obtidos em campo para cada amostra em contagem, dividido pelo tempo de aquisição de cada amostra (unidade em contagem por segundo).

### 3.2.2. Preparo da amostra e análise XRF no equipamento de bancada

As amostras de folha de soja foram secas em estufa por 48 h à 60°C e moídas em moinho mecânico (modelo: RETSCH, MM400) com uma frequência de 54 Hz durante 5 min (Figura 18A). Após moídas, com o auxílio de uma balança analítica, foram pesados 0,100 g de cada amostra e o material foi transferido para cubeta de raios X, seladas com filme polipropileno 6  $\mu\text{m}$  (Figura 18B).





**Figura 18.** Moinho mecânico (A); Cubeta com amostra prensada (B).

As análises de referência foram conduzidas no equipamento de fluorescência de raios X de bancada (modelo: SHIMADZU, EDX 720), conforme disposto na Figura 19. As medidas foram realizadas empregando-se 50 kV, corrente autoajustada considerando um tempo morto de no máximo 20%, sob vácuo, utilizando colimadores de 3 mm e com tempo de aquisição de 200 s. A exatidão do método foi verificada através da medida de uma amostra de referência certificada NIST1515a, onde os resultados estão dispostos no item 3.3.1.



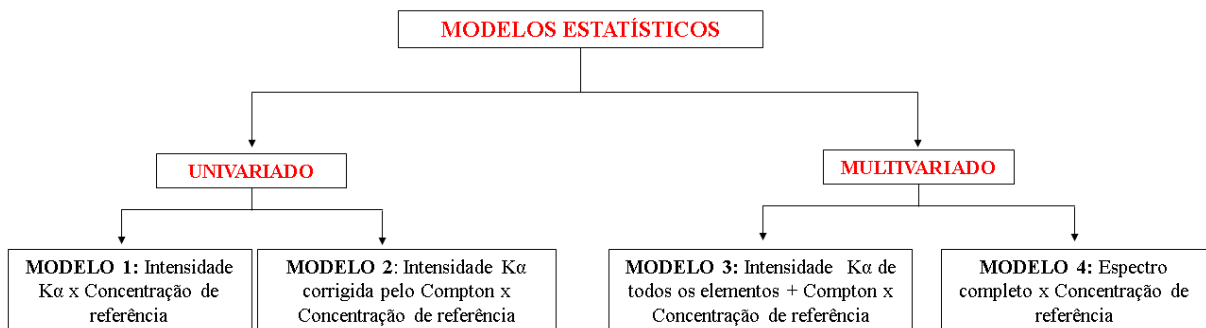
**Figura 19.** Equipamento XRF de bancada Shimadzu.

Os resultados utilizados foram as concentrações em mg kg<sup>-1</sup> dos elementos P, S, K, Ca, Fe e Mn, obtidos a partir dos parâmetros fundamentais. No caso do Cu e Zn, por não se adequarem à utilização dos parâmetros fundamentais, foi feita uma curva externa com a intensidade medida no XRF de bancada e concentração conhecida de determinada amostra. Sendo assim, foram adicionadas soluções de Cu e Zn, utilizando como base a celulose, com concentrações variando de 0 a 50 mg kg<sup>-1</sup> e 0 a 125 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Os limites de

deteccção (LOD) dos elementos determinados foram: 118 mg kg<sup>-1</sup> (P), 50 mg kg<sup>-1</sup> (S), 54 mg kg<sup>-1</sup> (K), 37 mg kg<sup>-1</sup> (Ca), 8 mg kg<sup>-1</sup> (Mn), 7 mg kg<sup>-1</sup> (Fe), 4 mg kg<sup>-1</sup> (Cu) and 3 mg kg<sup>-1</sup> (Zn).

### 3.2.3. Modelagem estatística: método de quantificação

A relação entre a intensidade adquirida *in situ* pelo equipamento XRF portátil e a concentração de referência obtida pelo equipamento XRF de bancada foi feita comparando 4 modelos estatísticos distintos (Figura 20). Os modelos foram replicados para cada elemento, separando os grupos de macronutrientes (K, Ca, P, S) e micronutrientes (Mn, Fe, Cu, Zn).



**Figura 20.** Especificação dos modelos estatísticos utilizados para comparação.

Antes da aplicação dos modelos, as amostras foram separadas em grupos de calibração com 70% e validação com 30% dos dados, pelo algoritmo Kennard Stone (KENNARD & STONE, 1969; TAVARES, 2020), utilizando o software Unscrambler versão 10.4. Os grupos de calibração e validação foram verificados comparando o valor máximo e mínimo para cada elemento, de forma a confirmar que o grupo de validação estava contido no grupo de calibração. Além disso, nos modelos multivariados (Modelo 3 e Modelo 4) foram aplicados o pré processamento autoescalamento (Equação 2) e centrado na média (Equação 3), respectivamente.

$$X_{ij(a)} = \frac{X_{ij} - \bar{X}_j}{S_j} \quad (2)$$

$$X_{ij(cm)} = X_{ij} - \bar{X}_j \quad (3)$$

Onde,

$x_{ij}$  = cada um dos valores de cada coluna dos dados;

$\bar{x}_j$  = média da  $j$ -ésima coluna dos dados;

$S_j$  = desvio padrão da coluna

O Compton ( $Rh K\alpha$ ), normalmente, é utilizado para correção da matriz de amostras, *i.e.* minimiza o efeito da composição da amostra, quando estas possuem matriz similar (SHEN *et al.*, 2019). No Modelo 2 da Figura 19, a correção pelo compton foi feita através da intensidade  $K\alpha$  de cada elemento, dividida pelo Compton  $Rh K\alpha$  da amostra.

No modelo 4 descrito na Figura 19, utilizou-se da análise estatística multivariada “*Partial Least Square Regression*” (PLSR) com o espectro completo, sem seleção de linha de emissão. Neste caso, a validação externa do modelo foi realizada empregando-se o conjunto de validação de 30% das amostras, que consiste em avaliar o modelo com amostras que não foram incluídas na sua construção. E, o número de variáveis latentes foi definida através da validação cruzada, considerando o menor erro quadrático médio (do inglês “*root mean square error*”, RMSE). A escolha do melhor modelo para cada elemento foi feita comparando o desempenho dos modelos, com base no RMSE (SANTOS *et al.*, 2020).

#### **3.2.4. Recuperação do método a partir da metodologia convencional (ICP OES)**

Para validar que o método utilizado como referência (equipamento XRF de bancada) condiz com a metodologia convencional utilizada em análise de tecido de planta, uma amostra certificada de referência foi analisada empregando-se ICP OES. E, além disso, 20 amostras de folha: 10 folhas referentes as amostras coletadas na condição de determinação para macronutrientes e 10 folhas das amostras coletadas na condição de micronutrientes, foram analisadas pela técnica de ICP OES. A escolha das amostras foi feita de forma aleatória.

O método utilizando a técnica de ICP OES não foi estabelecido como método de referência neste projeto devido ao custo de análise, visto que ele requer um conjunto de reagentes para pré processamento da amostra e, o número de amostras utilizado no estudo foi superior ao planejado no início do projeto.

Para análise em ICP OES, as amostras foram digeridas e cada amostra foi preparada em triplicata. Sendo assim, pesaram-se 0,100 g de cada amostra em uma folha de papel vegetal, utilizando uma balança analítica de precisão. Em seguida, transferiu-se a amostra pesada para o tubo de teflon, acrescentaram-se 2,5 mL de  $HNO_3$  20% (v/v) e 1,5 mL de  $H_2O_2$  30% (m/m). O tubo de teflon foi fechado e colocado na camisa e válvula de pressão e encaixado no suporte de proteção. Os suportes foram alocados no aparelho micro-ondas (Figura 21) em posições alternadas, iniciando a digestão.



