



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química



O USO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA A  
DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA SIMULTÂNEA DE  
ALUMÍNIO E FERRO: APLICAÇÃO NA ANÁLISE DE PLANTAS E  
SOLOS

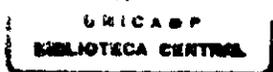
Aline Renée Coscione

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. João Carlos de Andrade  
Co-orientador: Dr. Bernardo van Raij

Junho - 2001

200124282



Aos meus pais,

Júlia e Luiz,

e minhas irmãs

pelo apoio e compreensão

Ubi dubium ibi libertas  
(Onde há dúvida, há liberdade)  
➤ Provérbio latino

## **Agradecimentos**

- Ao Prof. Dr. João Carlos de Andrade, pela orientação, amizade e estímulo.
- À Dra. Mônica Ferreira de Abreu pela amizade e ao Dr. Bernardo van Raij pela co-orientação.
- Aos amigos e inumeráveis colaboradores do Instituto de Química da Unicamp e do Instituto Agrônomo de Campinas, dos quais omito os nomes para não esquecer ninguém, e também àqueles que não se encontram mais vinculados a essas instituições, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**Título:** "O USO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA A DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA SIMULTÂNEA DE ALUMÍNIO E FERRO: APLICAÇÃO NA ANÁLISE DE PLANTAS E SOLOS".

**Autora:** Aline Renée Coscione

**Orientador:** Prof. Dr. João Carlos de Andrade

**Co-orientador:** Dr. Bernardo van Raij

**Palavras-chave:** determinação simultânea, uv-vis, PLS.

### **Resumo**

A determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e de ferro foi realizada em extratos de solos e plantas, usando alaranjado de xilenol (AX), em excesso, como reagente cromogênico e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).

As condições experimentais foram selecionadas para reduzir interferências, diminuir a complexidade do sistema e produzir um procedimento robusto que pudesse ser utilizado em análises de rotina. Os espectros devem ser registados entre 2 e 4 horas após a mistura dos reagentes e soluções etanólicas foram empregadas para acelerar a formação dos complexos Al-AX. A validação dos métodos propostos foi feita através de determinações realizadas em amostras de plantas do programa interlaboratorial "International Plant-Analytical Exchange" (IPE) da Universidade de Wageningen e em extratos de solos utilizando KCl como extrator. Todos os extratos empregados foram analisados também por ICP-AES para comparação dos resultados. Soluções – padrão foram empregadas para a calibração dos modelos para solos e para plantas, simulando suas respectivas condições de extração. Para as determinações simultâneas de alumínio e de ferro em amostras de plantas, os melhores modelos foram obtidos utilizando o algoritmo PLS-2, após centrar os dados na média. Nessas determinações, extratos de plantas também podem ser utilizados calibrar os modelos, reduzindo potenciais efeitos de matriz.

O baixo custo dos métodos propostos e sua praticidade, aliados aos bons resultados obtidos, permitem sugerir seu uso em determinações de rotina, substituindo a determinações de alumínio por AAS empregando óxido nítrico ou quando equipamentos multielementares mais sofisticados, como o ICP-AES, são utilizados nas determinações de Al e Fe.

**Title:** "THE USE OF MULTIVARIATE CALIBRATION FOR THE SIMULTANEOUS SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF ALUMINUM AND IRON: APPLICATIONS IN PLANT AND SOIL ANALYSIS".

**Author:** Aline Renée Coscione

**Adviser:** Prof. Dr. João Carlos de Andrade

**Co- adviser:** Dr. Bernardo van Raij

**Keywords:** simultaneous determination, uv-vis, PLS.

## **Abstract**

The simultaneous spectrophotometric determinations of Al and Fe in soil and plant extracts were performed using xylenol orange (XO), in excess, as the color reagent and partial least-squares (PLS) regression for data handling.

The experimental conditions were established to reduce interferences, decrease system complexity and produce a robust procedure that could be used for routine analysis. The spectra should be recorded from 2 to 4 hours after mixing the reagents and ethanolic solutions were used to improve the formation of the Al-XO complexes. Validation of the proposed spectrophotometric methods was performed by running plant samples from the University of Wageningen "International Plant-Analytical Exchange" (IPE) and KCl soil extracts, which were also analyzed by ICP-AES for further correlation. Standard solutions were used for plant and soil PLS model calibration, simulating their respective extraction conditions. For the simultaneous determinations of Al and Fe in plant samples the best models were obtained using the PLS-2 algorithm after mean centering the data. For these determinations, plant extracts can also be used for calibration in order to reduce potential matrices effects.

The low cost of the proposed methods and their operational simplicity, associated with the good results obtained, enable us to suggest it for routine work. This could replace the use of the nitrous oxide flame in the atomic absorption spectrometry (AAS) procedure for Al determination or the use of more expensive multielemental equipment, such as ICP-AES, for both Al and Fe determinations.

# **Currículo Vitae resumido**

## *Aline Renê Coscione*

Nacionalidade: brasileira

Data de nascimento: 25/12/1974

Local de nascimento: São Paulo

## **Educação Superior**

- Bacharelado em Química Tecnológica. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Ingresso em 1992, egresso em 06/1996.
- Doutorado: ingresso em 10/1997 após aprovação da solicitação de passagem direta para este programa, sem conclusão do Mestrado, na ocasião do Exame de Qualificação de Mestrado.

## **Experiência Profissional**

- Instituto Agrônômico de Campinas. Campinas, SP  
cargo: Estagiária da seção de Fertilidade de solos e Nutrição de Plantas  
período: 03/1996 a 02/1997.
- Corn Products LTDA. Fábrica de Mogi Guaçu  
cargo: Assistente do gerente de Garantia de Qualidade da divisão industrial  
período: 06/1995 a 03/1996

## **Atividades didáticas**

- Instituto de Química - Unicamp  
Programa de estágio docente  
Docente das turmas C e H na disciplina QG 102  
1º semestre de 2001  
Coordenadora: Prof. Dr. Pedro Volpe
- Instituto de Química – Unicamp  
Monitoria voluntária na disciplina QG 102- Química Geral Experimental I  
1º semestre de 2000  
Coordenadora: Profa. Dra. Ines Joekes
- Instituto de Química – Unicamp  
Monitoria na disciplina QG 102- Química Geral Experimental I  
1º semestre de 1996. Bolsista FAEP  
Responsável: Prof. Dr. Francisco Reis.

## **Trabalhos Publicados em periódicos**

- Andrade, J. C. de; Almeida, A.M.; Coscione, A.R. e Aleixo, L.M. "Determination of Molybdenum in Steel by Adsorptive Stripping Voltametry in a Homogeneous Ternary Solvent System". Analyst, 126(6),892:896,2001.
  - Coscione, A.R.; Andrade, J. C. de; Poppi.R.J.; Mello, C.; Raij, B. van, e Abreu, M. F. de,

"Multivariate Calibration Applied to a Highly Interfering Chemical System. The Simultaneous Spectrophotometric Determination of Aluminum and Iron in Plants Using Xylenol Orange and Partial-Least Squares Regression". *Anal. Chim. Acta.* 423(1), 31-40, 2000.

- **Coscione, A.R.**; Andrade, J. C. de; Raij, B. van e Abreu, M. F. de, "An Improved Protocol for the Routine Spectrophotometric Determination of Exchangeable Aluminum in Soil Extracts with Xylenol Orange". *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 31 (11-14), 2027-2037, 2000.
- **Coscione, A.R.**; Andrade, J. C. de e Raij, B. van, Revisiting Titration Procedures for the Determination of Exchangeable Acidity and Exchangeable Aluminum in Soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 29 (11-14), 1973-1982, 1998.
- de Andrade, J.C.; Poppi, R. J. e **Coscione, A.R.**, Time-based injection approach for monosegmented continuous flow systems and related techniques. *J. Autom. Chem.*, 18(6), 199-203, 1996.

### Capítulos em livros

- Andrade, J.C. de, **Coscione, A.R.** e de Abreu, M.F., "Soluções Padrão e Qualidade dos Reagentes", IN: *Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais*, van RAIJ, B., de ANDRADE, J.C., CANTARELLA, H. e QUAGGIO J.A. (editores), Editora IAC, Campinas, 2001, p. 57-68 (Capítulo 3).
- **Coscione, A.R.**, Andrade J.C. de, van Raij, B. e de Abreu, M.F., "Determinação de Alumínio, Cálcio, Magnésio, Sódio e Potássio em Extratos de Cloreto de Amônio", IN: *Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais*, van RAIJ, B., de ANDRADE, J.C., CANTARELLA, H. e QUAGGIO J.A. (editores), Editora IAC, Campinas, 2001, p. 200-212 (Capítulo 12).
- Cantarella, H., van Raij, B., **Coscione, A.R.** e Andrade J.C. de, "Determinação de Alumínio, Cálcio e Magnésio Trocáveis em Extratos de Cloreto de Potássio", IN: *Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais*, van RAIJ, B., de ANDRADE, J.C., CANTARELLA, H. e QUAGGIO J.A. (editores), Editora IAC, Campinas, 2001, p. 213-224 (Capítulo 13).

### Material didático preparado, com veiculação eletrônica

- **Coscione, A.R.** e Custódio, R. Tradução para o português do artigo "Aspectos Cualitativos del Modelo Orbital", escrito por Noemi Torres (Universidade de Buenos Aires). Publicação eletrônica no site Chemkeys (<http://www.chemkeys.com>), 2000.
- de Paula Eiras, S.; **Coscione, A.R.**; Andrade, J.C. de e Custódio, R. "Métodos de Otimização em Química". Publicação eletrônica no site Chemkeys (<http://www.chemkeys.com>), 1999.
- **Coscione, A.R.**; de Almeida, A. M.; de Andrade, J. C. e Custódio, R. "Noções de Segurança no Laboratório Químico". Publicação eletrônica no site Chemkeys (<http://www.chemkeys.com>), 1998.

## Índice de Tabelas e Figuras

### Tabelas

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 5.1</b> – Linhas de emissão atômica utilizadas para a determinação dos elementos por ICP-AES .....  | 57  |
| <b>Tabela 5.2</b> – Características dos solos utilizados na determinação de alumínio .....  | 58  |
| <b>Tabela 5.3</b> – Concentração de alumínio e ferro nas soluções preparadas para calibração do modelo PLS, em mg L <sup>-1</sup> .....   | 47  |
| <b>Tabela 5.4</b> – Amostras de plantas utilizadas no conjunto de calibração para o desenvolvimento do modelo PLS com as amostras reais .....   | 63  |
| <b>Tabela 5.5</b> – Amostras de plantas utilizadas no conjunto de validação para o desenvolvimento do modelo PLS com as amostras reais .....  | 64  |
| <b>Tabela 6.1</b> – Medianas e desvio absoluto das medianas para as espécies potencialmente interferentes na determinação de alumínio e ferro em amostras de plantas usando AX .....      | 92  |
| <b>Tabela 6.2</b> – Média e estimativa do desvio padrão para três determinações independentes de alumínio e ferro nas amostras IPE 1997 analisadas .....                                  | 93  |
| <b>Tabela 6.3</b> - Concentrações de alumínio, ferro, sulfato e fosfato, em mg L <sup>-1</sup> , em solos representativos do estado de São Paulo .....                                    | 95  |
| <b>Tabela 6.4</b> – Resultados para a determinação de alumínio trocável em extratos de solos, na presença de ferro, usando planejamentos experimentais simplificados .....                | 97  |
| <b>Tabela 6.5</b> – Determinações de alumínio trocável em extratos de KCl, com o modelo construído usando o algoritmo PLS-1 e o conjunto 15(a) para calibração .....                      | 98  |
| <b>Tabela 6.6</b> – Avaliação da capacidade preditiva dos modelos construídos para plantas usando amostras reais .....  | 103 |
| <b>Tabela 6.7</b> – Curva de correlação (em mg kg <sup>-1</sup> de folha) para determinações com ICP e alguns modelos obtidos segundo o método proposto, usando amostras de plantas ..... | 106 |
| <b>Tabela 6.8</b> – Valores reportados pela IPE para as amostras utilizadas na comparação da capacidade preditiva dos modelos, ao longo da faixa de concentração de interesse .....       | 107 |
| <b>Tabela 6.9</b> – Comparação entre as concentrações de alumínio e ferro nos extratos analisados, usando os diferentes modelos PLS desenvolvidos usando amostras de plantas .....        | 108 |

## **Figuras**

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 2.1</b> – Esquema das etapas da análise química de solos .....   | 12 |
| <b>Figura 2.2</b> – Esquema das etapas envolvidas nas determinações em plantas .....   | 15 |
| <b>Figura 4.1</b> – Matrizes de espectros e concentrações que constituem o conjunto de calibração para a determinação das concentrações de alumínio e de ferro no sistema estudado ..... | 41 |
| <b>Figura 4.2</b> – Estratégias empregadas na etapa de teste dos modelos de calibração multivariada .....  | 42 |
| <b>Figura 4.3</b> – Esquema do cálculo envolvido no método da regressão linear múltipla (MLR) .....  | 45 |
| <b>Figura 4.4</b> – Representação matricial da análise de componentes principais (PCA) .....   | 45 |
| <b>Figura 4.5</b> – Representação do cálculo de componentes principais usando o algoritmo NIPALS .....   | 46 |
| <b>Figura 4.6</b> – Representação do cálculo de componentes principais usando o algoritmo SVD .....  | 47 |
| <b>Figura 4.7</b> – Representação da regressão por PLS .....   | 48 |
| <b>Figura 5.1</b> – Esquema representativo do planejamento fatorial completo utilizado para preparação das soluções empregadas na calibração .....                                       | 60 |
| <b>Figura 6.1</b> – Estrutura química do Alaranjado de Xilenol .....   | 69 |
| <b>Figura 6.2</b> – Uso do etanol para acelerar a formação do complexo de AX com o alumínio .....  | 72 |
| <b>Figura 6.3</b> – Espectros obtidos para os complexos de AX com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Cu, Fe, Al, Mn e Zn em pH 3,3 .....   | 73 |
| <b>Figura 6.4</b> – Espectros obtidos para os complexos de AX com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Cu, Fe, Al, Mn e Zn em pH 4,5 .....   | 74 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 6.5</b> – Efeito da alteração do perfil dos espectros de Al-AX devido à alteração na relação metal/ligante, causada pelo elevado consumo do reagente cromogênico .....  | 77  |
| <b>Figura 6.6</b> – Perfil dos espectros Al-AX na presença de excesso do reagente cromogênico .....   | 78  |
| <b>Figura 6.7</b> – Espectros dos experimentos previstos no planejamento fatorial 6 X 6 para a calibração multivariada de $Al^{3+}$ e $Fe^{3+}$ , na faixa de 0 a 1,0 mg L <sup>-1</sup> , utilizando-se soluções-padrão aquosas simulando a condição dos extratos de plantas ..... | 81  |
| <b>Figura 6.8</b> – Soluções utilizadas no desenvolvimento dos modelos de calibração usando padrões aquosos .....   | 82  |
| <b>Figura 6.9</b> – Gráfico dos scores para as componentes principais 1 e 2, obtidas através da análise de componentes principais dos espectros mostrados na Figura 6.7 .....   | 83  |
| <b>Figura 6.10</b> – Raiz quadrada do erro médio relativo (%RMSE) para a avaliação da capacidade preditiva dos modelos desenvolvidos usando o algoritmo PLS-2 .....   | 85  |
| <b>Figura 6.11</b> – Estudo de interferência do sulfato na determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e ferro. Efeito sobre a determinação de alumínio .....   | 89  |
| <b>Figura 6.12</b> – Estudo de interferência do sulfato na determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e ferro. Efeito sobre a determinação de ferro .....  | 90  |
| <b>Figura 6.13</b> – Estudo de interferência do fosfato na determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e ferro. Efeito sobre a determinação de alumínio .....   | 91  |
| <b>Figura 6.14</b> – Estudo de interferência do fosfato na determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e ferro. Efeito sobre a determinação de ferro .....  | 91  |
| <b>Figura 6.15</b> – Gráfico dos scores para as componentes principais 1 e 2, obtidas através da análise de componentes principais dos espectros utilizados na calibração de extratos de solo. ....   | 96  |
| <b>Figura 6.16</b> – Gráfico dos scores para as componentes principais 1 e 2, obtidas através da análise de componentes principais dos espectros das amostras de folhas descritas na Tabela 5.4 .....   | 102 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 6.17</b> – Conjuntos de 10 amostras selecionadas utilizando o algoritmo de Kennard e Stone .....  | 103 |
| <b>Figura 6.18</b> – Curva de correlação para as concentrações de alumínio determinadas com o modelo calibrado com 40 amostras de plantas e por ICP ..... | 105 |
| <b>Figura 6.19</b> – Curva de correlação para as concentrações de ferro determinadas com o modelo calibrado com 40 amostras de plantas e por ICP .....    | 89  |

# Índice

|  |     |
|--|-----|
| <b>Capítulo I: Introdução</b> .....  | 1   |
| <b>Capítulo II: As análises químicas em plantas e solos</b> .....                            | 7   |
| II.1 Solos .....   | 10  |
| II.2 Plantas .....   | 14  |
| II.3 Controle de qualidade de resultados nas análises de solos e plantas .....               | 17  |
| II.4 Interpretação dos resultados das análises de solos e plantas .....                      | 21  |
| <b>Capítulo III: Métodos de determinação de alumínio e de ferro em plantas e solos</b> ..... | 23  |
| III.1 Os métodos de determinação .....   | 27  |
| III.2 Métodos espectrofotométricos .....   | 29  |
| <b>Capítulo IV: Calibração Multivariada</b> .....  | 37  |
| IV.1 Aspectos básicos em calibração multivariada .....                                       | 40  |
| IV.2 Alguns métodos importantes .....  | 44  |
| IV.3 Calibração multivariada, espectroscopia uv-vis e aplicações de interesse agrônomo ..... | 49  |
| <b>Capítulo V: Parte Experimental</b> .....  | 53  |
| V.1 Soluções .....   | 55  |
| V.2 Instrumental .....   | 56  |
| V.3 Amostras e extratos .....  | 57  |
| V.4 Desenvolvimento de cor e aquisição de espectros .....                                    | 59  |
| V.5 Calibração usando soluções aquosas .....   | 60  |
| V.6 Calibração usando amostras reais .....   | 62  |
| <b>Capítulo VI: Resultados e Discussão</b> .....   | 67  |
| VI.1 Estudo das condições experimentais .....  | 70  |
| VI.2 Calibração usando soluções aquosas .....  | 79  |
| VI.3 Os interferentes .....  | 88  |
| VI.4 Validação dos modelos utilizando soluções aquosas para calibração .....                 | 76  |
| VI.5 Calibração usando amostras reais .....  | 99  |
| <b>Capítulo VII: Conclusão</b> .....   | 109 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Capítulo VII: Referências bibliográficas</b> .....  | 113 |
| <b>Apêndice: Tutorial : Determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e de ferro com PLS, usando soluções aquosas para a calibração, no software Mat Lab</b> ..... | 123 |



*Introdução*

# I. Introdução

---

As análises químicas das matrizes agronômicas (solos, plantas, solução hidropônica, etc..) são importantes na produção agrícola, pois é a partir desses resultados que é possível avaliar, além da disponibilidade de nutrientes para as plantas, outros parâmetros importantes para seu desenvolvimento, tais como a acidez, a salinidade e a presença de elementos tóxicos no meio em que se desenvolvem.