**Figura 21.** Aparelho micro-ondas visto por fora e por dentro.

Posteriormente, pesou-se o tubo Falcon de 15 mL com tampa, transferiu-se o conteúdo digerido para o tubo, lavando o tubo de teflon com água ultrapura e transferindo o resíduo para o tubo Falcon. Completou-se para 10 mL e o tubo foi pesado novamente, a fim de obter a diferença que indica o peso real da amostra.

Para a descontaminação dos tubos de teflon, lavou-se cada um 3 vezes, com água deionizada e foi imersa em solução de  $\text{HNO}_3$  10% durante 24 h. Em seguida, lavou-se o tubo e utilizou-se novamente, até finalizar a digestão das 63 amostras (20 amostras e a amostra certificada, em triplicata).

Após a digestão das amostras, foram feitas as análises ICP OES no Laboratório de Química do Departamento de Solos da ESALQ/USP. Os resultados obtidos pela técnica de ICP OES foram comparados com as concentrações obtidas pelo equipamento de XRF bancada.

### **3.3. Resultados e Discussão**

#### **3.3.1. Recuperação do método a partir da metodologia convencional (ICP OES)**

Na Tabela 13 estão os valores da recuperação da amostra certificada NIST 1573a, pelo método ICP OES e da amostra certificada NIST 1515a pelo XRF de bancada.

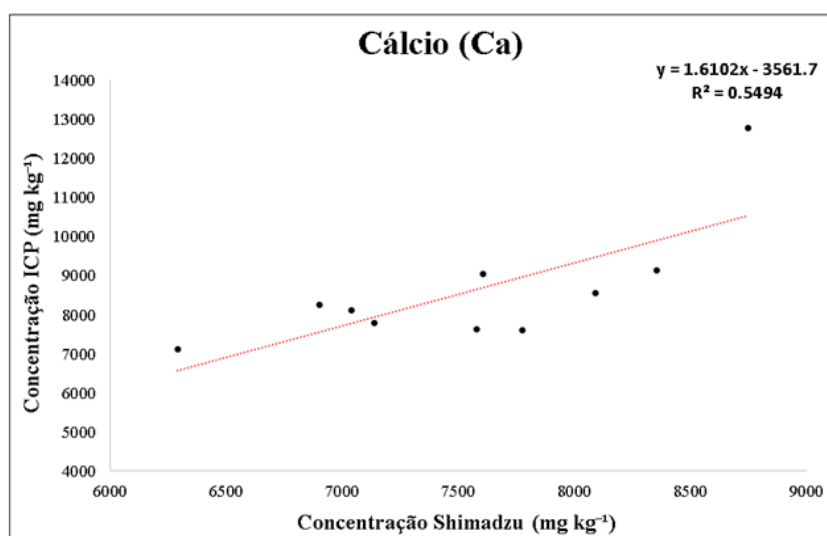


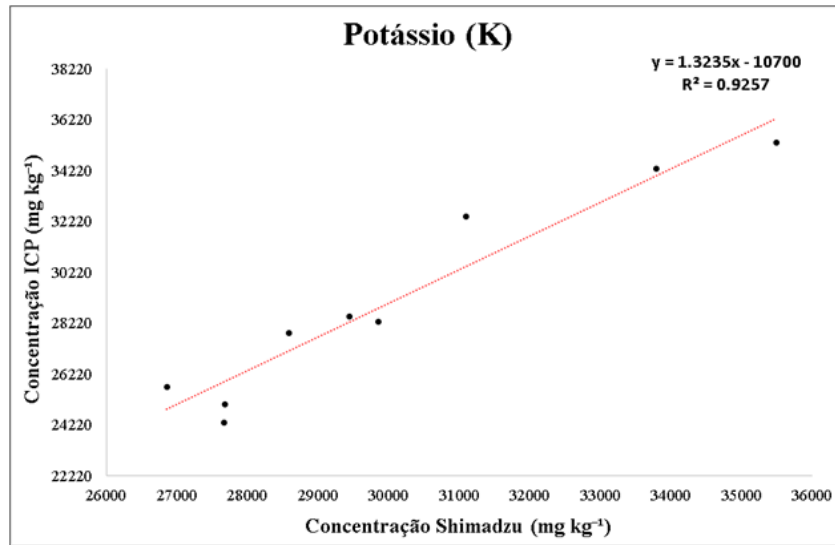
**Tabela 13.** Valores de recuperação do NIST 1573a (ICP OES) e NIST 1515a (XRF)

Analito	ICP OES	XRF
P	118%	109%
S	127%	94%
K	106%	95%
Ca	116%	86%
Fe	114%	96%
Mn	108%	103%
Cu	95%	125%
Zn	132%	85%

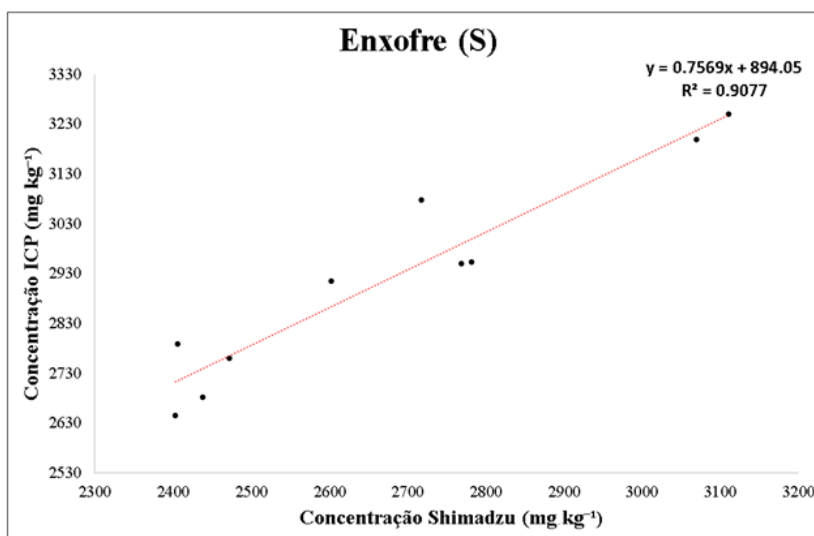
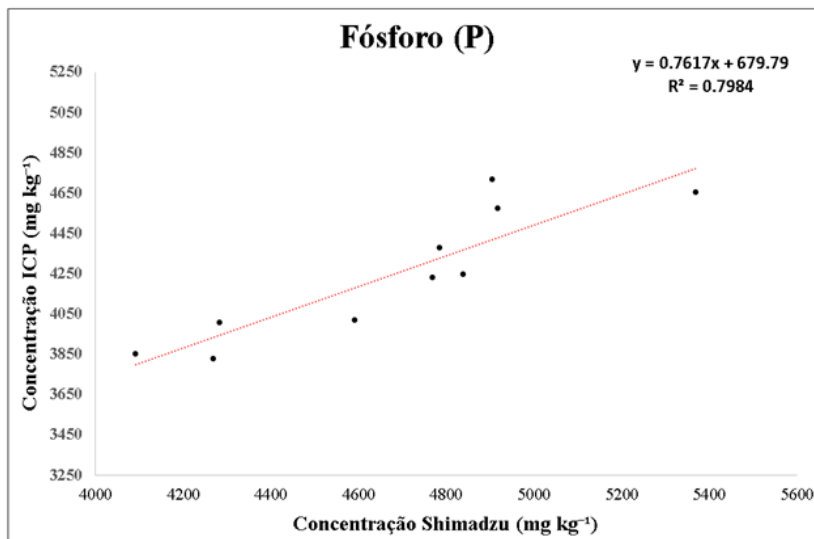
Visto que os valores de recuperação que comparam o resultado obtido pela técnica pelo valor real, estão dentro da variação de 20%, exceto para o Zn pela técnica de ICP OES, que não se enquadrou nessa faixa, os outros elementos podem ser comparados. A recuperação da amostra NIST 1515a pela técnica XRF de bancada utilizada como referência nesse trabalho, demonstra que os resultados são adequados, exceto para Cu. O NIST 1515a possui concentração de Cu baixa ( $5,69 \text{ mg kg}^{-1}$ ), sendo assim, para verificar a recuperação, utilizou-se uma amostra de soja com  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de solução de Cu e Zn adicionada. A recuperação foi de 99% para ambos.

Nas Figuras 23 e 24 estão as correlações para os macronutrientes para as amostras de folha de soja, escolhidas de forma aleatória e comparada pelo método ICP OES e o XRF de bancada, com  $R^2$  de 0,55 (Ca), 0,93 (K), 0,80 (P) e 0,91 (S).



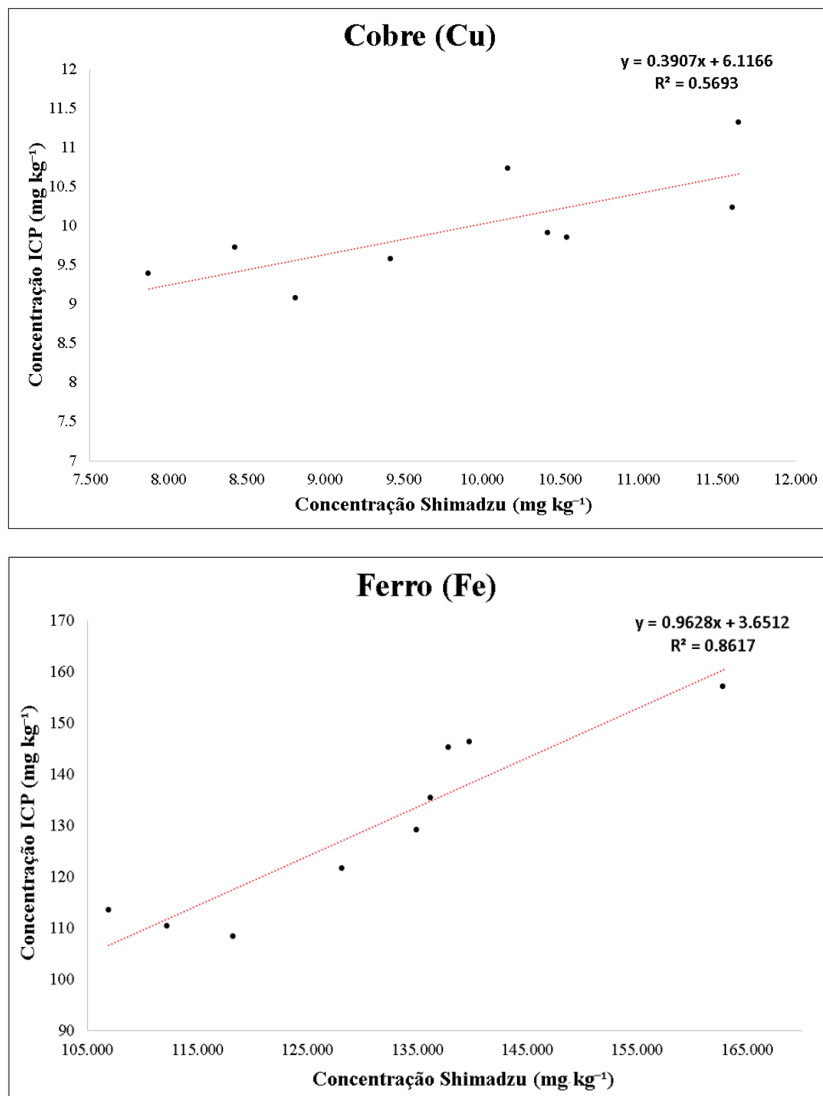


**Figura 23.** Comparação entre as amostras analisadas por ICP OES e XRF de bancada para Ca e K

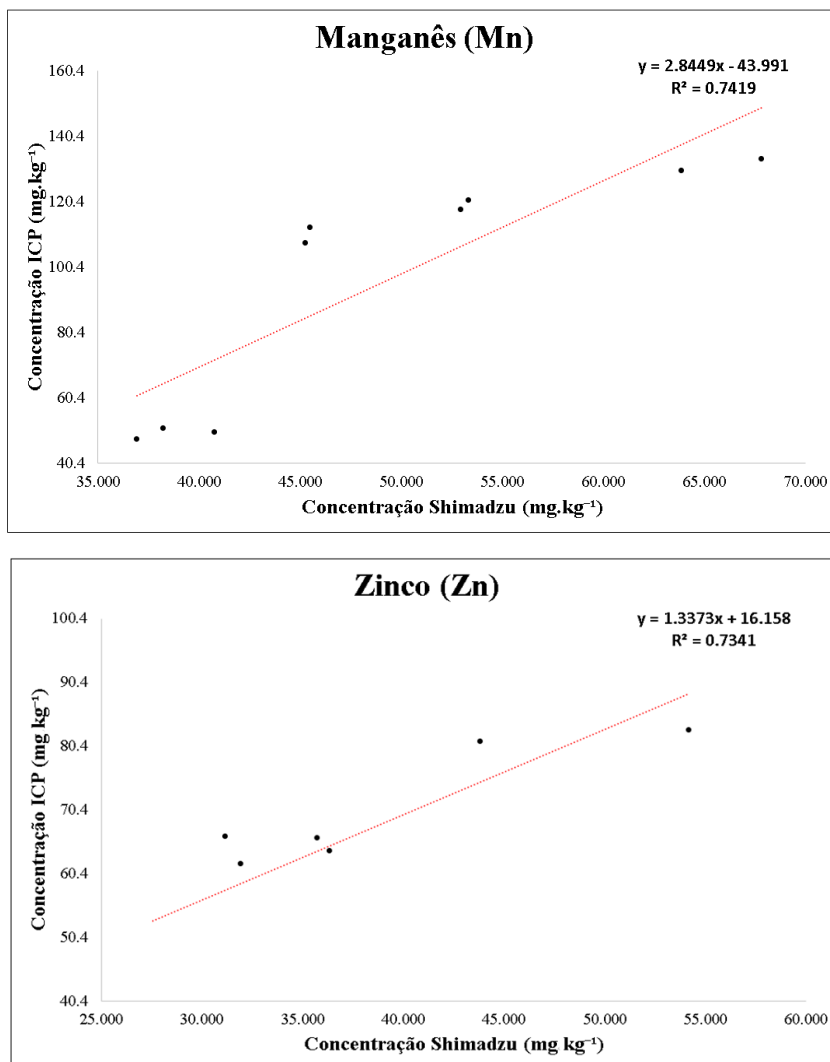


**Figura 24.** Comparação entre as amostras analisadas por ICP OES e XRF de bancada para P e S

Nas Figuras 25 e 26 estão as correlações para os micronutrientes, com  $R^2$  de 0,57 (Cu), 0,87 (Fe), 0,74 (Mn) e 0,73 (Zn). Alguns pontos foram retirados por serem considerados outliers.



**Figura 25.** Comparação entre as amostras analisadas por ICP OES e XRF de bancada para Cu e Fe



**Figura 25.** Comparação entre as amostras analisadas por ICP OES e XRF de bancada para Mn e Zn

### 3.3.2. Modelagem estatística: método de quantificação

Na Tabela 10 estão dispostos os resultados de verificação do grupo de calibração e validação. Sendo assim, encontram-se os valores mínimos, média, máximo, desvio padrão e coeficiente de variação de cada grupo, para cada macronutriente.