Nas análises químicas para avaliação da fertilidade dos solos, os elementos que se procura quantificar são primordialmente aqueles considerados essenciais para a nutrição das plantas. Sem a presença de quantidades adequadas desses elementos, as plantas não podem completar seu ciclo de vida ou não conseguem produzir sementes viáveis (Munson e Nelson, 1990). Dentre os 16 elementos químicos atualmente classificados como essenciais, listados a seguir, treze são nutrientes minerais e os demais são carbono, oxigênio e hidrogênio. Esses elementos são fornecidos pelo solos ou meios nos quais as plantas se desenvolvem.

Os nutrientes minerais são classificados, de forma geral, como macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Zn, B, Cl, Mn, Fe, Cu e Mo), em função da quantidade relativa necessária para o bom desenvolvimento dos vegetais. Além dos macro e micronutrientes, outros elementos presentes nos solos podem apresentar aspectos relevantes quanto ao desenvolvimento de determinadas culturas, tanto devido a seus efeitos tóxicos como aos seus efeitos benéficos.

Devido à interação do sistema solo-planta, a absorção dos elementos químicos pelos vegetais torna-se um processo complexo, envolvendo diversos fatores. Entre estes fatores incluem-se a forma química em que o elemento se encontra, a capacidade de absorção da cultura, o desenvolvimento do sistema radicular de cada planta, o tempo de crescimento e a disponibilidade de outros nutrientes. Em outras palavras, a absorção dos elementos presentes nos solos pelas plantas depende de sua disponibilidade (Raij, 1991). Dada a natureza sutil destes fatores, a análise de plantas (ou diagnose foliar) é empregada de forma complementar à análise química de solos.

Os métodos empregados na análise química em solos dependem do tipo de informação que se deseja obter. Do ponto de vista da pedologia, interessa saber quais os constituintes presentes na amostra e qual a sua concentração, realizando-se determinações de seus teores totais. Por outro lado, para a avaliação da fertilidade dos solos e muitas vezes também para o monitoramento ambiental, as determinações químicas devem fornecer informações sobre um

determinado constituinte, estabelecendo não apenas qual a sua concentração, mas também a forma química em que este se encontra.

Um assunto que apresenta interesse especial na análise química de solos é a determinação de alumínio devido ao seu efeito fitotóxico. As condições em que este elemento torna-se tóxico para as plantas estão intimamente ligados à acidez do solo, que é uma das condições desfavoráveis ao desenvolvimento das culturas agrícolas mais comumente encontrada em solos brasileiros. (Raij, 1991; Raij, 1997).

Durante nosso trabalho, inicialmente um projeto para o mestrado, verificamos que as determinações volumétricas, tradicionalmente empregadas na determinação de alumínio para avaliação da fertilidade em solos, apresentavam uma série de inconvenientes dos pontos de vista analítico e prático (Coscione et al., 1998). Essas determinações consistem em titular o extrato de solo com NaOH para determinar a acidez trocável e retrotitular o mesmo extrato com HCl para determinar o alumínio trocável, com o auxílio de indicadores. Apesar da eficiência e confiabilidade dos métodos instrumentais, como os espectrofotômetros de absorção atômica e de emissão em plasma, na determinação de alumínio, considerando as condições encontradas nos laboratórios de análise de solo, a alternativa mais indicada seria a determinação espectrofotométrica desse elemento. No entanto, apesar da existência dos diversos métodos espectrofotométricos que podem ser utilizados com esta finalidade, a interferência do ferro costuma ser crítica.

A interferência do ferro observada na maioria das determinações espectrofotométricas de alumínio, tanto devido à limitada seletividade dos reagentes empregados quanto à sua química semelhante, é um problema analítico importante, usualmente contornado através da inclusão de etapas e alterações significativas na marcha analítica empregada. Se por um lado esse procedimento visa aumentar e melhorar a qualidade do sinal analítico registrado, por outro torna os procedimentos mais lentos e pode aumentar a incidência de erros operacionais, que em última instância afetam também a precisão e exatidão das determinações. Estes fatores adquirem especial importância em condições de análise de rotina, nas quais o número de amostras é elevado.

A implementação dos métodos espectrofotométricos tradicionalmente empregados nas determinações de alumínio em sistemas de análise em fluxo, para permitir o aumento de sua eficiência analítica (número de análises/hora), tem sido considerada uma alternativa importante por diversos autores (Edwards e Cresser, 1983; Mochizuki et al., 1982; Zolotov et al., 1995; Trojanowicz e Szpunar-Lobinska, 1990; Trojanowicz et al., 1991). Em alguns casos, o sistema de detecção também tem sido modificado com a intenção de se realizar a determinação

seqüencial de outros metais na mesma alíquota de amostra (Trojanowicz e Szpunar-Lobinska, 1990; Trojanowicz et al., 1991). Em outros, a determinação das concentrações dos metais de interesse é feita por diferença, após a complexação seletiva de um desses com EDTA ou é baseada na diferente cinética de formação dos complexos (Zolotov et al., 1995). No entanto, a utilização destes sistemas em condições de rotina é limitada pela sua complexidade.

Uma possibilidade interessante para contornar o problema da interferência de ferro nas determinações espectrofotométricas de alumínio, sem aumentar sua complexidade através da realização de mudanças na marcha analítica, foi explorada neste trabalho e consistiu em desenvolver modelos de calibração multivariada para o sistema químico alumínio-ferro-reagente cromogênico. O reagente selecionado para desenvolver os modelos foi o alaranjado de xilenol (AX), cuja baixa seletividade proporciona características bastante peculiares e complicações adicionais do ponto de vista das determinações, incluindo comportamento não linear em determinadas condições. Desenvolveram-se modelos de calibração multivariada, utilizando a técnica de mínimos quadrados parciais (PLS), para determinar as concentrações de alumínio trocável, na presença do ferro, em extratos de solos obtidos com as soluções extratoras KCl ou  $\text{NH}_4\text{Cl}$   $1\text{mol L}^{-1}$ , e considerando o ferro como mais um componente do sistema a ser calibrado.

Realizaram-se ainda determinações simultâneas das concentrações de alumínio e de ferro em extratos de folhas, preparando-se calibrações com soluções padrão aquosas de alumínio e de ferro. Estudou-se também o desenvolvimento de modelos empregando amostras reais para a calibração na determinação desses elementos em extratos de folhas. O número mínimo de amostras necessário para a obtenção de modelos com boa capacidade de determinação foi estudado e os resultados obtidos foram comparados com a calibração baseada em padrões aquosos.



*As análises químicas  
em plantas e solos*

N

K

Pb

Ca

Cu

Ni

B

Mg

Fe

Mn

P

Al

Cd

Zn

Mo

Cl

## *II. As análises químicas em plantas e solos*

---

As análises químicas de solos poderiam ser definidas, pelo menos a princípio, como quaisquer procedimentos de determinação de parâmetros químicos realizados nessa matriz. Porém, devido ao uso intensivo deste termo para descrever as determinações realizadas para a avaliação da fertilidade dos solos, seu significado passou a ser associado a essas determinações. Assim, as análises químicas de solos comumente referem-se à realização de análises que permitam avaliar a fração disponível dos elementos químicos que podem ser absorvidos pelas plantas, especialmente para diagnosticar se um nutriente encontra-se escasso, suficiente ou em excesso. Outros parâmetros usualmente analisados são a salinidade, a presença de elementos tóxicos nos solos, o pH e a quantidade de matéria orgânica. As análises químicas em solos representam uma parte importante dos programas de avaliação de fertilidade dessa matriz, os "Soil Testing Programs", pois as interpretações e recomendações de adubação e corretivos necessários serão realizadas com base nesses resultados (Peck e Soltampour, 1990). Assim, idealmente, o tempo requerido para a realização de análises nessas amostras deve ser o menor possível.

As análises químicas de plantas são utilizadas de maneira complementar às análises químicas dos solos, para uma avaliação mais detalhada da sua fertilidade. As análises químicas realizadas diretamente nas plantas permitem verificar os resultados dos diversos tratamentos aplicados a culturas (Munson e Nelson, 1990; Jones e Case, 1990; Bataglia, 1991). Essas determinações baseiam-se no princípio de que a concentração de um elemento ou nutriente na planta, ou em partes da planta, é resultado da interação entre os diversos fatores que influenciaram a absorção de elementos químicos durante o seu desenvolvimento, inclusive da disponibilidade dos elementos nos solos. Assim, a análise isolada dos teores totais dos nutrientes nos solos, ou das concentrações dos nutrientes determinadas através da análise química em plantas, é insuficiente para garantir um acompanhamento adequado do estado nutricional dos vegetais devido à interação de fatores químicos, físicos e biológicos em seu desenvolvimento. As determinações de elementos químicos em plantas têm recebido especial atenção no monitoramento ambiental de metais tóxicos (chumbo, cádmio, mercúrio e cromo), que podem atingir concentrações elevadas tanto em função da poluição ambiental quanto da aplicação de resíduos na agricultura.

## II.1 Solos

A adsorção de elementos químicos pelas raízes das plantas ocorre através da chamada *solução do solo*. A solução do solo é constituída por pequenas quantidades de água na qual encontram-se solubilizados nutrientes e elementos tóxicos e ocupa parte do espaço existente entre as partículas sólidas constituintes do solo. O equilíbrio entre os nutrientes solubilizados e aqueles que permanecem ligados às partículas do solo pode ser alterado, aumentando ou diminuindo sua disponibilidade, através da importante propriedade de troca de cátions do solo, da adsorção de fosfatos e sulfato, de processos biológicos que envolvem nutrientes específicos (como por exemplo o nitrogênio), de processos de óxido-redução e da lixiviação de nutrientes (Raij, 1991). Dessa forma, as análises químicas de solos para avaliação de sua fertilidade não tem como objetivo determinar os teores totais dos elementos, como na análise química em plantas, mas procurar avaliar a fração disponível destes elementos em determinadas condições.

A maior parte dos métodos de extração empregados nas análises químicas de solos foram desenvolvidos para tentar simular o comportamento das raízes e permitir a quantificação dos elementos na forma em que estes seriam absorvidos pelas plantas. Esses métodos são baseados no uso de *soluções extratoras*, que podem conter um ou mais sais dissolvidos, além de ácidos ou bases. A extração dos elementos do solo, com essas soluções, pode ser feita utilizando diversos princípios, dependendo de como os elementos de interesse encontram-se nos solos. Um exemplo é o uso da solução de KCl 1 mol L<sup>-1</sup>, empregada para a extração simultânea dos cátions Mg, Ca, Al e Na, extraídos de seus sítios de adsorção por troca iônica com os íons K<sup>+</sup> presentes em excesso na solução extratora. No caso de soluções extratoras mais complexas, contendo diversos componentes, elementos ligados aos solos de diferentes formas podem ser extraídos simultaneamente. Esse é o caso, por exemplo, da solução extratora Mehlich 3, que contém ácido acético, nitrato de amônio, fluoreto de amônio, ácido nítrico e EDTA em sua composição, sendo empregada para extrair simultaneamente P, K, Ca, Mg, Na, B, Cu, Fe, Mn e Zn.

O uso de extratores multielementares apresenta interesse especial nas análises químicas de solo, pois além da praticidade operacional envolve a redução de custos e do tempo de análise, que são variáveis importantes nas condições dos laboratórios de rotina. Na prática, esses fatores fazem com que muitas vezes as soluções extratoras mais simples também sejam usadas como extratores multielementares, como no caso da solução de KCl 1 mol L<sup>-1</sup>. Surge daí também o interesse no desenvolvimento de *extratores universais* (Jones, 1990). Idealmente, esses extratores permitiriam a extração de diversos elementos do solo, de forma rápida,

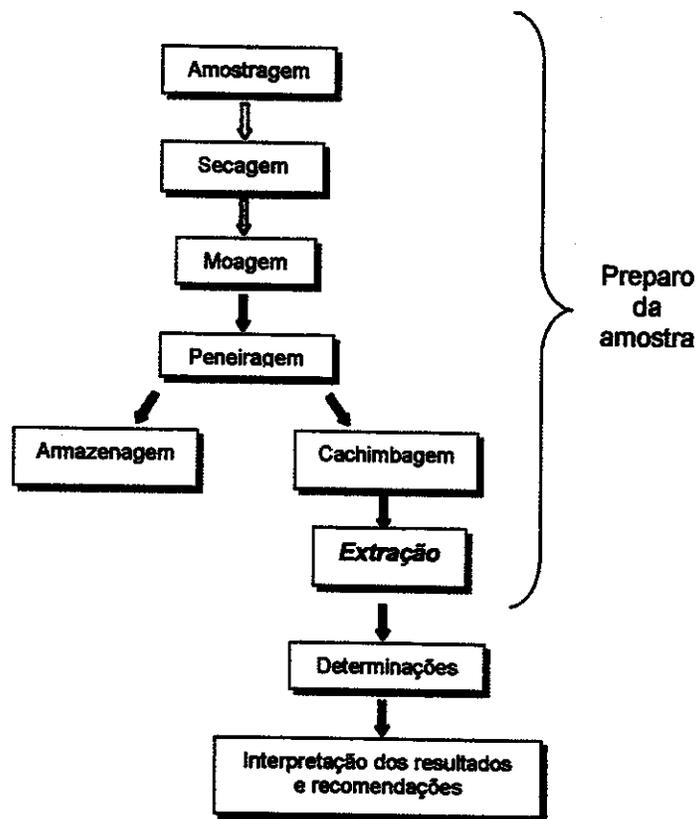
reprodutível e barata, adaptando-se aos diversos tipos de solos e proporcionando uma boa correlação com os teores disponíveis desses elementos (Raij, 1994).

Embora o uso de soluções extratoras multielementares seja um procedimento aceito e largamente empregado nas análises químicas em solos para a avaliação de fertilidade, esse é um ponto controverso, pois os extratores empregados nem sempre representam a melhor alternativa do ponto de vista agrônomo. Isso acontece pois a correlação entre os resultados das análises químicas, obtidas com as diversas soluções extratoras disponíveis, e a respostas no campo é relegada a segundo plano, em favor de fatores operacionais. A comparação de resultados e sua interpretação também é bastante complicada quando soluções extratoras diferentes são empregadas. Dessa forma, a busca por melhores alternativas para a extração da fração disponível dos elementos químicos e que permitam realizar a padronização dos métodos de extração química continuam a ser alvos de pesquisa (Raij, 1994; Raij, 1997).

### **As determinações**

A amostragem de solos é provavelmente a etapa mais importante na realização de análises químicas nessa matriz. A amostra que chega ao laboratório para ser analisada representa sempre uma pequena porção da área amostrada, que é caracterizada por uma elevada heterogeneidade, tanto horizontal quanto vertical. Para tentar minimizar esse efeito, a amostragem dos solos deve ser executada rigorosamente, segundo critérios científicos previamente definidos, para que as informações obtidas possam ser representativas da área examinada (James e Wells, 1990; Raij, 1991).

A área a ser amostrada é usualmente dividida em glebas, de até 10 hectares, com aspecto homogêneo quanto à vegetação, solo, produtividade e tratamentos aplicados. Dentro de cada gleba são retiradas de 15 a 20 amostras, número que representa um compromisso entre o ótimo teórico calculado levando em conta o tamanho da área amostrada e a precisão esperada das determinações executadas. Essas amostras, retiradas a uma profundidade de 20 cm, devem ser coletadas caminhando em ziguezague pela gleba, para depois serem misturadas para constituir uma *amostra composta*. Da amostra composta homogeneizada, cerca de 300 cm<sup>3</sup> devem ser enviados ao laboratório para análise. Recomenda-se que as análises químicas em solos sejam repetidas em períodos de um a quatro anos, dependendo da intensidade de adubação e número de culturas anuais (Raij, 1991). As etapas envolvidas na análise química de solos são mostradas na Figura 2.1.



**Figura 2.1** – Esquema das etapas da análise química de solos.

A extração deve ser realizada para permitir a maior parte das determinações, com exceção do pH, da matéria orgânica e do nitrogênio (total).

O preparo da amostra deve ser iniciado logo que chegam ao laboratório, para evitar alterações em sua composição que podem ocorrer principalmente através da mineralização da matéria orgânica. No entanto, a etapa de secagem das amostras de solo para avaliação da fertilidade deve ser feita cuidadosamente, pois também pode introduzir alterações importantes na forma química de alguns nutrientes nos solos, como é o caso do manganês. Em temperaturas elevadas, também podem ocorrer alterações nos teores de fósforo, potássio e enxofre. A secagem das amostras deve ser feita ao ar, na sombra, ou em estufa de circulação forçada a no máximo 40°C, observando cuidados para discriminar adequadamente as amostras de diferentes procedências (Raij et al., 1987).

A seguir, as amostras devem ser moídas em moinhos de martelo ou almofarizes de porcelana com pistilo de porcelana ou ferro, para destruir torrões e evitar a segregação de partículas na tomada das alíquotas empregadas nas determinações, garantindo sua maior representatividade e homogeneidade. O moinho deve ser limpo sempre que houver a troca de amostras, para evitar contaminações com os resíduos da amostra anterior. As amostras, secas

e moídas, são peneiradas com uma peneira com malha de 2 mm de diâmetro e a fração que passa está pronta para ser analisada, sendo armazenada em recipientes limpos, de vidro, plástico ou papelão, devidamente identificados. As amostras preparadas segundo esse procedimento são usualmente denominadas *terra fina seca ao ar* ou TFSA.

A tomada de alíquotas de solos para a realização das determinações é feita em volume, utilizando-se para isso *cachimbos* plásticos aferidos. Embora, a densidade dos solos possa variar, dados encontrados na literatura mostram que os resultados obtidos empregando a amostragem de solos em massa ou em volume diferem pouco e podem ser usados nessas determinações pois, em geral, frente à baixa homogeneidade da matriz a precisão das medidas não é significativamente alterada (Raij e Grohmann, 1989).