**Tabela 10.** Valores mínimo (Min), média (Med), máximo (Max), desvio padrão (D.P) e coeficiente de variação (CV) de cada grupo, para P, S, K, Ca

Conjunto		P (mg kg <sup>-1</sup> )	S (mg kg <sup>-1</sup> )	K (mg kg <sup>-1</sup> )	Ca (mg kg <sup>-1</sup> )
Calibração	Min	2523	2057	21156	5251
	Med	4615	2659	30309	7570
	Max	6389	3204	37830	11570
	D.P	833	232	3446	1304
	CV	18%	9%	11%	17%
Validação	Min	3076	2243	23654	5633
	Med	4485	2643	30095	7464
	Max	5943	3204	35484	9365
	D.P	619	222	2671	916
	CV	14%	8%	9%	12%

Comparando os valores de máximo e mínimo nos dois grupos, para cada elemento, exceto o S, que apresentou o valor máximo um pouco diferente do máximo do conjunto de calibração, em todos os outros, o grupo de validação está incluso no grupo de calibração. Desta forma, a separação dos grupos obtida pelo algoritmo Kennard Stone, demonstrou ser adequada.

Na Tabela 11 está a mesma verificação dos grupos, todavia para os micronutrientes.

**Tabela 11.** Valores mínimo (Min), média (Med), máximo (Max), desvio padrão (D.P) e coeficiente de variação (CV) de cada grupo, para Cu, Fe, Mn, Zn

Conjunto		Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )
Calibração	Min	5	80	21	16
	Med	10	135	58	39
	Max	17	298	162	72
	D.P	2	31	19	8
	CV	18%	23%	32%	21%
Validação	Min	5	93	32	26
	Med	10	124	52	37
	Max	16	227	77	52
	D.P	2	17	10	5
	CV	20%	14%	19%	13%

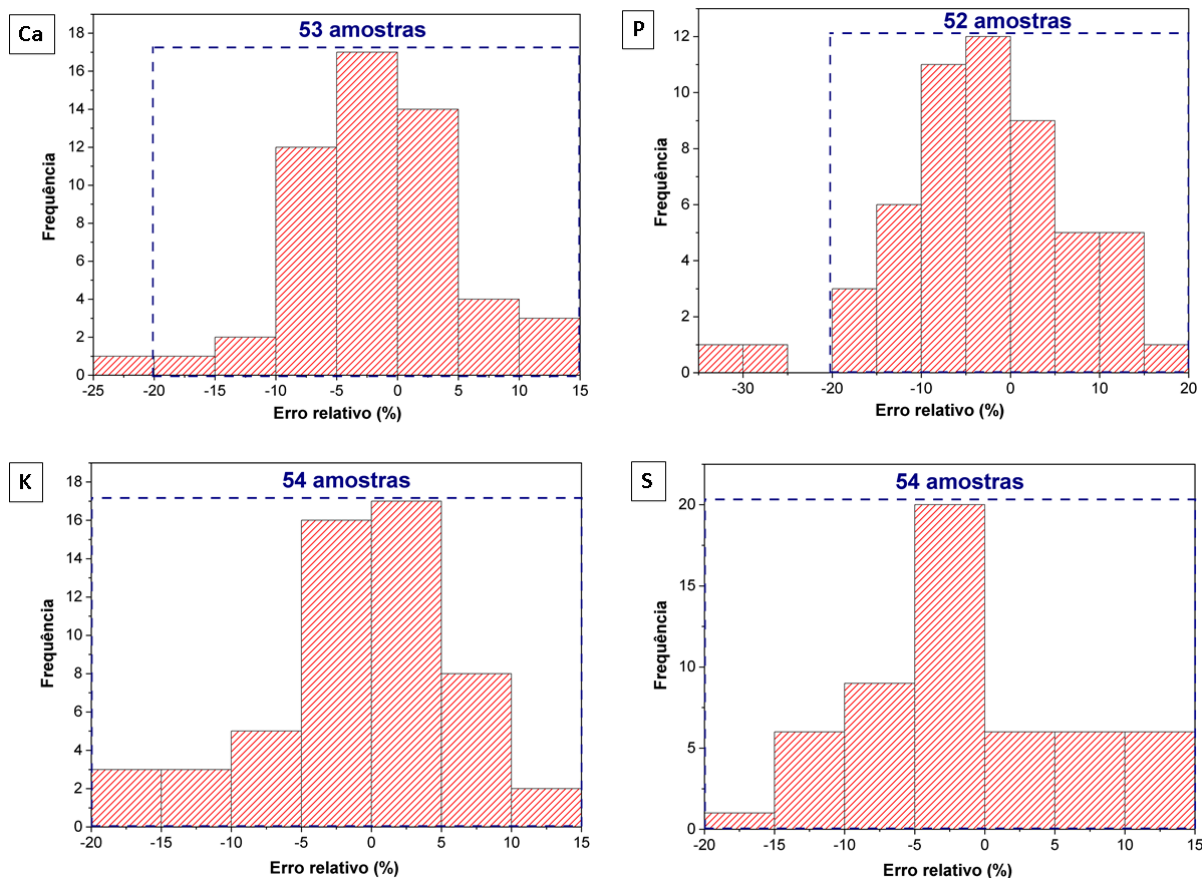
Neste caso, comparando os valores de máximo e mínimo nos dois grupos, para todos os elementos o grupo de validação está incluso no grupo de calibração. O CV atingiu valores entre 8 e 18% para macronutrientes e 13 a 32% para micronutrientes, o que pode ser considerado uma variação razoavelmente ampla para um campo de soja local.

Os valores de RMSE de macronutrientes para cada modelo, utilizados como indicadores de desempenho dos modelos, estão dispostos na Tabela 12. Lembrando que o Modelo 1 é referente a intensidade  $K\alpha$ ; Modelo 2, intensidade  $K\alpha$  corrigida pelo Compton; Modelo 3, intensidade  $K\alpha$  de todos os elementos + Compton; e Modelo 4, espectro completo (PLSR).

**Tabela 12.** Valores de RMSE ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) para os diferentes modelos, para cada macronutriente (P, S, K, Ca)

<b>Modelos</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>
Modelo 1	520	211	2653	590
Modelo 2	507	210	2635	729
Modelo 3	433	204	1957	543
Modelo 4	524	210	2262	519

Para os elementos P, S e K, o Modelo 3 apresentou menor RMSE. Já para Ca, o menor RMSE foi utilizando o Modelo 4. Na Figura 22 estão os histogramas de distribuição do erro relativo (%) dos macronutrientes, considerando os modelos que apresentaram menor RMSE. Das 54 amostras usadas no grupo de validação externa dos dados, o Ca (98%), P (96%), K (100%), S (100%), ficaram dentro de 20% de erro para mais e para menos. Já os histogramas de erros dos outros modelos para macronutrientes estão dispostos no Apêndice A.



**Figura 22.** Histogramas de distribuição de erro para Ca, P, K e S (n=54).

Em relação aos valores de RMSE de micronutrientes para cada modelo, utilizados como parâmetro de desempenho dos modelos, estão dispostos na Tabela 13.