O uso das soluções extratoras permite a extração da maioria dos elementos de interesse para a avaliação de fertilidade e possibilita sua determinação, discutida no próximo capítulo, usualmente empregando métodos espectroquímicos. Um caso especial é a determinação de nitrogênio, elemento cujo comportamento complexo nos solos motiva a determinação em separado das concentrações do nitrogênio inorgânico e do nitrogênio total (orgânico + inorgânico). Na determinação do N inorgânico, cujas principais formas presentes nos solos amônio, nitrato e nitrito, são empregadas soluções extratoras para extrair esses íons, freqüentemente KCl 2 mol L<sup>-1</sup>. Um dos métodos indicados para a determinação dessas espécies consiste em determinar seqüencialmente os íons amônio, convertidos em amônia após a adição de MgO ao extrato de KCl, e os íons nitrato e nitrito após a adição de liga de Devarda (mistura contendo 50% Cu, 45% Al e 5% Zn) para reduzi-los simultaneamente produzindo amônia também. A amônia produzida em cada etapa é destilada por arraste a vapor e coletada em uma solução de ácido bórico que será retrotitulada com ácido sulfúrico, com o auxílio de indicadores visuais. A concentração de nitrito pode ser obtida por diferença, realizando-se uma nova determinação após a adição de ácido sulfâmico ao extrato (Cantarella e Trivelin, 2001a). A determinação das formas orgânicas de nitrogênio, que inclui desde compostos de baixa massa molecular até substâncias com formulas complexas e resistentes à decomposição, é feita através da determinação dos teores de nitrogênio total (orgânico + inorgânico) utilizando adaptações do método clássico proposto por Kjeldahl em 1883 e envolve a digestão da amostra à altas temperaturas com ácido sulfúrico em presença de um catalisador metálico, com a conversão de todo o nitrogênio contido na amostra para NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Cantarella e Trivelin, 2001b).

Além da determinação do nitrogênio total, outras determinações que não envolvem soluções extratoras são as determinações do pH e da matéria orgânica. A determinação do pH

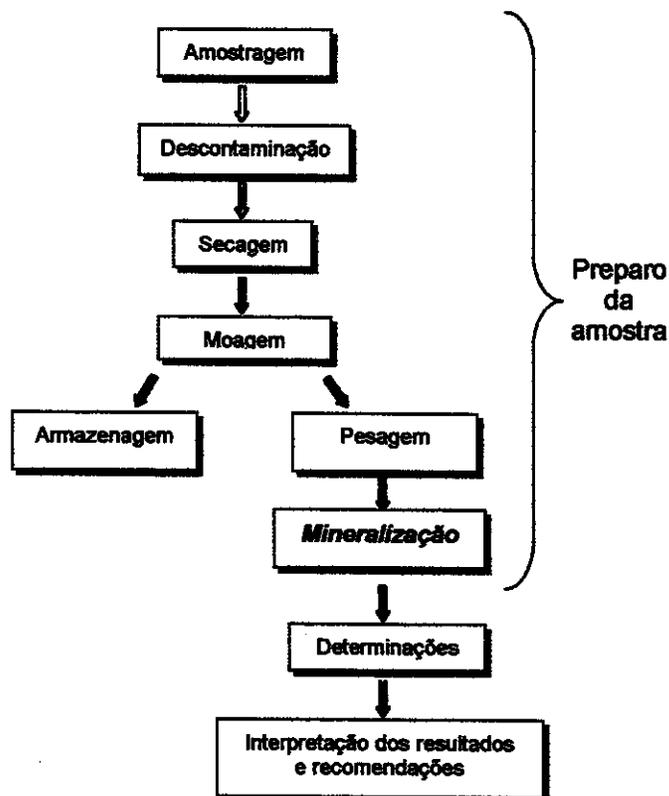
pode ser feita diretamente na suspensão de solo obtida em solução aquosa ou de cloreto de bário, com o auxílio de eletrodos de vidro. A medida do pH em soluções salinas vem sendo preferida pois não é afetada pelas condições de amostragem e diferentes tipos de solos (Raij, 1991). A determinação do teor de matéria orgânica nos solos pode ser feita por diversos métodos. Um método bastante utilizado é o proposto por Walkley e Black, que baseia-se na oxidação da matéria orgânica do solo por íons dicromato em meio sulfúrico. Nesse método, idealizado para determinar os teores de matéria orgânica facilmente oxidável ou decomponível do solo, incluindo húmus e resíduos, os íons dicromato que não reagiram são titulados com ferro(II). Alternativamente, no estado de São Paulo utiliza-se uma adaptação desse método, na qual as determinações são feitas colorimetricamente, medindo-se a absorvância dos íons  $\text{Cr}^{3+}$  formados. O método tradicional é empregado na calibração do procedimento alternativo (Cantarella et al., 2001a).

## *II.2 Plantas*

A análise química de plantas consiste basicamente na determinação dos teores totais dos elementos químicos em amostras de tecido vegetal. Os casos especiais limitam-se ao enxofre, ao fósforo e ao nitrogênio, pois além dos teores totais destes elementos pode ser necessário determinar os teores de sulfato, de fosfato e de nitrato e amônio (Mills e Jones, 1996; Jones e Case, 1990). Além de permitir verificar os resultados dos diversos tratamentos aplicados à culturas e do interesse ambiental, muitas diferenças genéticas e metabólicas entre grupos de plantas tem sido descobertas através da análise química realizada em condições de rotina e pesquisa (Mills e Jones, 1996).

Embora as concentrações de nutrientes possam variar nas diferentes partes da planta, as determinações são geralmente realizadas nas folhas dos vegetais, pois é nelas em que acontece a maioria dos processos fisiológicos (Raij, 1991). Para fins práticos, o conhecimento acumulado sobre o conteúdo de nutrientes em diversas culturas foi reunido na forma de tabelas que contém detalhes sobre a época de amostragem, a posição, idade e tamanho das folhas e quantidade de amostra a ser obtidas (Bataglia, 1991; Jones e Case, 1990). Além disso, alguns cuidados básicos devem ser observados na amostragem de folhas para estas determinações, como por exemplo, não coletar amostras cobertas de solo ou poeira, danificadas por insetos, machucadas ou doentes. A coleta de folhas com e sem sintomas de deficiência ou toxicidade de nutrientes é recomendável apenas quando o diagnóstico for de interesse.

Após a chegada do material amostrado no laboratório, diversas etapas devem ser observadas para a obtenção de resultados analíticos confiáveis, que permitam a adequada interpretação dos resultados, como mostrado na Figura 2.2.



**Figura 2.2** - Esquema das etapas envolvidas nas determinações em plantas.

A mineralização é necessária para a maior parte das determinações realizadas, com exceção das determinações de nitrogênio e enxofre. Para detalhamento ver o texto abaixo.

Assim como na análise química de solos, quanto menor for o tempo entre a coleta e o recebimento no laboratório, melhor. No entanto, as possíveis perdas nessa matriz devem-se aos processos metabólicos que ainda podem estar ocorrendo e uma vez reduzidos, as determinações podem fornecer um quadro mais próximo do encontrado em campo. Quando isso não é possível, o material amostrado deve ser resfriado a 4°C e mantido nesta temperatura ou seco antes de enviar ao laboratório (Jones e Case, 1990).

Quando chegam ao laboratório as amostras devem passar por um processo de limpeza, para eliminar contaminantes tais como partículas de solo, poeira e defensivos agrícolas. O uso de detergente diluído, seguido pelo enxágüe com água destilada e água deionizada parece ser o processo adequado para a maioria dos casos. O uso de uma solução diluída de HCl entre a água destilada e a deionizada é indicado principalmente quando as amostras são de plantas tratadas com defensivos (Bataglia, 1991). A secagem do material vegetal deve ser feita a

temperaturas suficientes para impedir o desenvolvimento de processos biológicos e retirar a umidade, porém sem decomposição térmica e deve ser feita em estufa com ventilação forçada até obter-se peso constante. Geralmente, nas condições de rotina, devido ao grande número de amostras envolvidas, utilizam-se períodos de secagem de até 48h (Jones e Case, 1990). A faixa adequada de temperatura está entre 60 e 80 °C (Bataglia, 1991; Jones e Case, 1990).

A moagem deve ser feita preferencialmente em moinhos de aço inoxidável, para reduzir a contaminação com Cu e Fe. O tamanho final das partículas depende da massa de amostra a ser utilizada na etapa de mineralização. Aparentemente, a obtenção de partículas menores do que 1 mm (passam pela peneira de 20 mesh) é suficiente quando as alíquotas utilizadas possuem massa igual ou superior a 1 g. Caso massas menores sejam utilizadas, é recomendável utilizar partículas menores do que 0,5 mm (passam pela peneira de 40 mesh). Além disso, dependendo das características do material vegetal pode ser necessário realizar uma nova secagem (Jones e Case, 1990; Mills e Jones, 1996). O material homogeneizado deve ser estocado em recipientes fechados para evitar contaminações, mas as amostras podem ser armazenadas por longos períodos sem que maiores cuidados sejam necessários para evitar alterações em sua composição química (Houba et al., 1995).

A destruição da matéria orgânica ou mineralização permite a realização de determinações da maior parte dos elementos de interesse (P, K, Ca, Mg, Al, Si, Ba, Sr, Na, B, Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, Cd, Cr, Co, Ni e Pb). A obtenção dos extratos de folhas empregados para as determinações destes elementos pode ser feita através dos processos conhecidos como via seca e via úmida. Os dois processos envolvem o tratamento com ácidos concentrados, à quente. Na via seca, a amostra é submetida à incineração em mufla, a cerca de 500°C, por algumas horas e as cinzas são dissolvidas em HCl, HNO<sub>3</sub> ou água régia (1v HNO<sub>3</sub> + 3v HCl) (Mills e Jones, 1996). Os recipientes utilizados podem ser cápsulas de porcelana ou bequeres, desde que a contaminação com Na e K não seja um fator crítico para as determinações (Mills e Jones, 1996). Na via úmida, as amostras são mineralizada através da digestão direta com ácidos, o que pode ser feito em sistemas abertos ou fechados. Várias combinações de ácidos (mesclas ácidas) podem ser utilizadas, geralmente empregando-se os ácidos nítrico, perclórico ou sulfúrico. O peróxido de hidrogênio pode ser utilizado como agente oxidante auxiliar, o que é feito freqüentemente em sistemas fechados, como na abertura por microondas em frasco pressurizado. O uso de ácido perclórico requer atenção especial devido à potencial formação de compostos explosivos, enquanto o uso de ácido fluorídrico é recomendado na mineralização de amostras com alto teor de sílica (Mills e Jones, 1996; Jones e Case, 1990; Novozamski et al., 1993).

Embora a etapa de mineralização tenha sido bastante estudada, permanece a controvérsia sobre qual o método mais indicado. Cada um dos diferentes métodos empregados na mineralização das amostras e suas variações parecem oferecer vantagens e desvantagens, reunidas e discutidas recentemente na literatura (Abreu, 1997). O método de mineralização por via seca, utilizado nas determinações feitas neste trabalho bem como nos laboratórios de análise do Instituto Agronômico de Campinas, permite que se trabalhe com uma quantidade razoável de amostra (1 g) e que se controle de forma mais eficiente as contaminações com metais proveniente do ácido empregado (Bataglia et al., 1983).

Nos casos em que a mineralização não é adequada para a obtenção das espécies que se deseja determinar outros métodos são aplicados. Para a determinação do nitrogênio, além das modificações do método Kjeldahl, pode-se empregar o método de Dumas. Esse método baseia-se na conversão do nitrogênio contido na amostra em nitrogênio molecular ( $N_2$ ). Isso é feito sob altas temperaturas com o auxílio de catalisadores numa série de etapas que envolvem a conversão do nitrogênio orgânico da amostras em óxidos e finalmente em  $N_2$ , que pode ser determinado por espectroscopia no infravermelho. Esse princípio é usualmente empregado nos equipamentos "analisadores de N" (Bremner e Mulvaney, 1982). Para a análise de S podem ser utilizados diversos procedimentos de digestão via úmida, que convertem todo o enxofre da amostras para sulfato que será analisado posteriormente, ou a combustão da amostra e quantificação na forma de  $SO_2$ , como nos equipamentos automáticos (Jones e Case, 1990; Mills e Jones, 1996). A determinação de nitrato, amônia, cloreto, sulfato e teores extraíveis de outros metais envolve diversos procedimentos de extração, sem a destruição da matéria orgânica. A quantificação destes ânions é geralmente feita com o auxílio de eletrodos ion-seletivos (Jones e Case, 1990; Mills e Jones, 1996).

### *II.3 Controle de qualidade de resultados nas análises de solos e plantas*

Como em outras situações em que são realizadas análises de rotina, a confiabilidade dos resultados e do próprio laboratório no qual foram realizadas depende do controle de qualidade dos diversos procedimentos envolvidos no processo de análise. No caso de solos e plantas deve-se destacar a necessidade de se manter um local isolado e completamente equipado, a ser utilizado exclusivamente para o preparo das amostras de solos ou de plantas e que deve ser mantido limpo e ordenado, para evitar contaminações. No entanto, o controle de

qualidade não deve se limitar às etapas químicas do processo mas deve ser observado cuidadosamente em todas as etapas relacionadas à análise da amostra, desde sua chegada até a emissão dos resultados. Uma série de requisitos é necessária para permitir a boa administração dos recursos disponíveis, de forma a facilitar o controle de qualidade dos resultados analíticos propriamente ditos. São eles (Cantarella et al., 2001b):

- a) definição do responsável pelo laboratório;
- b) treinamento de rotina e familiarização do pessoal de apoio com os conceitos de qualidade laboratorial;
- c) descrição clara e objetiva de todas as etapas envolvidas nos procedimentos analíticos;
- d) documentação dos dados e resultados obtidos nas diversas etapas analíticas, para permitir a certificação de qualidade do resultado e a eventual detecção de erros ou falhas;
- e) manutenção periódica dos equipamentos, mesmo os mais simples;
- f) acompanhamento da qualidade dos reagentes e soluções, monitoramento dos reagentes empregados quanto à presença de interferentes;
- g) uso de amostras-controle;
- h) participação em programas interlaboratoriais.

O uso de amostras-controle e a participação em programas interlaboratoriais são medidas eficazes para melhorar a exatidão dos resultados. O controle da precisão depende do uso de amostras controle, repetições e outros procedimentos internos, tais como a aferição contra métodos independentes de análise, dopagens, intercalibração e a revisão crítica dos resultados. Os procedimentos listados nos itens g e h são comuns na análise de materiais relativamente heterogêneos, como amostras de solo e de plantas. Devido à sua relevância nesse trabalho, esses tópicos serão discutidos com maior atenção.

A comparação periódica dos resultados analíticos obtidos com aqueles das amostras certificadas permite um controle de qualidade bastante rigoroso, conferindo confiabilidade e credibilidade ao laboratório, além de permitir avaliar o desempenho entre instituições congêneres. Porém, essas amostras são geralmente muito caras para uso em rotina e na prática, devido a questões operacionais e ao custo associado, é freqüente o uso de amostras-controle preparadas no próprio laboratório. Além disso, no caso de solos, as frações determinadas nas amostras certificadas nem sempre são quimicamente bem definidas e as concentrações encontradas dependem do extrator e dos procedimentos empregados (Cantarella et al., 2001b).

As amostras-controle são amostras com concentrações conhecidas dos elementos de interesse, incluídas em cada lote de amostras analisadas, de forma aleatória. Além dos cuidados quanto à homogeneidade dessas amostras, a faixa de concentração coberta por elas também deve ser a maior possível para as diferentes determinações. Sua inclusão entre as amostras recebidas pelo laboratório para análise possibilita a detecção de erros devido à contaminação dos reagentes, calibração dos aparelhos, etc., e também é possível obter uma idéia da reprodutibilidade e da faixa de variação de cada elemento determinado (Raij et al., 1987).

Alternativamente, o controle de qualidade dos resultados analíticos também pode ser feito através da participação em programas interlaboratoriais de controle de qualidade, embora os critérios de rejeição de resultados sejam mais flexíveis do que nos casos anteriores. Os programas interlaboratoriais de controle de qualidade consistem em um intercâmbio entre laboratórios, no qual uma entidade coordenadora envia amostras idênticas aos participantes e depois avalia estatisticamente os resultados. Esse tipo de programa apresenta interesse especial no controle de qualidade das determinações em material agrícola e ambiental. Seu uso, em condições de rotina, permite a aferição de procedimentos e equipamentos numa condição mais próxima da realidade destes laboratórios, na qual a faixa de concentrações encontradas é bem mais ampla do que aquela das amostras certificadas, apresentando-se dentro de uma gama de matrizes variadas, de interesse de cada laboratório (Houba et al., 1996).

Um exemplo de programa interlaboratorial de controle de qualidade de resultados analíticos é o programa "International Plant-analytical Exchange" (IPE), do qual o Centro de Solos e Recursos Agroambientais (CSRA-IAC) participa para a aferição de seus resultados. Esse programa é desenvolvido pelo departamento de Ciências Ambientais da Universidade de Wageningen, na Holanda, desde 1956, para o controle de qualidade de resultados na análise de componentes inorgânicos em plantas, com enfoque agrícola. Em 1999 iniciou-se também o controle de qualidade das determinações de componentes de valor nutricional, nas mesmas amostras.

Atualmente mais de 200 laboratórios, de 67 países, fazem parte do programa IPE. Cada laboratório recebe, trimestralmente, 4 amostras de plantas secas e moídas, com uma identificação genérica, para a análise dos elementos desejados, usando rotinas à sua escolha. Ao final de cada período, a partir dos resultados reportados pelos laboratórios, são calculados para cada amostra e nutriente, os valores da mediana dos resultados e da mediana dos desvios (MAD), incluindo as mais diversas técnicas de mineralização e determinação (Houba et al.,

1996). Estes parâmetros são empregados em substituição à média e ao desvio padrão geralmente quando a distribuição dos resultados é simétrica mas sua distribuição não é normal, possuindo uma dispersão maior ("heavy tailed data"). Este tipo de distribuição é comumente encontrado quando um parâmetro de interesse, especialmente biológico ou ambiental, é medido em diversos indivíduos ou amostras. Outra possibilidade parece ser a sobreposição de distribuições normais, com a mesma média mas com desvios padrão diferentes, decorrentes de diferenças experimentais que atuam na realização de diversas medidas em um mesmo material. Além disso, o uso da mediana é mais robusto do que o cálculo da média, em relação a amostras anômalas e o MAD pode ser utilizado para detectá-los (Miller e Miller, 1990). Nesta situação, os valores de MAD fornecem uma indicação da dispersão dos resultados (Montfort, 1996).

De fato, reporta-se que a distribuição que melhor representada os resultados das determinações de elementos nestas amostras é a distribuição  $\lambda$  de Tukey, devido dispersão verificada (Montfort, 1996). Assim, os critérios estatísticos de aceitação dos resultados baseiam-se nesta distribuição. Os resultados reportados devem ser comparados com os valores de mediana e MAD calculados pelo programa, sendo submetidos a critérios estatísticos de marcação (rejeição) de resultados, cujos limites são calculados para cada par amostra/elemento a partir de todos os dados reportados. Os resultados marcados com [ \* ], significativamente diferentes da mediana, são descartados e calcula-se uma nova mediana e seu respectivo MAD. Este procedimento é repetido ainda mais uma vez e todos os resultados reportados, as medianas e MAD calculados em cada etapa, para cada par amostra/elemento analisado são remetidos aos laboratórios participantes (Montfort, 1996).

Para comparar os resultados obtidos neste trabalho, utilizaram-se os valores finais de mediana e MAD calculados, após a exclusão das amostras marcadas com [ \* ] e [ \*\* ].

## *II.4 Interpretação dos resultados das análises de solos e plantas*

A interpretação dos resultados das determinações pode se feita por comparação com os níveis críticos, intervalos de suficiência (faixas de concentração) ou pelo sistema de diagnóstico integrado (DRIS, "Diagnosis and Recommendation Integrated System"), estudados e definidos para cada cultura.

Os critérios do nível crítico ou faixas de concentração baseiam-se na resposta da planta em termos de crescimento de produção e supõe que os outros nutrientes estejam em níveis adequados. O DRIS utiliza a relação nutrientes e comparações com as populações de plantas altamente produtivas com o auxílio de computadores, pois o processamento manual seria inviável para estabelecer quais são mais limitantes. As faixas de concentração são estabelecidas através do comportamento das plantas em relação ao aumento de concentração e pela presença ou não de sintomas de deficiência ou excesso de nutrientes, procurando-se definir pelo menos três faixas: deficiência, suficiência e excesso de nutrientes.

Para determinar-se qual o nível crítico de concentração de um nutriente e quais as faixas de concentração adequadas à boa produtividade para uma certa cultura é necessário realizar estudos em cada localidade, com plantas produtivas e experimentos de adubação em presença e ausência de nutrientes, pois estes parâmetros podem variar em função das variedades da cultura estudada. Este tipo de estudo também garante a obtenção de melhores resultados quando se utilizam as faixas de concentração e o DRIS, embora seu uso na interpretação da determinações ofereça resultados mais robustos (Bataglia,1991).

O critério de aplicação mais geral parece ser o das faixas de concentração, sendo mais fácil de determinar e apresentando diagnósticos mais robustos. Os critérios do nível crítico e do DRIS tem restrições por necessitarem de maior definição pela pesquisa, para melhor delimitação de padrões de referência. No entanto, sempre que possível, deve-se utilizar mais de um critério para chegar à melhor recomendação (Bataglia,1991).



*Métodos de  
determinação de  
alumínio e de ferro  
em plantas e solos*

### III. Métodos de determinação de alumínio e de ferro em plantas e solos

O alumínio e o ferro são elementos metálicos muito abundantes na crosta terrestre, sendo encontrados em concentrações consideráveis em diversos minerais (Bertsch e Bloom, 1996; Loeppert e Inskeep, 1996).

A geoquímica do ferro é complexa, sendo determinada pelas condições físico-químicas encontradas nos solos, tais como o pH, o potencial de óxido-redução e a presença de agentes complexantes. Nos solos, o ferro encontra-se predominantemente na forma de óxidos, fosfatos, carbonatos e compostos contendo enxofre ou sílica (Loeppert e Inskeep, 1996). Apesar de sua abundância relativa nos minerais constituintes do solo, a correlação entre os teores totais e a fração de ferro disponível para as plantas é baixa, devido principalmente à baixa solubilidade dos minerais contendo Fe(III). Assim, sua disponibilidade para as plantas também é reduzida e este pode tornar-se um fator limitante no seu desenvolvimento, o que proporciona o aparecimento de sintomas de deficiência, tais como a clorose das folhas novas (amarelamento), seguida pela diminuição do crescimento e da frutificação (Bataglia, 1991).

Nas condições normais de pH, o ferro é absorvido pelas plantas principalmente na forma de Fe(II) ou quelatos. Os mecanismos desenvolvidos pelas plantas para aumentar seu suprimento de ferro envolvem a segregação de substâncias quelantes e o abaixamento do pH na rizosfera. O ferro, como micronutriente, está envolvido em processos fundamentais para o crescimento e a produtividade dos vegetais, como a fotossíntese, respiração, assimilação de nitrogênio e enxofre e fixação biológica do nitrogênio (Bataglia, 1991). Ele participa de reações de transferência de elétrons e é componente de diversas enzimas e proteínas importantes para estes processos (Mills e Jones, 1996).

A relação entre Fe<sup>3+</sup> e Fe<sup>2+</sup> existente nos solos é determinada principalmente pelas condições de aeração. Os íons Fe<sup>2+</sup> podem ser encontrados apenas em condições não oxidantes ou de baixo pH (pH < 5,0), como por exemplo em áreas alagadas, quando ocorre redução do Fe<sup>3+</sup>. Essa redução é promovida pelo metabolismo de bactérias anaeróbias e provoca um aumento na disponibilidade de ferro, que pode levar até a intoxicação das plantas por excesso deste micronutriente. Por outro lado, sintomas de deficiência deste micronutriente podem ocorrer devido à redução na disponibilidade de ferro provocada pela elevação do pH do solo ou a feitos antagônicos entre elementos, como por exemplo entre ferro e fósforo. Este tipo de efeito pode ser provocado ainda por espécies químicas que competem com os sítios de

absorção nas raízes, o que no caso do ferro acontece com metais como cobre e manganês (Bataglia,1991). Estas características fazem com que diversos métodos de extração química sejam usados para tentar avaliar sua biodisponibilidade e quantificar as diversas frações diferentes contendo ferro que podem existir nos solos (Loeppert e Inskeep,1996).

Em solos com acidez elevada aumentam os teores solúveis de alumínio e de metais, como o próprio ferro e o manganês, que se absorvidos em quantidades excessivas tornam-se tóxicos, diminui a solubilidade (e a disponibilidade) de outros nutrientes e a atividade de microorganismos benéficos ao desenvolvimento dos vegetais (McLean,1982). Embora haja evidências de que baixas concentrações de alumínio nos solos possam estimular o desenvolvimento de alguns vegetais (Kabata-Pedias e Pendias,1984), seu efeito fitotóxico frente a diversas culturas de importância econômica e as condições de acidez geralmente associadas são o principal alvo de estudo em termos deste elemento.

A acidificação do solo consiste na remoção dos íons trocáveis  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e sua substituição por  $\text{Al}^{3+}$ , através da destruição da estrutura cristalina dos aluminosilicatos, dando origem ao alumínio trocável. A formação de solos ácidos ( $\text{pH} < 5,0$ ) pode ocorrer devido às características do material de origem ou a condições que favoreçam a eliminação de elementos químicos, resultando na dissolução acelerada da estrutura cristalina destes minerais (Raij,1991).

Além disso, os solos cultivados podem ter sua acidez aumentada por erosão, extração dos cátions trocáveis  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  pelas culturas e por lixiviação. Nesta situação o alumínio inibe o desenvolvimento das raízes, fazendo com que estas cresçam pouco e se tomem fracas, sendo pouco eficientes na absorção de nutrientes e água (Raij,1991). Este efeito é tão importante, que a neutralização da acidez atribuída ao alumínio já foi sugerida como critério para a recomendação de calagem em solos tropicais (Kamprath, 1970). No entanto, tem-se verificado que a determinação de outros fatores, tais como a CTC<sup>1</sup> em pH 7, podem levar à obtenção de melhores resultados em termos de produtividade agrícola (Raij, 1991; Raij e Quaggio, 1997).

Em solos ácidos a dissolução do retículo cristalino dos aluminosilicatos, que ocorre normalmente, é acelerada, liberando íons  $\text{Al}^{3+}$ . Este íon, conhecido como alumínio trocável, liga-se predominantemente através de ligações eletrostáticas às partículas coloidais do solo e pode ser deslocado dos sítios de adsorção por troca iônica.

---

<sup>1</sup> A capacidade de troca de cátions (CTC) , corresponde à capacidade do solo em reter cátions. A CTC é dada pela soma da concentração dos seguintes elementos:  $\text{Al}^{3+} + \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{K}^+ + \text{Na}^+ + \text{H}^+$ .

O alumínio trocável é extraído dos solos usando como extratores soluções salinas, tais como as soluções 1 mol L<sup>-1</sup> de KCl, NH<sub>4</sub>Cl e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Além de Al<sup>3+</sup>, também são extraídas dos colóides do solo pequenas quantidades de hidrogênio não dissociado, denominadas acidez residual, os cátions trocáveis Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup> e pequenas quantidades de ferro.

O ferro extraído dos solos com estas soluções corresponde ao ferro dissolvido e ao ferro trocável, que ocorrem geralmente em concentrações bastante baixas. Assim, não há interesse agronômico na determinação isolada destas frações pois estas representam apenas uma parte da fração disponível para as plantas (Loeppert e Inskeep, 1996). Os procedimentos mais usados para estabelecer o índice de disponibilidade de ferro para as plantas são as extrações com EDTA e DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético).

O método com DTPA, tamponado com trietanolamina em pH 7,3, foi desenvolvido para uso em solos neutros ou calcários (básicos), para avaliar também a disponibilidade de Zn, Mn e Cu. Quanto ao ferro, o DTPA foi concebido para complexar os íons Fe<sup>3+</sup>, além daquele presente nas frações solúvel e trocável, também com aquele contido nas frações sólidas, predominantemente formada por óxidos de ferro (Loeppert e Inskeep, 1996). A aplicação deste método em condições de solos ácidos tem sido estudada (Abreu et al., 1997; Abreu et al., 2001).

### *III.1 Os métodos de determinação*

Os métodos espectrofotométricos de análise são os mais empregados na determinação do alumínio e do ferro em solos e plantas, bem como na maior parte dos demais elementos químicos de interesse nestas matrizes. Assim, cabe aqui uma visão mais geral dos métodos empregados nas determinações de elementos químicos em solos e plantas.

Atualmente, as técnicas mais utilizadas nestas determinações são a emissão atômica em chama para K e Na, e espectroscopia de absorção atômica (AAS) ou emissão atômica em plasma de argônio indutivamente acoplado com detecção óptica (ICP-AES) para os outros elementos, com exceção do nitrogênio e do enxofre, na forma de sulfato (Wright e Stuczynski, 1996; Soltanpour, et al., 1982; Mills e Jones, 1996). Antes do desenvolvimento da técnica de emissão em plasma era comum utilizar-se os espectrógrafos de arco e centelha (Specht et al., 1965) e atualmente o interesse no uso de espectrômetro de plasma com detecção por espectrometria de massas (os ICP-MS) tem aumentado, especialmente devido à possibilidade de especiação isotópica e melhores limites de detecção oferecidos por esta

técnica. No entanto, a relação custo/benefício para estas determinações deve ser cuidadosamente avaliada (Soltanpour et al., 1996).

As técnicas de espectrometria atômica são muito empregadas nas determinações de rotina nestas matrizes devido à adequação entre suas características analíticas e as necessidades encontradas nos laboratório, tais como os limites de detecção, a sensibilidade e precisão, simplicidade operacional, possibilidade de utilização de equipamentos semi automatizados, baixo custo relativo por amostra e boa eficiência dos equipamentos (determinações/hora) (Andrade e Abreu, 2001). No caso dos espectrômetros de plasma, destaca-se ainda a possibilidade de determinações multielementares. Esta associação tem produzido resultados bastante satisfatórios, e a despeito do desenvolvimento de novos equipamentos e técnicas, continua motivando a inclusão de capítulos de revisão, que contemplam aspectos teóricos e práticos, em importantes compêndios sobre os métodos empregados na análise química de solos, como os da série da Soil Science Society of America (Black, 1965; Page et al., 1982; Sparks, 1996). Esta mesma tendência é acompanhada de forma mais discreta em publicações dedicadas à análise de plantas (Mills e Jones, 1996; Westerman, 1990).

Outras técnicas que podem ser utilizadas para a determinação de elementos nestas matrizes são a espectroscopia de fluorescência de raios-X e a análise de ativação por nêutrons. Porém, seu emprego é restrito pois estas técnicas apresentam inconvenientes quanto à sua utilização em determinações de rotina. Para as determinações por ativação com neutrons é necessário ter à disposição um reator nuclear ou outra fonte de neutrons, enquanto na fluorescência de raios-X devem ser levados em conta fatores como o efeitos interelementos, o tamanho das partículas da amostra e as respostas de baixa intensidade obtidas para os elementos leves, especialmente nos solos (Helmke, 1996; Karathanasis e Hajek, 1996).

Dentre as técnicas espectroquímicas de análise, o uso de métodos espectrofotométricos na região do ultra-violeta e visível (uv-vis) na determinação de elementos em solos e plantas permanece como uma alternativa importante e continuam sendo apresentados nos compêndios citados, inclusive nos mais recentes (Mills e Jones, 1996; Sparks, 1996). Esses métodos são empregados especialmente nos casos em que os investimentos na aquisição de espectrômetros de absorção atômica ou espectrometria de emissão em plasma são proibitivos. No entanto, em algumas situações esta permanece como a melhor opção, como por exemplo na determinação de B com Azometina-H (Andrade et al., 1988) e na determinação catalítica de Mo (Andrade et al., 1993).

Nas determinações em extratos de solos pode ser empregada ainda a determinação da acidez trocável/alumínio trocável por titulação, segundo o procedimento clássico descrito na literatura (Yuan,1959; McLean,1965). No entanto, a determinação de alumínio por AAS, independente da matriz considerada, requer condições mais energéticas do que as usadas para os demais elementos. Nas condições normais de análise ocorre a formação de óxidos de alumínio refratários, que não são atomizados quantitativamente e o óxido nitroso deve ser utilizado. Neste caso, a melhor alternativa parece ser a emissão atômica em plasma, devido à sua temperatura elevada. No entanto, a implementação de um ICP requer condições econômicas favoráveis (Andrade e Abreu, 2001).

### *III.2 Métodos espectrofotométricos*

A alternativa mais simples para a determinação de alumínio e ferro, entre outros elementos encontrados nos extratos de solos, é a determinação espectrofotométrica. Esta também é uma opção importante nas determinações em extratos de folhas embora, devido à análise de teores totais realizadas nestes extratos, tenha sido dada preferência à determinação por AAS para o ferro e ICP para o alumínio.

Os diversos métodos espectrofotométricos disponíveis para a determinação de alumínio e ferro podem ser utilizados nas determinações em extratos de solos e plantas (Marczenko, 1976; Onishi,1986). Estes métodos oferecem boa precisão e exatidão, além do menor custo em relação às técnicas instrumentais. Assim, diversos estudos envolvendo sua aplicação nas determinações em solos e plantas e a comparação dos resultados com métodos instrumentais e outros métodos espectrofotométricos continuam a ser feitos em busca de procedimentos mais robustos e funcionais (Dominik e Kaupenjohann, 2000; Ferreira et al., 1998; Campi e Ingle,1989; Willoughby, 1986; Thornton et al.,1985). Apresentamos a seguir os métodos que considerou-se serem os mais representativos na determinação destes elementos.

#### *Determinação de Alumínio*

A maioria dos reagentes orgânicos empregados na determinação espectrofotométrica de alumínio é constituída por corantes ou substâncias de estrutura química semelhante. Estes reagentes são em geral espécies volumosas e que contém um ou mais grupos -OH, fenólicos

ou carboxílicos, nos quais o H pode ser substituído. Muitos destes reagentes são polidentados, ou seja, podem se ligar ao íon metálico através de mais de um ponto.

A formação de complexos coloridos, conhecidos como "lakes", entre o ligante orgânico e os íons metálicos envolve, geralmente, a coordenação do alumínio ou espécies que contém átomos de alumínio, como os seus hidróxi-compostos, a um átomo de oxigênio, vizinho a grupos ricos em elétrons tais como =O, -OH e -N=, do ligante (Onishi, 1986). Este mecanismo de coordenação faz com que as constantes de formação dos complexos sejam pequenas. Isso reduz a sensibilidade destes métodos espectrofotométricos em relação aos com outros metais e faz com que espécies aniônicas como fosfato, sulfato e fluoreto, que competem com o reagente orgânico, possam interferir nas determinações. Como consequência, estes reagentes são pouco seletivos em relação ao alumínio e bastante sensíveis quanto a mudanças de pH. Assim, especial atenção é exigida quanto ao ajuste das condições experimentais para obter-se boa reprodutibilidade e exatidão. A interferência do ferro, mesmo em pequenas concentrações, costuma ser crítica. Portanto, nos métodos espectrofotométricos usando procedimentos convencionais, a eliminação ou mascaramento destes interferentes é imprescindível.

Embora a relação íon:ligante normalmente seja um número inteiro ou aproximadamente inteiro, a exata composição dos produtos formados geralmente não é conhecida (Onishi, 1986). Desta forma, diversos autores preferem evitar tais métodos, especialmente em estudos envolvendo especiação, pois consideram que os conhecimentos acumulados sobre mecanismo de reação e a estequiometria envolvida são insuficientes (Bertsch e Bloom, 1996; Bloom e Erich, 1996).

Bons trabalhos de revisão e comparação entre os métodos espectrofotométricos disponíveis para a determinação de alumínio, a partir de diferentes pontos de vista, podem ser encontrados na literatura (Tikhonov, 1965; Dougan e Wilson, 1974; Royset, 1985, Onishi, 1986). Entre estes merecem menção os métodos espectrofotométricos com eriocromo cianina R (ECR) (Jones e Thurman, 1957) e pirocatechol violeta (PCV) (Dougan e Wilson, 1974), devido à sua elevada sensibilidade, e o do aluminon (aurintricarboxilato de amônio) (Chenery, 1948; Jayman e Sivasubramaniam, 1974), devido ao seu uso extensivo por volta das décadas de 1950-1970 e à quantidade de informações acumuladas. A determinação de alumínio com aluminon ainda é o método recomendado pela AOAC em corretivos agrícolas (Método 965.02) (Cunniff, 1997).

O método espectrofotométrico com aluminon é um bom exemplo de várias características descritas referentes aos reagentes utilizados na determinação de alumínio. Embora seja o menos sensível dos métodos destacados ( $\epsilon = 2,0 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Royset, 1985), o aluminon já foi um dos métodos espectrofotométricos mais empregados na

determinação de alumínio, mas deixou de ser utilizado devido a uma série de inconvenientes operacionais. Entre estes podemos citar a elevada sensibilidade da solução de medida em relação a temperatura e ao pH, a necessidade de aquecimento para aceleração da reação e a não linearidade pronunciada da curva de calibração, fazendo com que a faixa analítica de trabalho fosse bastante estreita (Dougan e Wilson, 1974; Onishi, 1986).