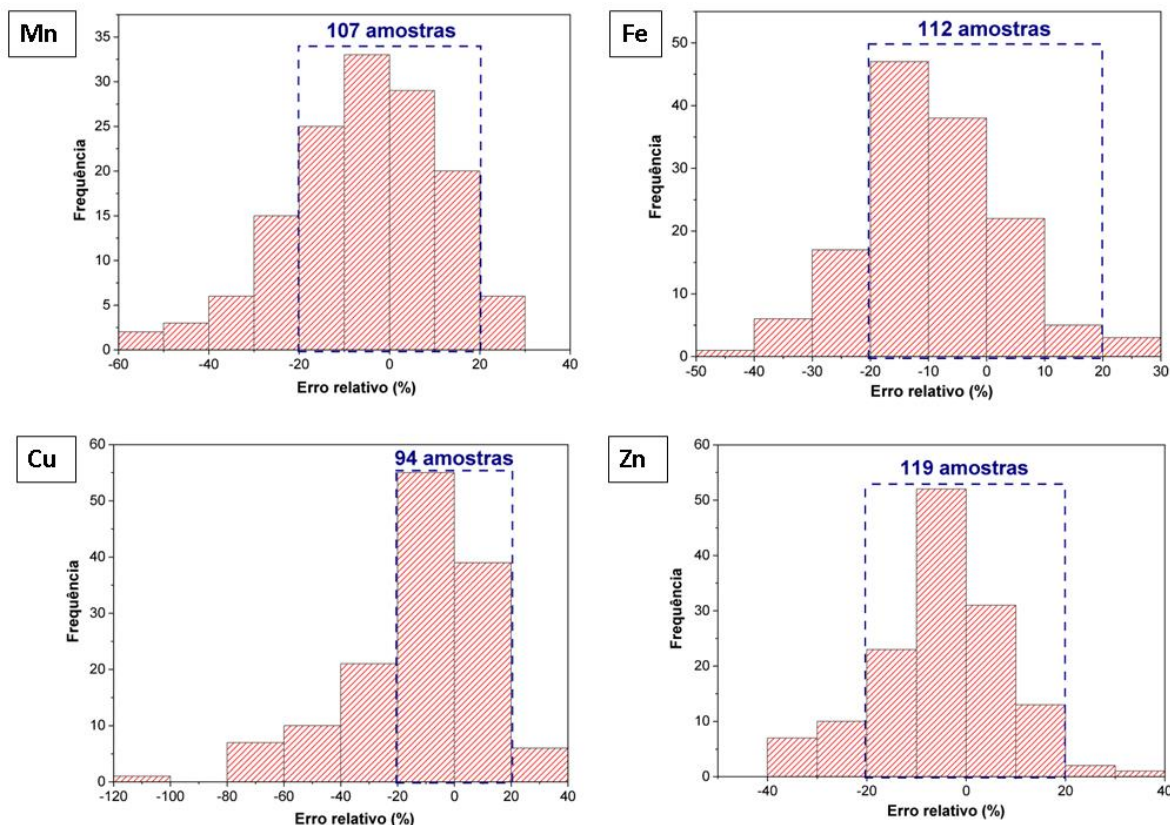
**Tabela 13.** Valores de RMSE ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) para os diferentes modelos, para cada micronutriente (Cu, Fe, Mn, Zn)

Modelos	Cu	Fe	Mn	Zn
Modelo 1	2	18	9	5
Modelo 2	2	19	9	5
Modelo 3	2	21	9	5
Modelo 4	2	21	11	6

Para todos os micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn) o erro dos modelos ou foi igual ou apresentou valor próximo. Sendo assim, foi escolhido o modelo mais simples para todos os casos, de regressão linear simples, correlacionando apenas a intensidade  $K\alpha$  do elemento e a concentração de referência, apresentou menor RMSE.

Na Figura 23 estão os histogramas de distribuição do erro relativo (%) dos micronutrientes, considerando os modelos que apresentaram menor RMSE. Das 139 amostras

usadas no grupo de validação externa dos dados, o Mn (77%), Fe (81%), Cu (68%), Zn (86%), ficaram dentro de 20% de erro para mais e para menos. Os histogramas de erros dos outros modelos para micronutrientes estão dispostos no Apêndice B.



**Figura 22.** Histogramas de distribuição de erro para Mn, Fe, Cu e Zn (n=139).

O modelo de predição do elemento Cu apresentou um número maior de amostras (32%; n=139) com erro acima do aceitável de  $\pm 20\%$ . Dos modelos comparados, o RMSE e a distribuição de erro não demonstraram diferença significativa. Isto pode ser explicado pelo fato do limite de detecção ( $4 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $\sigma = 0,74$ ) e quantificação deste elemento ( $12 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $\sigma = 0,74$ ) serem próximos ao valor da média de Cu ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ; DP = 2,00), das 462 amostras folha de soja. Além disso, o equipamento XRF de bancada possui um sinal de fundo de Cu (branco), que embora descontado do sinal das amostras, incorre em erro adicional na determinação deste elemento.

### 3.4 Conclusões

O menor tempo de varredura considerando o menor coeficiente de variação para os macros e micronutrientes foi de 60 s. O uso de vácuo incrementou as intensidades de



elementos mais leves, como P e S, todavia não se mostrou crucial na análise *in situ*, visto que foram utilizadas duas condições para macro e micronutrientes.

Das variáveis limitantes, as amostras não lavadas e as lavadas não apresentaram diferença significativa. A alteração da umidade foliar, no decorrer do tempo, influenciou principalmente as intensidades de P e S. Considerando que o experimento foi realizado *in situ*, os devidos cuidados foram tomados de forma que a folha fosse coletada e imediatamente analisada. A nervura da folha influenciou todos os macronutrientes e a intensidade do Cu, devendo assim ser evitada. Já a idade da folha apresentou diferença significativa para P e Ca, ambos da folha nova/folha diagnóstico e, folha diagnóstico/folha velha apenas para P.

Os modelos preditivos de concentração apresentaram resultados satisfatórios com menores RMSE para macronutrientes (P, S e K), utilizando regressão linear múltipla com as intensidades dos elementos e o compton. E, para Ca utilizando o PLSR com pré-processamento centrado na média. Das amostras de validação externa, Ca (98%), P (94%), K (100%), S (100%), ficaram dentro de  $\pm 20\%$  de erro.

No caso dos micronutrientes, apresentaram valores de RMSE próximos, sendo assim, o modelo mais simples, utilizando regressão linear simples apenas com a intensidade  $K\alpha$  de cada elemento foi considerado. Das amostras usadas para validação externa dos dados, o Mn (77%), Fe (81%), Cu (68%), Zn (86%), ficaram dentro de  $\pm 20\%$ .

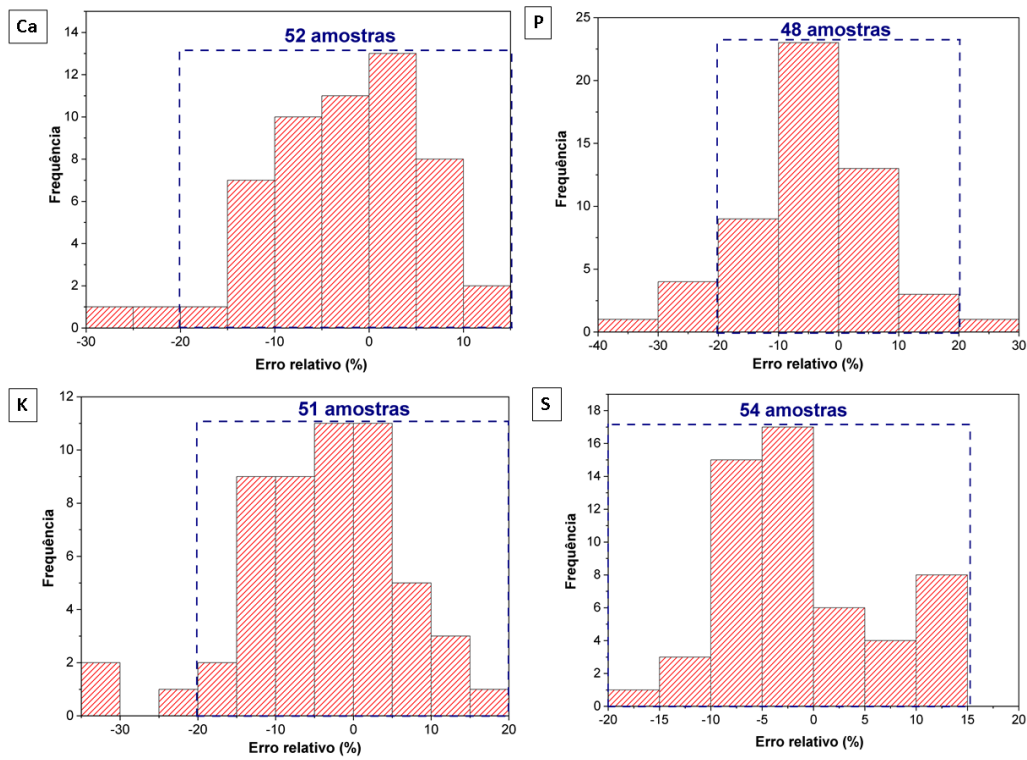
De forma geral, avaliando os resultados de variáveis limitantes e o desempenho dos modelos de quantificação de concentração, os métodos desenvolvidos a partir da técnica utilizando fluorescência de raios X são viáveis para uso *in situ*. Sendo assim, torna-se possível análise do estado nutricional em tecido vegetal de soja de forma rápida, não destrutiva, sem necessidade de moagem e digestão da amostra.

## REFERÊNCIAS

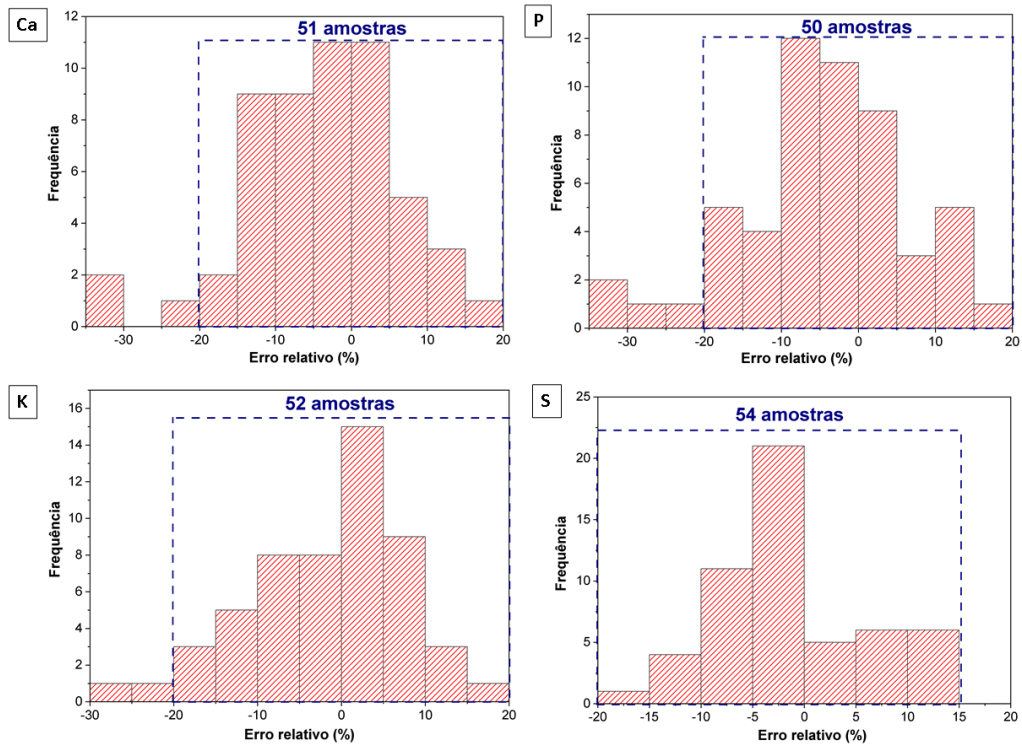
- ADAME, A. 2018. **Análise direta de folhas de soja por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) e por fluorescência de raios X dispersiva em energia (EDXRF)**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2018.
- COSTA, G.T.J.; NUNES, L.C.; FERESIN GOMES, M.H.; ALMEIDA, E.; CARVALHO, H.W.P. Direct determination of mineral nutrients in soybean leaves under vivo conditions by portable X-ray fluorescence spectroscopy. **X-Ray Spectrometry**, v.49, n.2, p.274-283, 2020.
- DIJAIR, T.S.B.; SILVA, F.M.; TEIXEIRA, A.F.D.S.; SILVA, S.H.G.; GUILHERME, L.R.G.; CURI, N. Correção da determinação em campo dos teores de elementos em solos via espectrometria de fluorescência de raios-X portátil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 44, 2020.
- FERREIRA, M.M.C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015.
- JIMÉNEZ-CARVELO, A.M.; GONZÁLEZ-CASADO, A.; BAGUR-GONZÁLEZ, M.G.; CUADROS-RODRIGUEZ, L. Alternative data mining/machine learning methods for the analytical evaluation of food quality and authenticity: a review. **Food Research International**, v. 122, p. 25-39, 2019.
- KENNARD, R.W.; STONE, L.A. Computer aided design of experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137-148, 1969.
- KOWALSKI, B.R. **Chemometrics**. 1978.
- KOWALSKI, B.R. Chemometrics: views and propositions. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 15, n. 4, p. 201-203, 1975.
- MONTANHA, G.S.; RODRIGUES, E.S.; MARQUES, J.P.R.; ALMEIDA, E.; REIS, A.R.; CARVALHO, H.W.P. X-ray fluorescence spectroscopy (XRF) applied to plant science: challenges towards in vivo analysis of plants. **Metallomics**, v. 12, n. 2, p. 183-192, 2020.
- MOREIRA, M.S.; RODRIGUES, M.P.; FERREIRA, C.F.; NIENOV, O.H. Regressão linear simples e múltipla. **Bioestatística quantitativa aplicada**. Porto Alegre: UFRGS, 2020. Cap. 10, p. 197-216, 2020.
- PARASTAR, H.; TAULER, R. Big (bio)chemical data mining using chemometric methods: a need for chemists. **Angewante Chemistry International Edition**, 2018.
- ROMEU, S.L.Z.; MARQUES, J.P.R.; MONTANHA, G.S.; CARVALHO, H.W.P.; PEREIRA, F.M.V. Chemometrics unraveling nutrient dynamics during soybean seed germination. **Microchemical Journal**, v. 164, p. 106045, 2021.

- SANTOS, F.R.; OLIVEIRA, J. F.; BONA, E.; SANTOS, J.V.F.; BARBOZA, G.M.; MELQUIADES, F.L. EDXRF spectral data combined with PLSR to determine some soil fertility indicators. **Microchemical Journal**, v. 152, p. 104275, 2020.
- SANTOS, F.R.; OLIVEIRA, J. F.; BONA, E.; SANTOS, J.V.F.; BARBOZA, G.M.; MELQUIADES, F.L. Evaluation of pre-processing and variable selection on energy dispersive X-ray fluorescence spectral data with partial least square regression: A case of study for soil organic carbon prediction. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 175, p. 106016, 2021.
- SHEN, Y.; LUO, L.; SONG, Y.; LIU, J.; LAO, C.; SUN, M.; YANG, W. Matrix correction with Compton to Rayleigh ratio in a plant–soil–rock interface analysis using a laboratory micro-XRF. **X-Ray Spectrometry**, v. 48, n. 5, p. 536-542, 2019.
- TAVARES, T.R.; MOLIN, J.P.; JAVADI, S.H.; CARVALHO, H.W.P.; MOUAZEN, A.M. Combined use of vis-NIR and XRF sensors for tropical soil fertility analysis: Assessing different data fusion approaches. **Sensors**, v. 21, n. 1, p. 148, 2020.
- TOBIAS, R.D. **An introduction to partial least squares regression**. SAS Institute Inc., 1995.
- VARMUZA, K.; FILZMOSER, P. Principal component analysis. Introduction to multivariate statistical analysis. **Chemometrics**, p. 1-0, 2009.