Além disso, quando utiliza-se o aluminon, ocorre também a formação de complexos sem carga. Estes complexos podem formar agregados de natureza coloidal na solução de medida e dificultam a determinação espectrofotométrica, provocando o espalhamento do feixe de luz incidente. Para evitar que isso aconteça é preciso utilizar substâncias que evitem a formação de colóides, tais como amido ou gelatina (Onishi, 1986). Embora sensível à presença de fluoreto, o método do aluminon é particularmente tolerante à presença de fosfato (Royset, 1985). Como as leituras devem ser feitas em 530 nm, não é possível utilizar a 1,10-fenantrolina para complexar o ferro, mas este pode ser reduzido usando ácido ascórbico, hidroxilamina ou ácido tioglicólico (mercaptoacético) – que também serve de complexante. O uso do ácido mercaptoacético pode ser um inconveniente porque reduz a absorvância do complexo com alumínio e deve ser incluído nos padrões (Jayman e Sivasubramanian, 1974).

O controle de pH deve ser rigoroso, embora as determinações possam ser feitas numa faixa ótima entre 4 e 5,5 (Tikhonov, 1965). Nessa faixa o tampão acetato/ácido acético pode ser usado com sucesso, o que representa uma vantagem devido à disponibilidade do reagente e bom tamponamento obtido nesta faixa de pH.

Os métodos com ECR e PCV possuem sensibilidade bastante semelhante ( $\epsilon = 6,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e  $6,9 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente) (Royset, 1985). O desenvolvimento de cor deve ser feito em pH 6. Nesta faixa de pH, a solução tampão mais indicada parece ser o tampão saturado com hexametiltetramina (HMTA), pois soluções contendo fosfatos ou ácidos carboxílicos não devem ser usadas (Royset, 1985). Uma concentração alta de HMTA deve ser empregada para compensar a sua baixa capacidade de tamponamento na faixa alcalina ( $\text{pK}_a = 5,1$ ).

O controle de pH no método da ECR é crítico, pois o reagente absorve muita radiação em pHs inferiores, enquanto em pHs superiores a formação do complexo é lenta. As leituras devem ser feitas em 540 nm. Acertando o pH em 6 a reação começa em alguns minutos, mas a absorvância só permanece estável após 90 min (Onishi, 1986; Dougan e Wilson, 1974). As leituras podem ser feitas em tempos menores, desde que feitas com muito cuidado e num intervalo de tempo bem definido para obter-se resultados reprodutíveis. Se por um lado, não é necessário aquecer a solução para o desenvolvimento de cor, por outro, o complexo formado é

bastante sensível às mudanças de temperatura. Além disso, pequenos desvios da lei de Beer são reportados na literatura (Dougan e Wilson, 1974).

A sensibilidade do método com ECR pode ser aumentada através do uso de estabilizantes, como policetoaminas ou surfactantes, que também aumentam a estabilidade do complexo (Hill, 1966). Com o uso de brometo de cetiltrimetilamônio a sensibilidade é praticamente dobrada ( $\epsilon = 1,15 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Royset, 1985). Neste caso, as características de absorção do complexo são alteradas e as leituras devem ser feitas em 585 nm. A mudança no comprimento de onda de absorção do complexo possibilita a eliminação da interferência do ferro por redução e complexação com a 1,10 - fenantrolina. Esta estratégia não pode ser utilizada sem o uso de estabilizantes pois o complexo de Fe-fenantrolina absorve radiação próximo ao comprimento de onda no qual são realizadas as medidas. Este ganho em sensibilidade torna este método bastante interessante para a análise de alumínio em água, onde as concentrações medidas são bastante baixas (Royset, 1985).

A mesma estratégia pode ser adotada para eliminar a interferência do ferro, no método com o PCV. Ao contrário da ECR, a absorção do excesso de reagente não afeta significativamente as determinações. Embora pequenas variações de pH não sejam críticas segundo este ponto de vista, o pH deve ser controlado em  $\pm 0,1$  para garantir uma boa complexação do Al. As reações são rápidas e o complexo Al-PCV é relativamente estável à variações de temperatura. A absorbância tende a aumentar com o tempo e as leituras, realizadas em 585 nm, devem ser feitas após um tempo de espera fixo sem que seja necessário um controle rigoroso (Dougan e Wilson, 1974). O método com PCV parece ser mais robusto em relação aos interferentes fosfato e sulfato do que o ECR (Dougan e Wilson, 1974). Embora bastante promissor, o método do PCV não parece ter confirmado estas expectativas nas determinações de alumínio em extratos de KCl (Willoughby, 1986).

O método espectrofotométrico com alaranjado de xilenol (AX) foi inicialmente estudado por Otomo (1963), sendo aplicado em solos por Pritchard (1967) e não é dos mais sensíveis ( $\epsilon = 2,1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Tikhonov, 1965). A interferência de ferro é usualmente eliminada através de mascaramento com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), mas devido à formação do complexo Al-EDTA, com cinética mais lenta, a leitura deve ser feita exatamente 1 hora após sua adição. Este problema, abordado de maneira crítica por Pritchard (1967), foi melhor estudado por Tikhonov (1965).

As leituras podem ser feitas no máximo de absorbância do complexo com Al (555 nm) ou no ponto isobéstico (536 nm) (Otomo, 1963). Neste comprimento de onda, a determinação é menos sensível às mudanças de concentração do reagente. A faixa ótima de pH é de 3,2 a 3,8,

ajustada usualmente com um tampão acetato/acido acético. Nesta faixa de pH o método é mais sensível, mas a formação de complexos de AX com Al também ocorre em pH 5,0 e aparenta ser mais estável (Tikhonov,1965). Em pH mais baixo, a absorção do reagente é menor próximo ao máximo de absorção do complexo mas a reação entre Al e AX é lenta, devendo ser acelerada por aquecimento. Este procedimento é problemático porque mesmo após o resfriamento da solução, a absorbância decai com o tempo (Tikhonov, 1965). Alternativamente, etanol pode ser utilizado para acelerar a reação, dispensando o aquecimento (Dodson e Jennings, 1972).

### *Determinações de Ferro*

Da mesma forma que para o alumínio, um grande número de métodos espectrofotométricos podem ser utilizados na determinação de ferro (Onishi,1986; Marczenko,1976). Entre estes, muitos reagem somente com Fe(II) ou com Fe(III), mas há exceções (Tikhonov,1965). Quando a reação ocorre com os íons  $Fe^{3+}$ , a competição entre o reagente utilizado e íons como fluoreto e fosfato, que formam complexos estáveis com o ferro trivalente em meio ácido, é significativa e podem interferir nas determinações. Assim, pode ser conveniente reduzir todo o ferro à Fe(II) e realizar as determinações com um reagente seletivo para este estado de oxidação, pois caso formados, os complexos com estas espécies serão menos estáveis (Onishi,1986). O controle do pH também é um fator importante nestas determinações.

Na determinação de ferro, além de reagentes orgânicos cromogênicos também podem ser utilizados reagentes que não possuem espectro de absorção no visível. Isto é possível pois os íons  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  podem reagir com algumas espécies aniônicas, formando complexos de transferência de carga, que absorvem radiação na região do visível e produzem complexos coloridos. Um exemplo deste comportamento é a formação de complexos de  $Fe^{3+}$  com os íons tiocianato.

O método espectrofotométrico com tiocianato ainda é bastante usado devido à disponibilidade do reagente e seu baixo custo, embora melhores opções estejam disponíveis. Além disso, o desenvolvimento de cor pode ser feito em condições relativamente ácidas (pH 3) e o procedimento é simples e rápido. Porém, ocorre a formação de diversos complexos sob a fórmula geral  $Fe(SCN)_n$  <sup>3-n</sup> (n = 1,2, ...,6) numa série de reações em equilíbrio. Em decorrência da existência deste equilíbrio, acontecem desvios da lei de Beer. Outra característica importante

é o esmaecimento da coloração em função do tempo, na presença de luz ou com o aumento da temperatura, devido à decomposição dos íons tiocianato em meio ácido (Onishi,1986; Marczenko,1976).

Os reagentes mais seletivos e que oferecem também maior sensibilidade na determinação de ferro são bases orgânicas bidentadas que possuem o grupo  $-N=\overset{|}{C}-\overset{|}{C}=N-$ , ligando-se a íons metálicos através dos pares de elétrons livres do N. A formação dos complexos envolve a coordenação de três moléculas de ligante para cada átomo de ferro. Os complexos formados com íons  $Fe^{2+}$  possuem absorção na região do visível, são estáveis e os métodos baseados na determinação espectrofotométrica desta espécie obedecem a lei de Beer. Entre estes reagentes podemos citar o 2, 2' bipyridil ( $\epsilon = 8,7 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda = 512 \text{ nm}$ ), a 1,10- fenantrolina ( $\epsilon = 1,1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda = 512 \text{ nm}$ ) e os derivados destes dois reagentes. De forma geral, os derivados do 2, 2' bipyridil e da 1,10-fenantrolina possuem sensibilidade e características semelhantes a estes reagentes, destacando-se a batofenantrolina (4,7-difenil-1,10-fenantrolina) ( $\epsilon = 2,2 \times 10^4$ ,  $\lambda = 533 \text{ nm}$ ) (Marczenko,1976; Onishi,1986).

Em geral, o uso de reagentes com o grupamento  $-N=\overset{|}{C}-\overset{|}{C}=N-$  permite a determinação de íons  $Fe^{2+}$  na presença de concentrações elevadas de  $Fe^{3+}$ . A determinação de  $Fe^{3+}$  deve ser feita por diferença, após sua redução e determinação dos teores totais de ferro na solução analisada. Diversos agentes redutores podem ser empregados neste procedimento, embora condições ótimas possam ser obtidas em casos particulares (Marczenko,1976).

O complexo da 1,10-fenantrolina com os íons  $Fe^{2+}$  possui coloração vermelho alaranjado, com absorbância máxima em 508nm. Sua formação é pouco afetada pelo pH do meio reacional, ocorrendo em condições ótimas numa faixa ampla, de 2 a 9. Neste método formam-se também complexos com o íon  $Fe^{3+}$ , com absorção máxima na região do ultravioleta. Assim, a determinação de  $Fe(III)$  pode ser feita na mesma solução devido à existência de um ponto isoabsorptivo (isobéstico) em 396 nm, no qual determina-se a absorbância dos complexos da 1,10 fenantrolina com o ferro nos seus dois estados de oxidação. Íons como fosfato e fluoreto interferem em concentrações elevadas em relação aos outros métodos disponíveis, mas as determinações com a 1,10 fenantrolina podem ser realizadas em pH ácido ( $pH < 4,0$ ), reduzindo ainda mais o efeito de interferência destes íons.

Embora os dados encontrados na literatura sejam contraditórios a respeito da interferência de fosfato e fluoreto nas determinações com a batofenantrolina, é bastante provável que estas espécies produzam efeitos de interferência significativos, pois o pH ótimo da

reação de complexação encontra-se entre 4 e 6. Além disso, este parece ser o fator preponderante no que toca à interferência de outras espécies aniônicas, tais como oxalato e citrato, que não são importantes nas determinações com a 1,10-fenatrolina.

Diversos cátions, geralmente bivalentes, são interferentes importantes nas determinações com a 1,10-fenatrolina e com a batofenatrolina, por serem coloridos ou produzirem complexos com estes reagentes. Destaca-se a interferência de cobre no método com a batofenatrolina e de mercúrio(I) com a 1,10-fenatrolina. O controle do pH e a adição de mascarantes como tartarato e EDTA reduzem estes efeitos e evitam também a precipitação de cátions como titânio e alumínio, que podem hidrolizar em função das condições experimentais utilizadas.

Um comportamento bastante diverso em relação aos métodos de determinação de ferro que estivemos discutindo é o do AX, que pode reagir com Fe(II) e Fe(III). Embora a sensibilidade reportada na literatura para a determinação de Fe(III) seja elevada ( $\epsilon = 2,7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), as determinações devem ser feitas em meio fortemente ácido e sob controle rigoroso (pH 1,2 – 1,4). Recomenda-se que as leituras sejam feitas após 15 minutos, em 550 nm (Cheng,1959). Porém, a cinética de formação deste complexo é rápida e não parece ser importante nestas determinações (Tikhonov,1965; Pritchard,1967).

A existência de pontos discordantes ou obscuros nas determinações de Fe(III) com AX, que pode ser atribuída em parte à dificuldade de purificação deste reagente, levou à publicação recente de um trabalho que procura esclarecer diversos destes pontos (Craig et al., 1999a). Os mesmos autores, com base nestes estudos, propuseram um procedimento otimizado para a determinação de hidroperóxidos em matrizes biológicas (Craig et al., 1999b). A determinação de hidroperóxidos em matrizes biológicas é de grande interesse em bioquímica e biomedicina pois estas espécies podem indicar danos em estruturas como o DNA, lipídeos e proteínas, entre outras moléculas, que produzem efeitos deletérios em células e microorganismos. O método baseado no complexo Fe(III)-AX há tempos foi proposto como uma alternativa na determinação de hidroperóxidos, mas a química envolvida na formação desse complexo ainda permanece obscura.

Nas condições de acidez ótimas para a complexação de Fe(III) com AX, confirmadas nos estudos de Craig et al. (1999a e 1999b), poucos metais produzem complexos coloridos, entre os quais háfnio e zircônio e estanho. Dentre os ânions, a interferência de sulfato e fluoreto é importante (Cheng,1959). Outros trabalhos mostram que a formação de complexos de AX com ferro na forma de Fe(III) também é significativa nos pHs 3 e 5 e com Fe(II) em pH 5,0, o suficiente para interferir na determinação de alumínio (Tikhonov,1965).



*Calibração  
Multivariada*

N K Pb  
Cu Ca  
Ni B Fe Mg  
Mn P Al  
Cd Zn  
Mo Cl

## *IV. Calibração Multivariada*

---

A calibração multivariada é uma parte importante da quimiometria, disciplina da química que inclui métodos de análise estatística, modelamento matemático e inteligência artificial, com o objetivo de projetar e/ou selecionar procedimentos e experimentos de forma otimizada para a aquisição de dados químicos, obtendo o máximo de informação através da análise destes dados (Massart et al., 1988).

O uso destes métodos tanto na química, como em outras ciências experimentais, está intimamente ligado ao desenvolvimento do computador e de equipamentos capazes de realizar diversas medidas em uma amostra, simultânea ou seqüencialmente, permitindo assim a aquisição e o tratamento multivariado destes dados (Martens e Naes, 1989; Thomas, 1994).

No entanto, a aquisição de um grande volume de dados, mesmo que de alguma forma os experimentos tenham sido planejados, não significa necessariamente que estes contenham a informação necessária para descrever a propriedade ou propriedades de interesse nas amostras, nem que o modelo construído descreva este sistema de forma otimizada (Beebe e Kowalski, 1987). Assim, o planejamento dos experimentos e a seleção das variáveis a ser consideradas nestes experimentos também são alvos de estudo da quimiometria, e devem ser levados em conta quando pretende-se utilizar métodos mais sofisticados para obter informações acerca dos dados coletados. Esta etapa é tão importante quanto as demais, embora prevaleça ainda a idéia de que os métodos multivariados de análise e calibração possam realizar verdadeiros "milagres".

Para que o grande potencial dos métodos de calibração multivariada na resolução de problemas químicos possa ser bem aproveitado são necessários alguns requisitos. Deve-se conhecer a química envolvida no sistema em estudo, definindo-se claramente quais são os objetivos a serem alcançados. Além disso, deve-se estar familiarizado com as técnicas mais comuns, para que seja possível definir uma linha de ação, buscando e selecionando o(s) método(s) mais adequado(s) para cada situação em particular. Feito isso, somente então deve-se passar à etapa de planejamento de experimentos para a calibração e validação dos modelos desenvolvidos, já que nem sempre resultados pré existentes, obtidos sem uma estratégia pré-concebida podem ser aproveitados. Porém, mais importante do que os passos individuais é encarar o processo de desenvolvimento dos modelos como um todo, no qual o ajuste e bom funcionamento das partes é crucial para atingir os objetivos desejados.

## IV.1 Aspectos básicos em calibração multivariada

Para ilustrar melhor os aspectos básicos envolvidos na construção dos modelos utilizaremos como exemplo, a partir deste ponto, os dados do trabalho desenvolvido nessa tese. Assim, as medidas instrumentais corresponderão aos espectros de soluções padrão, obtidas segundo um planejamento experimental  $6 \times 6$  (descrito detalhadamente na parte experimental)<sup>2</sup>, contendo concentrações conhecidas de alumínio e de ferro. Os espectros desse planejamento experimental foram obtidos entre 350 e 650 nm, medindo-se a absorvância em 151 comprimentos de onda. As duas propriedades de interesse a serem calibradas são as concentrações de alumínio e de ferro. Esses metais quando complexados com o alaranjado de xilenol são responsáveis por gerar os espectros estudados.

A calibração multivariada consiste em tentar estabelecer uma relação entre os dois blocos de dados de informação química disponível, o das medidas instrumentais (no nosso caso espectros na região do visível) e o da propriedade calibrada (concentração dos metais) (Martens e Naes, 1989; Beebe e Kowalski, 1987). A exemplo do procedimento clássico de calibração, o desenvolvimento de modelos com calibração multivariada envolve duas etapas: o desenvolvimento (ou calibração) e a validação (previsão). Assim, na fase de calibração deve-se preparar um conjunto de padrões, a partir dos quais possam ser obtidas medidas instrumentais indiretas, constituídas de mais de uma resposta, relacionadas à propriedade de interesse. A propriedade de interesse nesses padrões deve ser quantificada através de um método de referência, independente, de precisão e exatidão conhecidas. Antes de iniciar os cálculos, esses dados devem ser digitalizados e agrupados em matrizes.

No nosso exemplo, 26 dos 36 espectros das soluções padrão preparadas serão agrupados numa matriz em que cada linha corresponderá a um espectro e cada coluna conterá as medidas de absorvância para um determinado comprimento de onda, obtendo-se uma matriz  $26 \times 151$  (linha  $\times$  coluna). A outra matriz será constituída pelas concentrações de referência de alumínio e ferro correspondentes a essas soluções, obtendo-se uma matriz  $26 \times 2$ . As concentrações de alumínio ou ferro devem estar descritas sempre na mesma coluna. Estes passos podem ser visualizados com o auxílio da Figura 4.1. Estes dois blocos de informação, digitalizados e agrupados na forma de matrizes, constituirão o *conjunto de calibração* e serão utilizados para construir o modelo utilizando o método de calibração selecionado (Martens e Naes, 1989).