## APÊNDICES – Apêndice A –



**Figura 26.** Histograma de erro Modelo 1 (univariado) para macronutrientes



**Figura 27.** Histograma de erro Modelo 2 (univariado normalizado) para macronutrientes

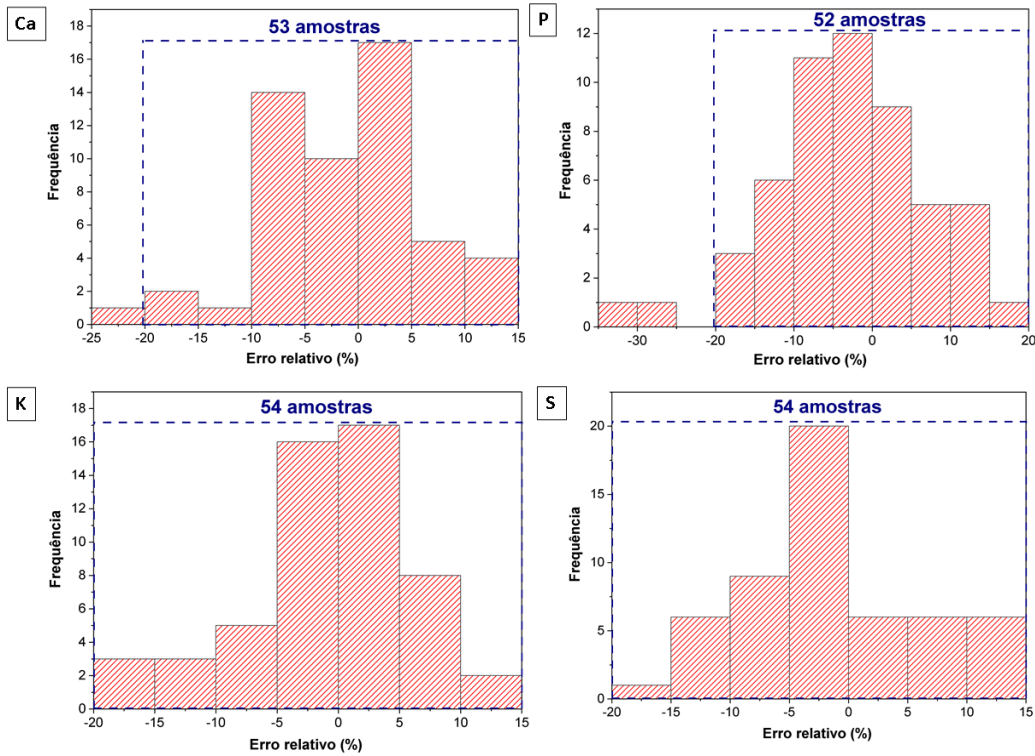


Figura 28. Histograma de erro Modelo 3 (regressão linear múltipla) para macronutrientes

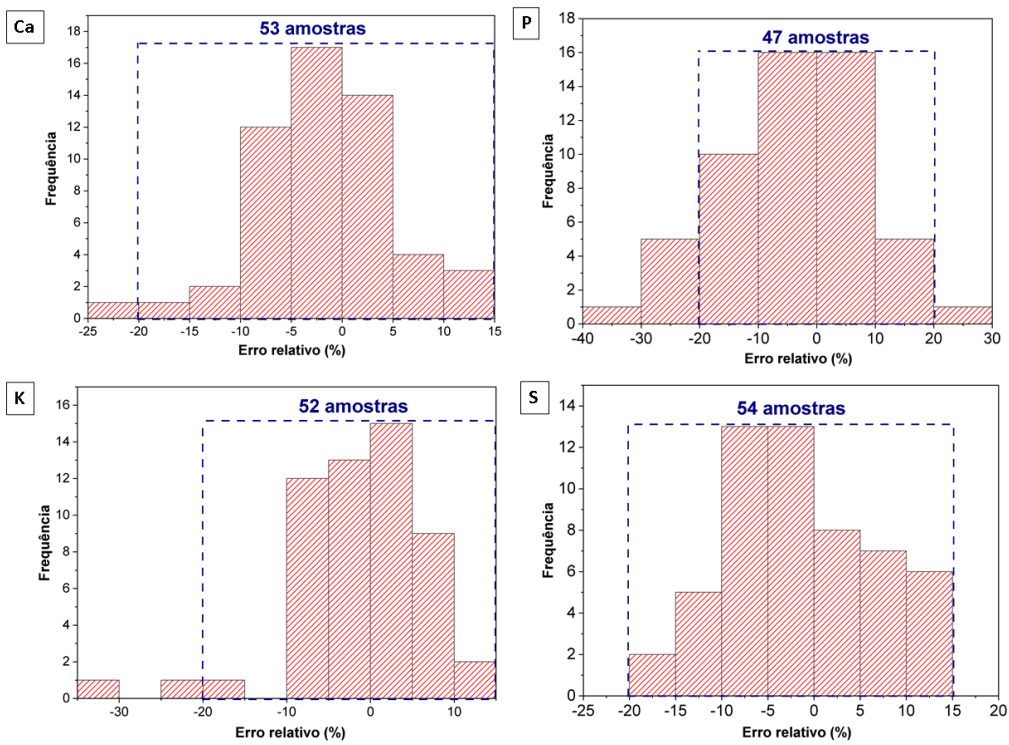
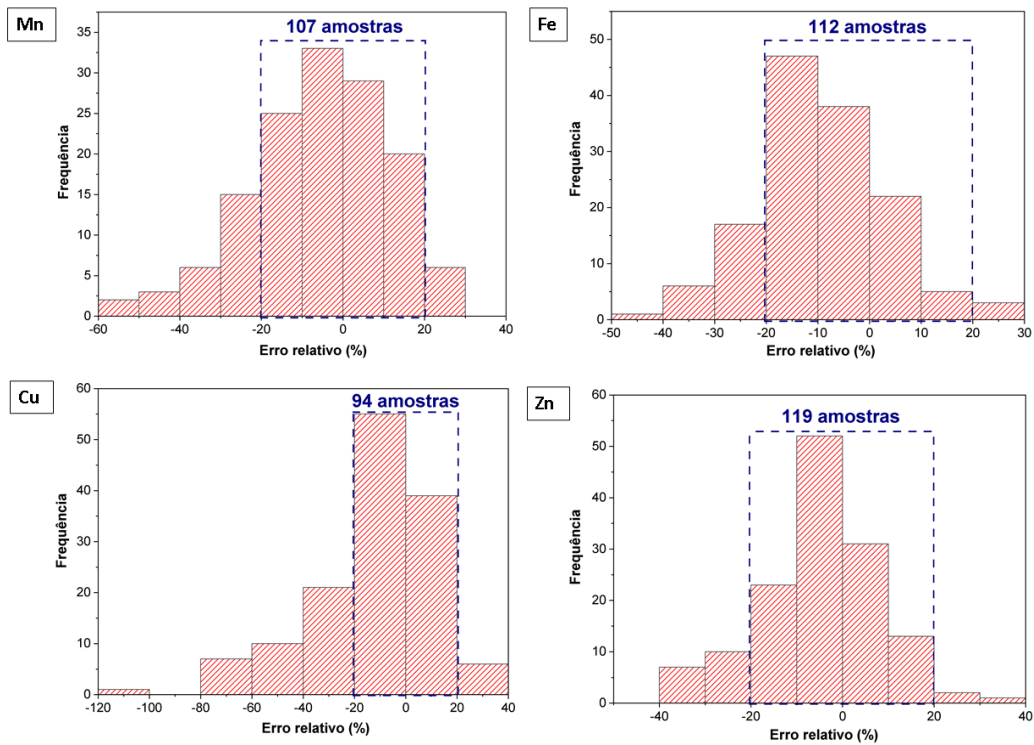
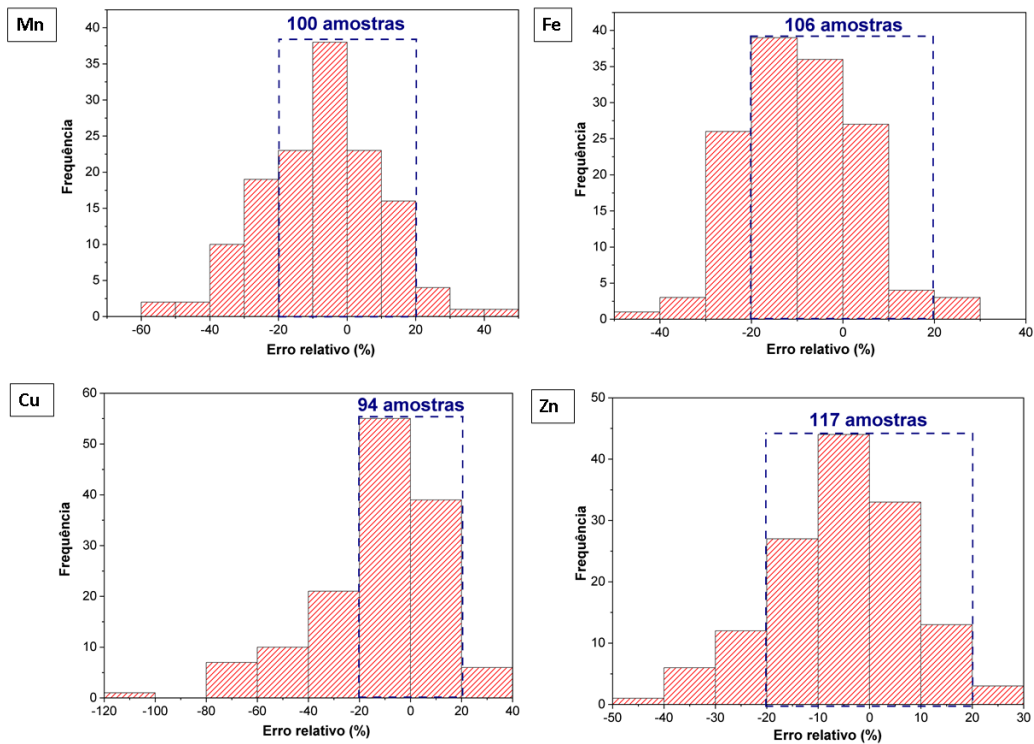