---

(<sup>2</sup>) - Dois metais em seis níveis de concentração, num total de 36 experimentos.

Além de digitalizar e agrupar os dados em matrizes, pode ser necessário realizar também algum tipo de manipulação dos dados do conjunto de calibração para a obtenção de um modelo de calibração melhor. Algumas destas operações, conhecidas como *pré-processamento*, devem ser realizadas apenas na matriz de medidas instrumentais, outras nas medidas instrumentais e nos valores de referência. Estas operações podem ter uma série de objetivos diferentes, entre os quais facilitar os cálculos, normalizar dados com diferentes grandezas matemáticas para ponderar sua significância ou corrigir não linearidades de fontes diversas e efeitos instrumentais, como no caso do espalhamento de radiação em medidas na região do infravermelho (Martens e Naes,1989). Os dois primeiros efeitos podem ser conseguidos centrando-se os dados na média e escalonando-os pela sua variância, respectivamente. Quando operações de pré-processamento dos dados forem utilizadas durante a calibração, elas também devem ser utilizadas sempre que forem ser feitas previsões.

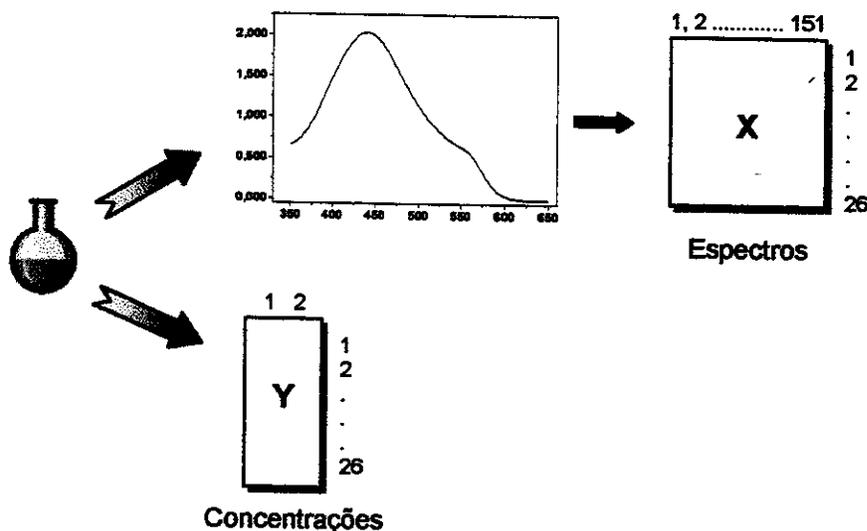
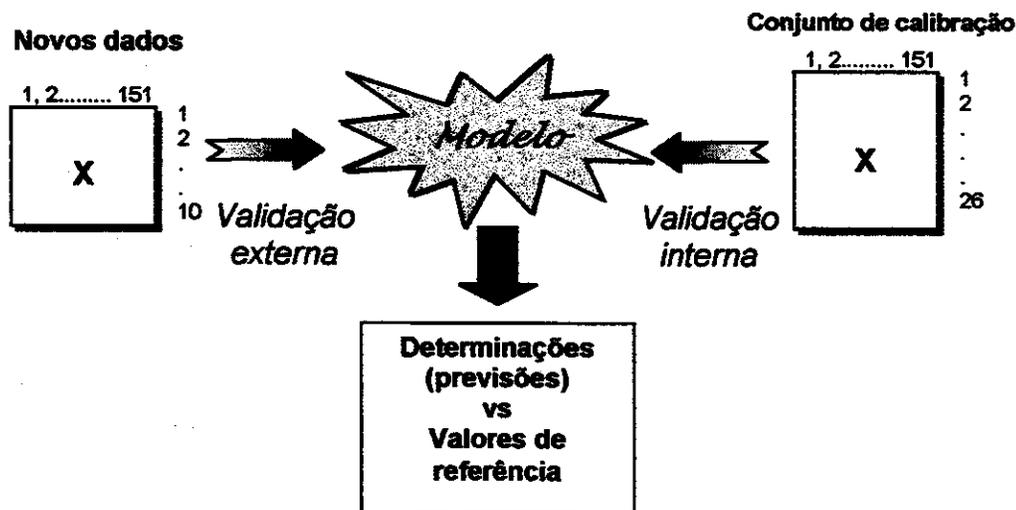


Figura 4.1 – Matrizes de espectros e concentrações que constituem o conjunto de calibração para a determinação das concentrações de alumínio e de ferro no sistema químico estudado.

Depois de construir o modelo, é necessário validá-lo, avaliando sua capacidade de realizar determinações (capacidade preditiva). Para isso, medidas instrumentais (no nosso caso, espectros), cujo valor de referência da propriedade de interesse é conhecido (concentrações de alumínio e de ferro), devem ter esses valores determinados com o modelo construído e comparados entre si. Diferentes estratégias podem ser utilizadas para reunir os dados que farão parte desse novo conjunto de dados que será utilizado na etapa de teste do modelo, mas recomenda-se que o assim chamado *conjunto de validação* seja constituído por soluções cujos espectros não tenham sido usados no cálculo do modelo.

Quando os objetos do conjunto de validação foram preparados junto com os padrões utilizados na calibração, mas foram separados e não fizeram parte do cálculo do modelo, o processo é conhecido como *validação externa*. No nosso exemplo, dez espectros foram excluídos do conjunto de calibração, após serem selecionados através de uma análise de componentes principais (discutida mais tarde) e separados para formar o conjunto de validação. Esses espectros e suas respectivas concentrações de alumínio e de ferro também foram reunidos em matrizes e pré-processados como feito para o conjunto de calibração. Têm-se, portanto, uma matriz de espectros 10 x 151 e uma matriz de concentrações 10 x 2.

Quando os elementos necessários para construir um conjunto de validação para realizar uma validação externa não estão disponíveis, pode-se realizar uma *validação interna*. Neste caso, todos os padrões preparados são empregados no cálculo de modelo e são utilizados também como amostras para o teste do modelo construído. Uma forma de fazer isso é selecionar subconjuntos do conjunto de calibração que, alternadamente, não serão utilizados no cálculo do modelo. No final do processo, denominado *validação cruzada*, calcula-se o erro associado as determinações em cada caso. Frequentemente utiliza-se o processo "leave-one-out", que consiste em deixar, por exemplo, uma amostra diferente fora do cálculo do modelo, de cada vez. Recomenda-se utilizar validação externa sempre que possível pois os modelos obtidos usualmente fornecem melhores resultados. As estratégias empregadas na etapa de teste de modelos de calibração multivariada encontram-se resumidas na Figura 4.2



**Figura 4.2** – Estratégias empregadas na etapa de teste dos modelos de calibração multivariada. Na validação interna, o conjunto de calibração serve também como conjunto de validação. Na validação externa, novos dados são introduzidos para avaliar a capacidade preditiva dos modelos.

O parâmetro empregado para avaliar a capacidade preditiva dos modelos, através da comparação entre os valores previstos (concentrações de alumínio e ferro determinadas com o modelo) com os valores de referência é o erro padrão de previsão (SEP), calculado como:

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

onde  $y_i$  é a concentração conhecida do analito,  $\hat{y}_i$  é a concentração prevista pelo modelo construído e  $N$  é o número de experimentos neste conjunto. O SEP permite estimar, em média, qual a performance do modelo e pode ser usado como uma estimativa do desvio padrão das previsões e é obtido nas unidades utilizadas nas determinações (Thomas, 1994). Quando mais de uma propriedade está sendo calibrada, pode-se calcular o SEP para cada uma delas ou apenas um SEP que indicará a capacidade global de previsão do modelo. Alternativamente, também pode-se empregar o erro de previsão relativo (%RMSE), que é independente da unidade utilizada, dado por (Gemperline et al; 1991):

$$\%RMSE = \frac{100}{\bar{y}_r} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}}$$

na qual defini-se  $\bar{y}_r$  como a média das concentrações conhecidas do analito no conjunto em questão.

Depois de construídos e otimizados, os modelos desenvolvidos podem ser utilizados para realizar determinações em espectros de amostras com concentrações desconhecidas, obtidas seguindo os mesmos processos empregados na preparação dos padrões utilizados nas etapas anteriores. Para isso, é necessário, mais uma vez, reuni-los em uma matriz de espectros e introduzi-los no computador, submetendo-os à determinação das concentrações de interesse usando o modelo construído. A resposta é fornecida na forma de uma matriz,  $n \times 2$ , na qual  $n$  = número de amostras analisadas (espectros) e na primeira coluna e na segunda colunas estão descritas as concentrações desejadas.

Ainda que atualmente encontrem-se disponíveis diversos métodos de calibração multivariada, alguns bastante elaborados, deve-se sempre procurar desenvolver o modelo mais simples e robusto, capaz de descrever o sistema químico estudado. Esta concepção, embora intuitiva, tem sido reforçada na literatura (Despaigne e Massart, 1998).

## IV.2 Alguns métodos importantes

Nos métodos paramétricos, a relação entre os espectros e as concentrações é descrita por uma relação matemática pré-concebida, através de um modelo. A regressão linear múltipla (MLR), a regressão por componentes principais (PCR) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), entre outros (Martens and Naes, 1989; Geladi and Kowalski, 1986). As redes neurais artificiais são um exemplo de métodos não paramétricos (Zupan and Gasteiger, 1993; Despaigne and Massart, 1998) e não serão discutidas nessa tese.

A princípio, todos esses métodos podem ser compreendidos como uma generalização do modelo univariado utilizados nos métodos clássicos, mas possuem uma diferença importante em relação a este: a regressão é feita de forma *inversa*. O desenvolvimento de métodos de regressão baseados na calibração inversa fundamenta-se em 2 conceitos importantes. Um deles é o objetivo da regressão desenvolvida, cujo interesse principal é obter previsões (fazer determinações) da propriedade calibrada em novas amostras. Assume-se também que os erros mais importantes, atuando sobre a calibração, serão os erros envolvidos nas concentrações dos padrões, devido à excepcional melhora verificada na performance dos métodos instrumentais (Brereton, 2000). Estatisticamente, tomando como base o procedimento clássico de calibração, isto equivale a fazer uma regressão de  $x$  em  $y$ , na qual um dado valor do analito ( $x_i$ ) é descrito como uma combinação linear das medidas instrumentais ( $y_i$ ) ponderadas por um coeficientes de regressão ( $b_n$ ), mais um resíduo ( $e_i$ ) devido ao ajuste do modelo, como descrito na equação abaixo:

$$x_i = b_0 + b_1y_{i1} + b_2y_{i2} + \dots + b_ny_{in} + e_i$$

Porém, quando trata-se dos métodos de calibração multivariada, a propriedade de interesse a ser prevista é a variável dependente ( $y$ ) e as medidas instrumentais são as variáveis independentes ( $x$ ).

A principal diferença entre os métodos de calibração classificados como paramétricos está na forma como os coeficientes de regressão são obtidos, o que em última instância pode melhorar muito o desempenho destes em determinadas situações (Thomas, 1994; Martens e Naes, 1989). A regressão linear múltipla (MLR) é o método mais simples de calibração multivariada. Assim, como nos demais métodos multivariados, em oposição à calibração tradicional, na MLR o valor da propriedade de interesse nas amostras ( $y$ ) é estimado através de uma combinação linear das medidas instrumentais (matriz  $X$ ), que minimize os erros na recuperação dos valores de  $y$ . Os coeficientes de regressão (matriz  $B$ ) do modelo são

calculados através da resolução de mínimos quadrados, obtendo-se também uma matriz E com os resíduos do modelo (Massart et al., 1988; Martens e Naes, 1989). Nesse método, a matriz de dados inteira é utilizada na obtenção destes coeficientes, independente da existência de informação irrelevante ou ruído, como esquematizado na Figura 4.3 (Geladi and Kowalski, 1987):

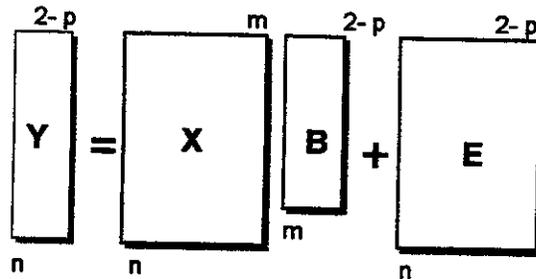


Figura 4.3 – Esquema do cálculo envolvido no método da regressão linear múltipla (MLR).

A MLR é o melhor método para sistemas em que não ocorrem interações entre os componentes das amostras, as respostas são lineares, não há efeito significativo de interferentes, o ruído é baixo e não há correlação significativas entre as medidas instrumentais. Além disso, o número de medidas instrumentais deve não deve ser maior do que o número de amostras usadas na calibração, pois a inversão da matriz envolvida na resolução de mínimos quadrados torna-se impossível (Beebe and Kowalski, 1987; Thomas, 1994).

As diversas restrições encontradas na MLR podem ser contornadas nos métodos baseados na decomposição da matriz dos dados ( $X$ ) em “scores” ( $T$ ) e “loadings” ( $P$ ), princípio da análise de componentes principais (PCA) (Figura 4.4):

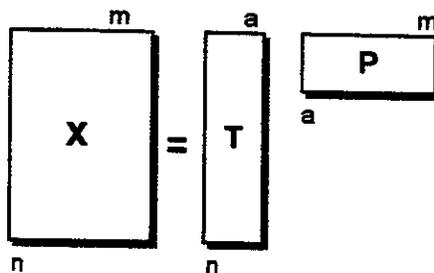


Figura 4.4 – Representação matricial da análise de componentes principais (PCA).

O objetivo da análise de componentes principais é descrever a estrutura que correlaciona os dados, de forma resumida, preservando tanto quanto for possível da informação original. Isso é feito utilizando uma combinação linear das variáveis originais que geraram esses dados, levando em consideração a variância a elas associada. As componentes principais resultantes

são ortogonais entre si e a variância descritas por elas, em relação aos dados originais, é decrescente. Cada componente principal é dada pelo produto de uma coluna da matriz de "scores" e a respectiva linha da matriz de "loadings", obtidas através da decomposição da matriz de dados (Massart et al., 1988).

As características descritas acima tomam possível utilizar a análise de componentes principais para simplificar e reduzir a dimensionalidade dos dados, selecionar variáveis e amostras de interesse e detectar outliers (Wold et al., 1987). Isso pode ser feito examinando-se quais as componentes principais importantes para descrever os dados analisados, quais as variáveis de maior contribuição relativa para o cálculo de cada componente principal e como as amostras estão relacionadas com estas componentes. A redução da dimensionalidade dos dados e sua simplificação são as propriedades mais significativas para os métodos de calibração multivariada baseados nesse princípio. Isso é possível pois, ao contrário da MLR, na qual toda a matriz de dados é utilizada nos cálculos, pode-se selecionar quais colunas da matriz de "scores" que contém informação estatística relevante para a calibração da propriedade de interesse. Essa possibilidade pode ser melhor visualizada a partir da representação do desenvolvimento de um dos algoritmos mais usados para esses cálculos (Figura 4.5): o NIPALS ("Nonlinear Interactive Partial Least Squares").

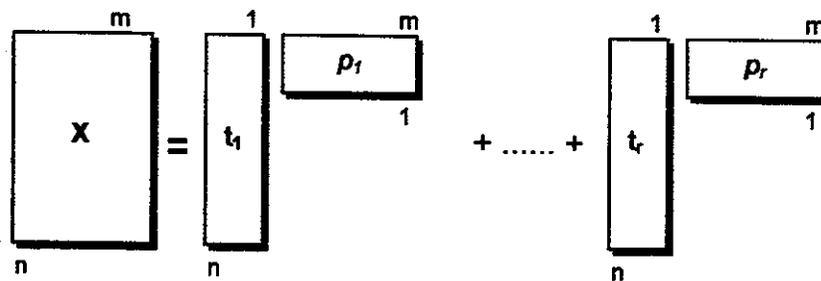
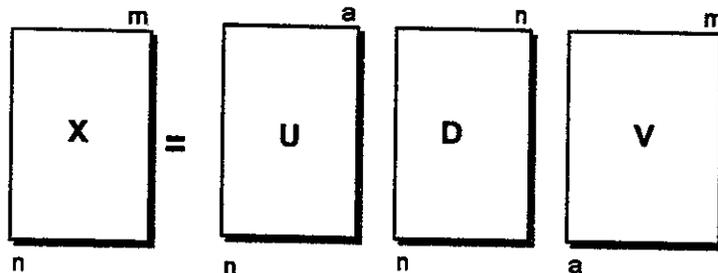


Figura 4.5 – Representação do cálculo de componentes principais usando o algoritmo NIPALS.

Segundo esse algoritmo, as componentes principais não são calculadas todas de uma só vez, mas de forma interativa a partir da matriz de resíduos resultante após cálculo da componente principal anterior, dada pelo produto  $t_r p_r$  (Geladi and Kowalski, 1986). Outro algoritmo bastante utilizado nesses cálculos é a decomposição de valor singular ou SVD ("Singular Value Decomposition"), na qual a matriz de dados é decomposta num produto de 3 outras matrizes (Figura 4.6) (Wold et al., 1987):



**Figura 4.6** – Representação do cálculo de componentes principais usando o algoritmo SVD.

Nesse algoritmo, a matriz  $V$  é idêntica à matriz de "loadings" ( $P$ ) e os "scores" (matriz  $T$ ) são dados pelo produto  $U \times D$  (Wold et al., 1987). A matriz  $D$  é uma matriz diagonal que contém os chamados valores singulares. Se corretamente aplicados, os dois algoritmos levam à mesma resposta quando poucas componentes principais são necessárias para descrever os dados.

Assim, em métodos como a regressão por componentes principais (PCR) e na regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), que envolvem a decomposição dos dados químicos, é possível selecionar o número de fatores relevantes na obtenção dos coeficientes de regressão do modelo. No PCR, a decomposição dos dados nas matrizes de "scores" e "loadings" acontece apenas na matriz das medidas (no nosso caso, espectros no visível), calculadas e listadas em função da variância explicada em cada componente principal. A regressão, para construir o modelo de calibração, é calculada entre as colunas relevantes da matriz de "scores" e as concentrações das amostras, listadas na matriz  $Y$ . No PLS, a decomposição dos dados é feita simultaneamente nas matrizes  $X$  (espectros) e  $Y$  (concentrações), obtendo-se um modelo a partir de toda a informação química disponível.

O modelamento com o PLS é explicado didaticamente como composto por duas etapas, desenvolvidas simultaneamente. Na primeira etapa, ocorre a decomposição dos dois blocos de dados,  $X$  e  $Y$ , em vários fatores, nesse caso conhecidos como variáveis latentes, mais uma matriz de resíduos correspondente aos dados não modelados (Figura 4.7). As variáveis latentes, a exemplo das componentes principais, podem ser representadas como o produto dos vetores de "scores" e "loadings" ou como o produto das matrizes em que estes vetores foram agrupados:

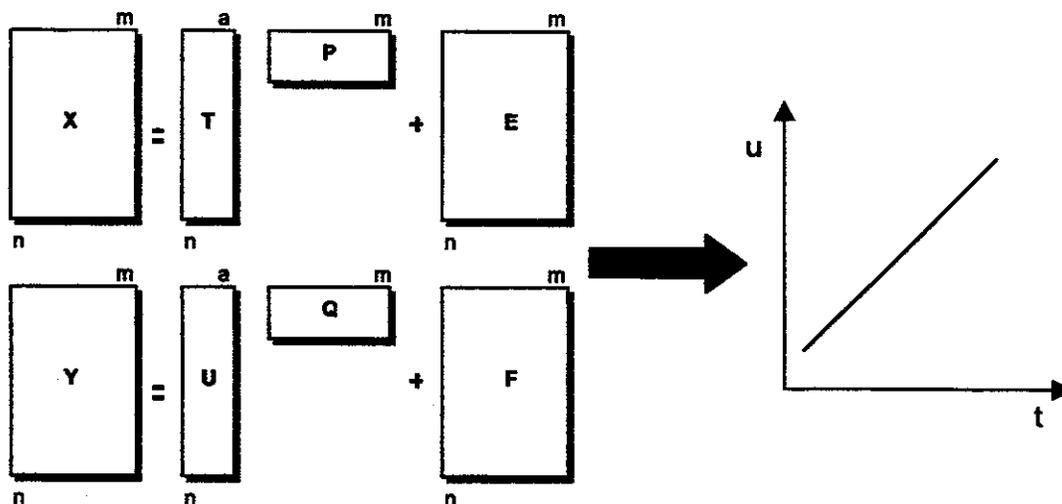


Figura 4.7 – Representação da regressão por PLS.

Onde T e U são matrizes de “scores”, P e Q são matrizes de “loadings”; e X e Y são os blocos de dados (medidas instrumentais e respostas, respectivamente). As matrizes E e F são os resíduos associados ao modelamento. A segunda etapa consiste em estabelecer a relação entre os dois blocos de dados, através da regressão dos “scores” do bloco X nos “scores” do bloco Y, usando um coeficiente de regressão  $b$  para descrever uma função linear entre estes blocos:  $U = bT$ .

Para obter a melhor correlação entre estas matrizes, com os menores resíduos descritos nas matrizes E e F, os “scores” da matriz T são ajustados de forma a descrever simultaneamente a matriz Y (Martens and Naes, 1989; Geladi and Kowalski, 1986). Embora estes seja o algoritmo básico da regressão por mínimos quadrados parciais, correspondente ao PLS-2, algumas alterações podem ser introduzidas para adequar este método a diferentes situações. No PLS-1, apenas uma propriedade de interesse é considerada em cada modelo. Por outro lado, quando há mais de uma propriedade de interesse a ser calibrada utilizando-se um mesmo conjunto de medidas instrumentais, o algoritmo a ser empregado é o PLS-2, no qual a matriz de “scores” U será obtida de forma a descrever as propriedades de interesse simultaneamente. Nestes 2 casos, assume-se que a relação entre os blocos de dados químicos, X e Y é melhor descrita através de uma função linear (Martens e Naes, 1989). Se este não for o caso, deve-se empregar o Poly-PLS, no qual esta relação poderá ser descrita através de um polinômio de segundo grau ou superior (Wold et al., 1989)

No PCR e no PLS, bem como na calibração com redes neurais, a seleção do número mais adequado de parâmetros internos a ser utilizado no modelo de calibração (componentes

principais, variáveis latentes ou neurônios nas camadas intermediárias, respectivamente) é crítico. A seleção do número inadequado de parâmetros leva à obtenção de um modelo não-otimizado, através da falta de ajuste do modelo (“underfitting” - quando parte da informação química disponível não foi considerada) ou sobreajuste (“overfitting” – quando um número excessivo de parâmetros passa a incluir ruído) (Martens and Naes, 1989). Para evitar que isto aconteça, deve-se fazer uso das estratégias de validação, externa ou interna, descritas anteriormente, para selecionar o número adequado de parâmetros no modelo, como um compromisso entre os erros calculados na calibração (%RMSEP dos conjuntos de calibração e validação).

### *IV.3 Calibração multivariada, espectroscopia uv-vis e aplicações de interesse agrônômico.*

Utilizando-se os métodos de calibração multivariada é possível determinar componentes em misturas, eliminar ou minimizar efeitos de interferência específicos ou de matriz e ruído, além de detectar amostras anômalas (outliers). Estas características também podem tornar possível reduzir as etapas necessárias na preparação das amostras, reduzindo o tempo de análise e custos envolvidos (Thomas, 1994; Martens e Naes, 1989). Assim, o uso dos métodos de calibração multivariada apresenta-se como uma alternativa viável, prática e rápida no tratamento de problemas químicos para os quais os métodos tradicionais não oferecem respostas satisfatórias.

Os principais fatores responsáveis pela baixa qualidade de resultados obtidos através dos métodos químicos empregados tradicionalmente são os problemas de interferência e os de não linearidade do sistema químico estudado, sejam estes inerentes ao sistema ou de natureza instrumental. Essa é uma situação encontrada freqüentemente nas determinações espectrofotométricas de íons metálicos, pois a maioria dos reagentes utilizados não é específica e muito poucos são seletivos. Desta forma, a determinação do metal de interesse através do desenvolvimento de cor é muito dependente das condições experimentais utilizadas, sendo necessário realizar a separação ou o mascaramento de interferentes. Se por um lado este procedimento visa melhorar a qualidade do sinal analítico registrado, por outro torna os procedimentos mais lentos e pode aumentar a incidência de erros operacionais, que em última instância podem afetar também a precisão e exatidão das determinações. Os métodos apresentados no Cap. 2 podem servir como exemplo para estas considerações. Estes

argumentos continuam a favorecer a implementação de métodos instrumentais mono ou multielementares, como o AAS e o ICP (AES ou MS), de forma indiscriminada em muitos laboratórios. Apesar da eficiência destas técnicas, o menor custo relativo dos métodos espectrofotométricos continua a ser o principal motivo pelo qual estes continuam sendo muito utilizados quando as rotinas analíticas são bem definidas, como discutido no Cap. 3.

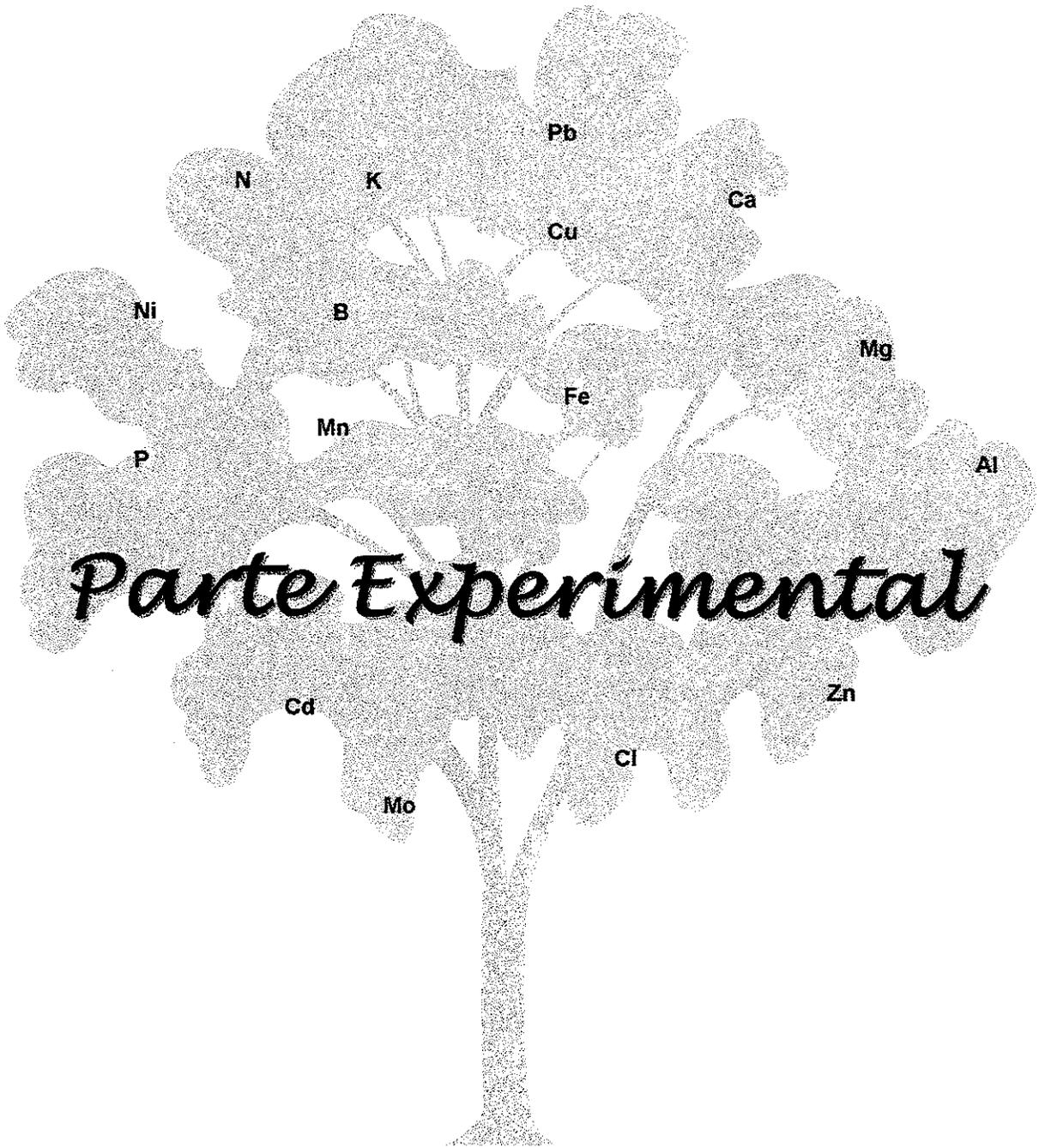
O interesse nos métodos espectrofotométricos de determinação recebeu novo impulso com a divulgação das técnicas de processamento de sinais e calibração multivariada, destacando-se técnicas como o PCR, PLS e as ANN (Lobinski e Marckzenko, 1992). Neste período, o número de publicações utilizando métodos de calibração multivariada em química analítica, especialmente o PLS, tem crescido continuamente. Destacam-se as aplicações na indústria farmacêutica e em análises biológicas (Lavine, 1998; Lavine, 2000). O desenvolvimento atingido nestas áreas específicas pode ser atribuído, ao menos em parte, à possibilidade de realizar medidas de espectroscopia na região do infravermelho em diversas situações. "Softwares" comerciais e diversas publicações abordando aspectos relacionados à calibração nesta região do espectro estão disponíveis devido ao interesse econômico da indústria alimentícia e seu uso no acompanhamento de processos industriais como metodologia alternativa que motivaram investimentos em pesquisa e equipamentos (Brereton, 2000).

Esta tendência de aumento nas publicações tem sido observada também em relação a espectroscopia no uv-visível, embora a obtenção de dados bibliográficos específicos, cruzando este termo e os métodos de calibração, como palavras-chave, seja dificultado devido aos diversos métodos disponíveis e seus acrônimos. Apesar das vantagens apontadas, o desenvolvimento de procedimentos utilizando métodos espectrofotométricos de determinação e calibração multivariada para uso em análises de rotina não tem sido muito explorado. Aparentemente, isso se deve às dificuldades envolvidas no desenvolvimento de um procedimento simples e robusto para a calibração e preparo de amostras em sistemas que envolvem reações químicas e que estejam sujeitos a condições altamente interferentes. Em outras palavras, o investimento do tempo e dos recursos necessários faz com que a utilização dos métodos de calibração multivariada seja restrita em diversas áreas da ciência em relação as demais (Brereton, 2000). Por outro lado, a aplicação destes métodos tem sido particularmente bem sucedida quando o propósito dos pesquisadores é resolver problemas analíticos e não o desenvolvimento de novas metodologias (Wold and Sjorstrom, 1998).

A década de 1990 também parece ter sido decisiva no processo de familiarização dos pesquisadores ligados à ciência do solo com os métodos quimiométricos, incluindo-se entre estes a análise exploratória de dados. Estes métodos tem sido aplicados na avaliação de

parâmetros microbiológicos, pedológicos e relacionados à avaliação da fertilidade. Entre estes destacam-se os estudos ligados a caracterização e determinação de matéria orgânica, baseados na espectroscopia no infravermelho, e a determinação de misturas e seus produtos de transformação nos solos. Os dois últimos casos são exemplos de calibração multivariada. Uma boa parte das publicações existentes continua a ser feita em revistas da área de química, embora trabalhos bastante elaborados tenham sido realizados por profissionais desta área e publicados em periódicos específicos, como pode ser verificado em levantamentos recentes (Sena et al., 2000). Embora no caso específico dos métodos que empregam a espectroscopia no infravermelho próximo seja possível afirmar que está em curso a substituição de muitos métodos tradicionais de análise (univariados) por métodos multivariados (Sena et al., 2000), não é fácil estabelecer um padrão em relação aos outros métodos analíticos utilizados e suas aplicações nesta área da ciência.

Também nas determinações em plantas, os métodos quimiométricos vem sendo difundidos. No entanto, em oposição às aplicações nas determinações em solos cujo interesse principal tem sido estudar parâmetros que indiquem sua qualidade, na determinações em plantas a calibração multivariada tem sido aplicada muito mais extensivamente na quantificação de espécies químicas de interesse e no modelamento de respostas dos vegetais frente a fatores que influenciam seu desenvolvimento. Estes estudos destinam-se principalmente ao monitoramento ambiental e avaliação do estado nutricional das plantas, destacando-se os estudos de sensoriamento remoto através do uso de espectroscopia de fluorescência e NIR.



# V. Parte Experimental

---

## V.1 Soluções

As soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas utilizando-se água desionizada e reagentes de grau analítico e estocadas em frascos de polietileno.

As soluções padrão estoque ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) dos metais estudados e dos interferentes ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ) foram preparadas a partir da diluição de padrões Titrisol® (Merck). As soluções de  $5000 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfato e fosfato usadas nos estudos de interferência foram preparadas a partir de diluição dos ácidos sulfúrico e ortofosfórico concentrados (Merck), respectivamente. Todas as soluções padrão estoque foram mantidas sob refrigeração e alíquotas dessas soluções foram tomadas, sempre que necessário, para preparar soluções de trabalho diluídas, utilizadas no desenvolvimento dos estudos realizados e também para a calibração do ICP.

A solução 0,5% (m/v) de alaranjado de xilenol (3,3'-bis-[N,N-di(carboximetil)-aminometil]-o-cresolsulfoftaleína) foi preparada através da dissolução de  $2,5 \text{ g} (\pm 10 \text{ mg})$  do sal tetrassódico (Merck) em  $500,0 \text{ mL}$  de água. Adicionou-se  $2 \text{ mL}$  de clorofórmio e algumas gotas de uma solução de  $\text{HCl } 2 \text{ mol L}^{-1}$  até obter-se uma solução alaranjada e límpida. A adição de clorofórmio evita o crescimento de microorganismos e a adição de  $\text{HCl}$  facilita o ajuste do pH adequado ao desenvolvimento da reação. A solução de alaranjado de xilenol deve ser mantida sob refrigeração. Nestas condições, não se observou qualquer alteração num período até 6 meses, quando deixamos de fazer o acompanhamento da qualidade da solução.

Uma solução de  $\text{HCl } 0,8 \text{ mol L}^{-1}$ , preparada pela diluição de  $33,5 \text{ mL}$  de ácido concentrado em  $500 \text{ mL}$  de água, foi utilizada para preparar as soluções empregadas na construção de modelos de calibração usando padrões aquosos de alumínio e de ferro, simulando as condições encontradas nos extratos de folhas analisados. Também preparou-se uma solução de  $\text{NaOH } 3,5 \text{ mol L}^{-1}$  para neutralizar as alíquotas de extratos de folhas e facilitar o ajuste de pH nas soluções empregadas para a aquisição dos espectros. Essa solução foi preparada pela dissolução de  $140 \text{ g}$  de pastilhas de  $\text{NaOH}$  em água e diluição para  $1 \text{ L}$ . Para preparar o tampão formiato/ácido fórmico foram dissolvidas  $102 \text{ g}$  de formiato de sódio em cerca de  $600 \text{ mL}$  de água. A seguir, foram adicionados  $132 \text{ mL}$  de ácido fórmico e o volume foi completado para  $1 \text{ L}$  com água. Em todas as soluções empregadas para a aquisição dos espectros, utilizou-se etanol 95% (v/v) ou superior.

## V.2 Instrumental

As determinações espectrofotométricas (leitura de absorbância em um comprimento de onda ou aquisição de espectros) foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro Hitachi U2000, com varredura na região do uv-visível, equipado com um amostrador do tipo "sipper" e cela de sílica com caminho óptico de 10 mm. Para a obtenção dos espectros usados na construção dos modelos de calibração multivariada, o espectrofotômetro foi interfaciado com um computador através de sua porta serial e um cabo bidirecional RS232C, de acordo com as instruções do fabricante. O "software" utilizado para a aquisição de dados, registrados como arquivos ACSII, desenvolvido pelo Prof. Dr. Cesar Mello durante seu doutoramento.

Os espectros foram registrados entre 350 e 650 nm, com uma resolução espectral de 2 nm, usando água como branco. Uma resolução maior reduz o número de amostras analisadas por hora, enquanto uma resolução menor pode resultar em perda de precisão e exatidão nos modelos. Nossos estudos também mostraram que a velocidade de varredura mais adequada para aquisição dos espectros na faixa estudada foi de 400 nm min<sup>-1</sup>. Essa velocidade representa um compromisso entre a reprodutibilidade do sinal coletado e o número de amostras analisadas/h. Todas as determinações espectrofotométricas foram realizadas em ambiente com a temperatura controlada em (23 ± 2)°C. Além disso, após a lavagem toda a vidraria utilizada deve ser submetida à imersão em um banho de ácido nítrico 10% v/v durante pelo menos 2 horas e enxaguada com água desionizada para evitar contaminações.