Figura 29. Histograma de erro Modelo 4 (PLSR) para macronutrientes

## Apêndice B



**Figura 32.** Histograma de erro Modelo 1 (univariado) para micronutrientes



**Figura 33.** Histograma de erro Modelo 2 (univariado normalizado) para micronutrientes



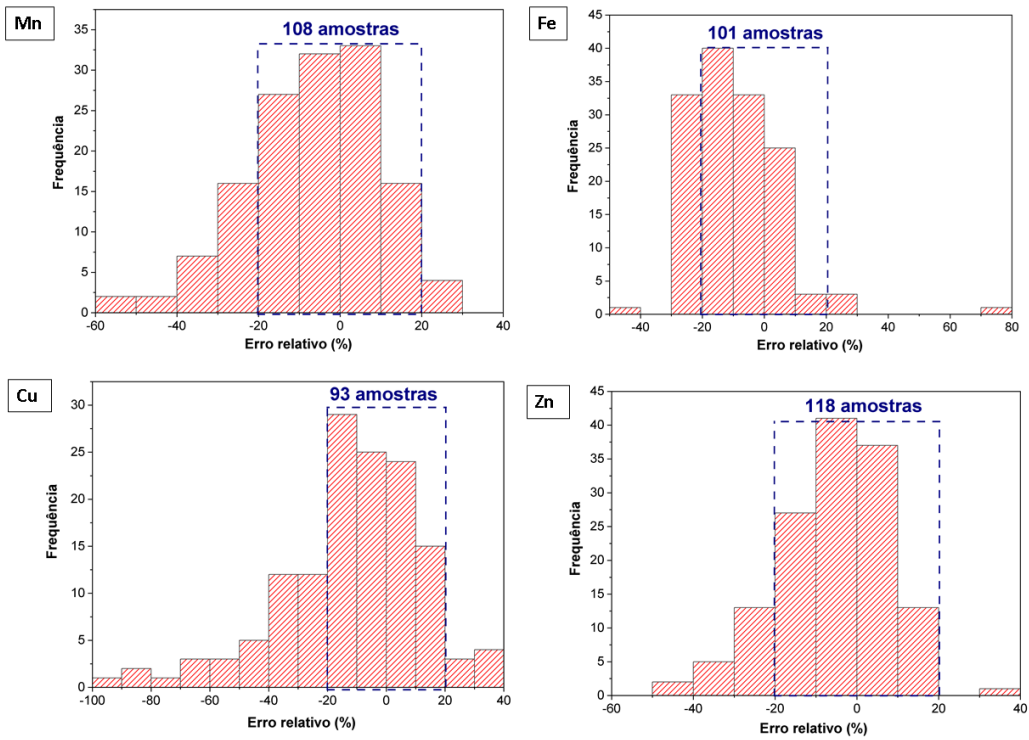


Figura 35. Histograma de erro Modelo 3 (multivariado) para micronutrientes

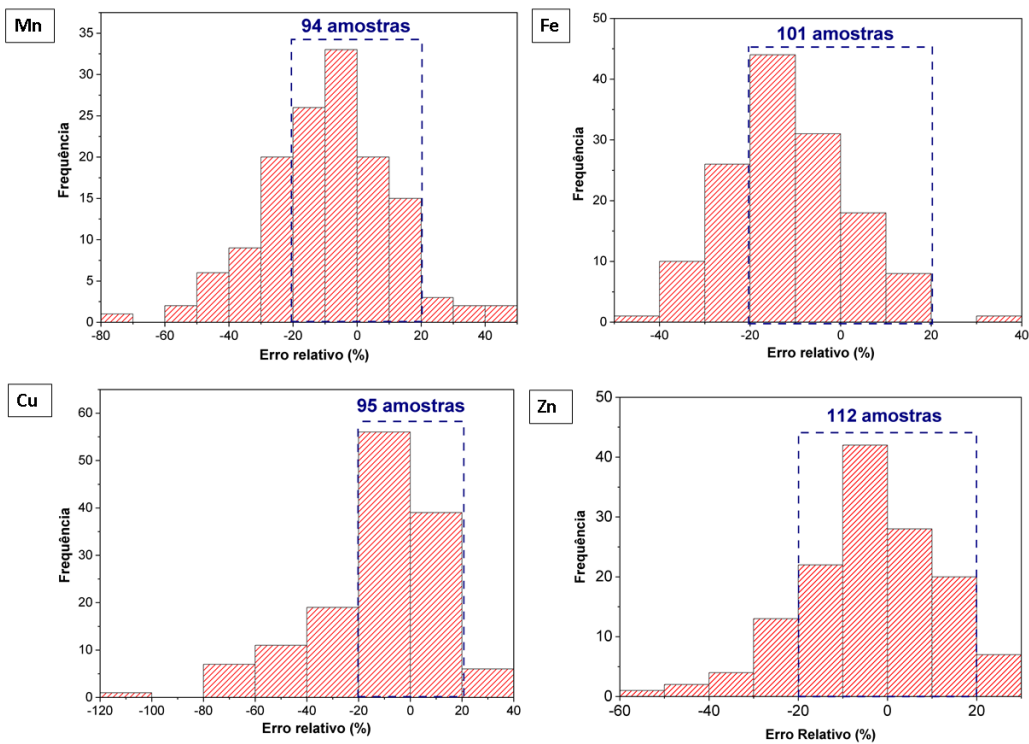


Figura 36. Histograma de erro Modelo 4 (PLSR) para micronutrientes