Nas determinações realizadas em amostras de solos e plantas, empregadas na validação dos nossos estudos, as concentrações de alumínio e de ferro foram medidas, nos mesmos extratos, por espectrometria de emissão em plasma e pelos métodos propostos. As concentrações de alumínio e de ferro determinadas com o ICP foram utilizadas como valores de referência para a construção e avaliação dos modelos de calibração. Quando necessário, os elementos considerados interferentes em potencial também foram determinados. Para tal, empregou-se um espectrômetro ICP-AES Jobin-Yvon, modelo JY-50P. A frequência de operação do ICP utilizado era de 40,86 MHz, com uma potência de 1000 W e fluxo de argônio na tocha de 12 L min<sup>-1</sup>. Todas as análises foram realizadas mantendo-se uma purga de nitrogênio com vazão de 0,6 L min<sup>-1</sup>. As linhas atômicas empregadas na determinação de elementos nas amostras estudadas encontram-se listadas na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1 - Linhas de emissão atômica utilizadas para a determinação dos elementos por ICP-AES.**

| Elemento | Linha de emissão (nm) |
|----------|-----------------------|
| Al       | 308,215               |
| Fe       | 259,940               |
| Ca       | 317,933               |
| Mg       | 279,079               |
| Mn       | 257,610               |
| Cu       | 324,754               |
| Zn       | 213,856               |
| P        | 178,225               |
| S        | 180,672               |

A calibração do ICP-AES foi feita utilizando-se soluções de trabalho contendo os elementos de interesse, preparadas nas mesmas condições dos extratos de solos ou plantas analisados. Os resultados registrados consistiram na média de 3 leituras da amostra, com duração de 5 segundos cada, sob um fluxo de amostra de  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ . A calibração do equipamento foi verificada periodicamente procedendo-se a sua recalibração sempre que observada uma variação superior a 5%.

As medidas de pH foram realizadas utilizando-se um pHmetro Metrohm 691 acoplado a um eletrodo de vidro combinado da mesma marca.

Os cálculos envolvidos na determinação simultânea de alumínio e ferro foram feitos utilizando-se o "software" MatLab v4.2c (The Math Works, Inc.) e o PLS "Toolbox" v1.5.1 para uso com MatLab (Eigenvectors Technologies, Inc).

### *V.3 Amostras e extratos*

As amostras de solos e plantas utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo laboratório de análise de plantas e solos do Centro de Solos e Recursos Agroambientais do Instituto Agronômico de Campinas (CSRA-IAC).

#### **Solos**

Utilizou-se um conjunto de 10 amostras de solo representativas do Estado de São Paulo, contendo entre 30 e 220 mg de  $\text{Al}^{3+} \text{ kg}^{-1}$  solo e concentrações variáveis de ferro. A tabela 5.2 apresenta algumas informações sobre estes solos, além de sua classificação.

**Tabela 5.2-** Características dos solos utilizados na determinação de alumínio.

| Solo | Classificação              | pH em<br>0,01 mol L <sup>-1</sup><br>CaCl <sub>2</sub> | Cátions trocáveis e CTC<br>(mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> solo) |                  |                |                    |
|------|----------------------------|--|--|------------------|----------------|--------------------|
|      |                            |  | Ca <sup>2+</sup>   | Mg <sup>2+</sup> | K <sup>+</sup> | CTC <sup>(a)</sup> |
| 1    | Latossolo vermelho amarelo | 4,5  | 11   | 5                | 0,5            | 55                 |
| 2    | Cambissolo                 | 3,8  | 1  | 1                | 1,0            | 189                |
| 3    | Cambissolo                 | 4,2  | 4  | 3                | 1,4            | 130                |
| 4    | Cambissolo                 | 4,2  | 6  | 5                | 0,8            | 122                |
| 5    | Podzólico vermelho amarelo | 4,5  | 19   | 10               | 1,3            | 58                 |
| 6    | Podzólico vermelho amarelo | 5,9  | 41   | 16               | 8,9            | 84                 |
| 7    | Latossolo vermelho Amarelo | 4,0  | 1  | 1                | 0,5            | 55                 |
| 8    | Podzólico, Variação Lins   | 3,8  | 1  | 1                | 0,8            | 55                 |
| 9    | Glei                       | 3,8  | 4  | 4                | 0,9            | 108                |
| 10   | Latossolo vermelho amarelo | 3,8  | 1  | 1                | 0,6            | 102                |

(a) Capacidade de Troca de Cátions em pH 7

As soluções extratoras utilizadas em nossos estudos foram KCl e NH<sub>4</sub>Cl a 1 mol L<sup>-1</sup>, realizando-se extrações em triplicata para cada solo analisado. O pH da solução extratora de KCl foi ajustado para 5,0, através da adição de algumas gotas de HCl 1 mol L<sup>-1</sup>, para garantir que as extrações ocorressem em meio adequado e sob condições reprodutíveis, eliminando as impurezas, de efeito tamponante, que podem ser encontradas nesse reagente (Cantarella et al., 1981).

A obtenção dos extratos empregados nos estudos de avaliação da fertilidade de solos consistiu em agitar-se 5,00 g de solo previamente moído e seco em estufa (TFSA), sob agitação mecânica a 220 rpm, com 50 cm<sup>3</sup> da solução extratora por 15 minutos. A seguir, filtrou-se o extrato usando papel de filtro quantitativo. Aliquotas destes extratos foram utilizadas nas determinações realizadas.

## Plantas

Nesse trabalho foram utilizadas amostras-controle, amostras recebidas para a análise de nutrientes no laboratório de análise de plantas e solos do CSRA-IAC e diversas amostras de plantas distribuídas pelo programa "International Plant – analytical Exchange" (IPE) da "Agricultural University of Wageningen" (Holanda), entre os anos 1997 e 2000.

As amostras recebidas para análise no CSRA-IAC foram lavadas com água destilada e deionizada, secas a 60°C até peso constante, moídas em moinho tipo Willey e peneiradas em peneira com malha de 1 mm (20 mesh). A fração de amostra que passou por essa peneira foi armazenada e analisada. As amostras do programa IPE são recebidas após serem processadas de forma similar, realizando-se uma nova secagem do material vegetal caso se julgue oportuno. Independente da origem da amostra, 1,000 g do material vegetal foi pesado e mineralizado em cápsulas de porcelana por 2 ½ h a 500 - 550°C. Após o resfriamento, as

cinzas foram umedecidas com água, dissolvidas em 2 mL de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e aquecidas até a evaporação completa do ácido adicionado. A seguir, os resíduos foram redissolvidos com 10 mL de HCl 2 mol L<sup>-1</sup>, aquecidos e filtrados quantitativamente. O material utilizado na mineralização e o resíduo retido no filtro foram lavados com outros 10 mL de HCl 2 mol L<sup>-1</sup> e 10 mL de água. O filtrado foi recolhido em balão volumétrico de 50,0 mL e o volume foi completado com água (Bataglia et. al, 1983).

#### *V.4 Desenvolvimento de cor e aquisição de espectros*

Para realizar as determinações de alumínio e ferro pipetaram-se 5,00 mL dos extratos de folhas ou 2,00 mL dos extratos de solos para balões volumétricos de 50,0 mL. Para realizar as calibrações correspondentes, em lugar dos extratos foram utilizadas alíquotas das soluções-padrão diluídas de alumínio e/ou de ferro, de 50 mg L<sup>-1</sup>, e 5,00 mL da solução de HCl 0,8 mol L<sup>-1</sup> para as amostras de plantas, ou 2,00 mL da solução extratora empregada para as amostras de solos (KCl ou NH<sub>4</sub>Cl 1 mol L<sup>-1</sup>), respectivamente.

A seguir, para o preparo da calibração e para as determinações em extratos de plantas, adicionaram-se a cada alíquota, 1,0 mL da solução 0,5% (m/v) de alaranjado de xilenol, 1,0 mL da solução de NaOH 3,5 mol L<sup>-1</sup> e mais algumas gotas dessa solução de NaOH, até a solução resultante ficar violeta. A adição de base em excesso deve ser evitada. Adicionaram-se, então, 5,0 mL da solução tampão formiato/ácido fórmico e 25,0 mL de etanol 95% (v/v). Os balões volumétricos foram tampados e as soluções homogeneizadas cuidadosamente. Completou-se o volume de cada balão volumétrico com água e homogeneizou-se novamente. Para o preparo da calibração e para as determinações em extratos de solos, após adicionar uma alíquota de 1,0 mL da solução 0,5% (m/v) de alaranjado de xilenol, basta adicionar os 5,0 mL da solução tampão e os 25,0 mL de etanol 95% (v/v). O pH nominal dessas soluções ficou ao redor de 4,0, e nessas condições as colorações variam do alaranjado ao vermelho, em função da concentração dos metais presentes.

Os espectros das soluções resultantes foram registrados entre 2 e 4 h após a mistura dos reagentes, usando-se água como branco. Quando as concentrações calculadas, em mg L<sup>-1</sup>, para alumínio e/ou ferro (valores previstos pelo PLS) atingiam valores 5% acima de 1,0 mg L<sup>-1</sup>, a amostra era analisada novamente, após sofrer diluição. Essa diluição era realizada tomando-se 10,00 mL do extrato original da planta, em balão volumétrico de 50 mL, e completando-se o volume com HCl 0,8 mol L<sup>-1</sup>. Quando eram observadas concentrações inferiores a 0,05 mg L<sup>-1</sup>

de alumínio e/ou ferro, as determinações também eram repetidas, mas usando-se uma alíquota de 10,00 mL do extrato original.

### V.5 Calibração usando soluções aquosas

As soluções empregadas nos conjuntos de calibração e previsão foram preparadas segundo um planejamento fatorial completo, com 6 níveis de concentração para alumínio e ferro (0 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>), num total de 36 experimentos, como esquematizado na Figura 5.1.

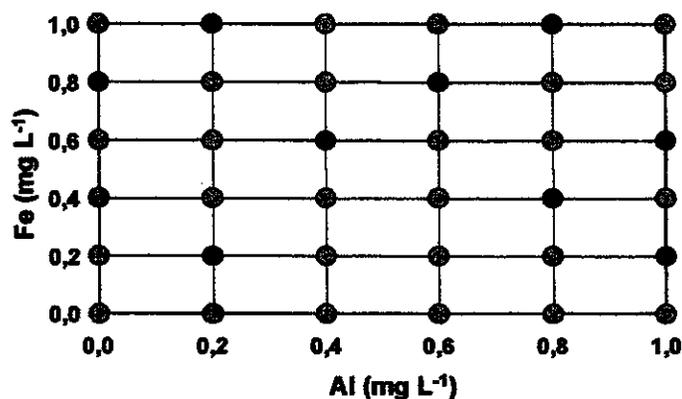


Figura 5.1 – Esquema representativo do planejamento fatorial completo utilizado para preparação das soluções empregadas na calibração.

As soluções correspondentes aos pontos mostrados na Figura 5.1 foram preparadas utilizando-se soluções-padrão de 50 mg L<sup>-1</sup> de alumínio ou de ferro, obtidas através de diluição da solução estoque 1000 mg L<sup>-1</sup>. Desses, 10 experimentos foram selecionados através de uma análise de componentes principais dos espectros correspondentes para constituir um conjunto de validação e não foram incluídos no cálculo dos modelos. Esses experimentos estão assinalados na Figura 5.1 como os pontos pretos, enquanto os pontos cinza representam os experimentos usados no cálculo dos modelos (conjunto de calibração). A composição dos experimentos é mostrada na Tabela 5.3.

**Tabela 5.3- Concentração de alumínio e ferro nas soluções preparadas para calibração do modelo PLS, em mg L<sup>-1</sup>.**

| Calibração |     |     | Validação |     |     |
|------------|-----|-----|-----------|-----|-----|
| Solução    | Al  | Fe  | Solução   | Al  | Fe  |
| 01         | 0,0 | 0,0 | 27        | 0,6 | 0,0 |
| 02         | 0,2 | 0,0 | 28        | 0,2 | 0,2 |
| 03         | 0,4 | 0,0 | 29        | 1,0 | 0,2 |
| 04         | 0,8 | 0,0 | 30        | 0,8 | 0,4 |
| 05         | 1,0 | 0,0 | 31        | 0,4 | 0,6 |
| 06         | 0,0 | 0,2 | 32        | 1,0 | 0,6 |
| 07         | 0,2 | 0,2 | 33        | 0,0 | 0,8 |
| 08         | 0,6 | 0,2 | 34        | 0,6 | 0,8 |
| 09         | 0,8 | 0,2 | 35        | 0,2 | 1,0 |
| 10         | 0,0 | 0,4 | 36        | 0,8 | 1,0 |
| 11         | 0,2 | 0,4 |           |     |     |
| 12         | 0,4 | 0,4 |           |     |     |
| 13         | 0,6 | 0,4 |           |     |     |
| 14         | 1,0 | 0,4 |           |     |     |
| 15         | 0,0 | 0,6 |           |     |     |
| 16         | 0,2 | 0,6 |           |     |     |
| 17         | 0,6 | 0,6 |           |     |     |
| 18         | 0,8 | 0,6 |           |     |     |
| 19         | 0,2 | 0,8 |           |     |     |
| 20         | 0,4 | 0,8 |           |     |     |
| 21         | 0,8 | 0,8 |           |     |     |
| 22         | 1,0 | 0,8 |           |     |     |
| 23         | 0,0 | 1,0 |           |     |     |
| 24         | 0,4 | 1,0 |           |     |     |
| 25         | 0,6 | 1,0 |           |     |     |
| 26         | 1,0 | 1,0 |           |     |     |

As alíquotas das soluções padrão foram tomadas utilizando-se pipetas automáticas Eppendorf, de forma a obter-se a concentração desejada de Al<sup>3+</sup> e/ou Fe<sup>3+</sup> em balões volumétricos de 50,0 mL. O desenvolvimento de cor e aquisição de espectros foi feita como descrito anteriormente.

A seleção do número de variáveis latentes a ser usado nos modelos foi feita através da avaliação do compromisso entre o ajuste da calibração e a capacidade de previsão dos mesmos, comparando-se os valores da raiz quadrada do erro padrão relativo (%RMSE) para a previsão das concentrações de alumínio e ferro nos conjuntos de calibração e previsão, considerando-se os diversos modelos desenvolvidos. Estes valores foram colocados em gráficos, tomando-se o número de variáveis latentes vs. %RMSEP, para melhor visualização dos dados. O valor do %RMSE é dado por:

$$\%RMSE = \frac{100}{y_r} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}}$$

onde  $y_i$  é a concentração conhecida do analito,  $\hat{y}_i$  é a concentração prevista pelo modelo construído,  $\bar{y}_r$  é a média das concentrações conhecidas do analito no conjunto em questão e  $N$  é o número de experimentos neste conjunto. Para o desenvolvimento de cor observaram-se rigorosamente as mesmas condições nos experimentos de calibração e preparação das amostras.

Neste caso, para testar o método desenvolvido, realizaram-se simultaneamente a determinação de alumínio e de ferro por ICP-AES e pelo método proposto, em três replicatas autênticas de 9 amostras de folhas, parte do programa IPE de 1997 (IPE, 1997). Nas leituras por ICP-AES determinaram-se também as concentrações de P, Zn, Mn, Mg, Ca e Cu, como é feito usualmente na rotina do laboratório de análise de plantas e solos do CSRA -IAC.

## *V.6 Calibração usando amostras reais*

Para avaliar o efeito do uso de amostras reais como conjunto de calibração para construção de modelos por PLS na determinação simultânea de alumínio e ferro, realizou-se a mineralização de diversas amostras do programa IPE, referentes aos anos de 1997 a 2000, além de amostras processadas no CSRA-IAC, como descrito anteriormente.

Após a determinação da concentração de alumínio e de ferro por ICP-AES, realizou-se a aquisição dos espectros de todos os extratos analisados. Os resultados obtidos para as amostras da IPE foram submetidos ao critério de rejeição adotado pelo programa (Monfort, 1996). Obedecendo a esse critério, os extratos de 29 amostras de plantas diferentes foram selecionados. Esse número foi considerado pequeno, uma vez que a calibração com soluções aquosas foi feita utilizando 26 experimentos. Assim, após uma análise de componentes principais dos espectros do conjunto de amostras, verificou-se ser possível incluir replicatas autênticas (determinações em novos extratos) de algumas amostras com características peculiares quanto aos teores de alumínio e de ferro determinados, considerando-as como uma amostra diferente para fins de cálculo do modelo, obtendo-se no total 38 experimentos. Além disso, 2 espectros foram utilizados 2 vezes para completar um conjunto com 40 experimentos, facilitando a seleção de sub-conjuntos de calibração a serem estudados.

As informações essenciais sobre as amostras incluídas no conjunto de 40 espectros estão mostradas na Tabela 5.4.

**Tabela 5.4-** Amostras de plantas utilizadas no conjunto de calibração para o desenvolvimento de modelos PLS com amostras reais. As concentrações apresentadas foram calculadas a partir das determinações com ICP-AES.

| Espectro | Amostra            | Identificação*            | — mg kg <sup>-1</sup> folha — |        | -mg L <sup>-1</sup> (calibração) - |      |
|----------|--------------------|---------------------------|-------------------------------|--------|------------------------------------|------|
|          |                    |                           | Al                            | Fe     | Al                                 | Fe   |
| 1        | Melão              | 950 - 98/5                | 229,8                         | 344,4  | 0,46                               | 0,69 |
| 2        | Gerbera            | 980 - 98/5                | 108,6                         | 158,1  | 0,22                               | 0,32 |
| 3        | Acacia (folha)     | 999 - 98/2                | 55,5                          | 142,6  | 0,11                               | 0,29 |
| 4        | Dendezeira (folha) | 652 - 98/4                | 50,7                          | 87,9   | 0,10                               | 0,18 |
| 5        | Alfafa             | 124 - 98/4                | 264,2                         | 247,2  | 0,53                               | 0,50 |
| 6        | Gramma (GR94)      | 100 - 98/4                | 433,9                         | 487,5  | 0,87                               | 0,98 |
| 7        | Cravo (talo)       | 883 - 98/6                | 2948,4                        | 1369,5 | 1,15                               | 0,54 |
| 8        | Milho (planta)     | 126 - 99/3                | 396,8                         | 523,8  | 0,80                               | 1,05 |
| 9        | Gerbera            | 980 - 99/4                | 165,2                         | 219,1  | 0,33                               | 0,44 |
| 10       | Dendezeira(folhas) | 652 - 99/4                | 59,9                          | 108,9  | 0,12                               | 0,22 |
| 11       | Melão              | 950 - 99/4                | 229,9                         | 403,7  | 0,46                               | 0,81 |
| 12       | Brocoli            | 132 - 99/3                | 201,6                         | 245,0  | 0,40                               | 0,49 |
| 13       | Gramma (mistura)   | 952 - 99/2                | 263,2                         | 432,6  | 0,53                               | 0,87 |
| 14       | Milho              | 133 - 99/5 <sup>(a)</sup> | 62,5                          | 177,7  | 0,13                               | 0,36 |
| 15       | Beringela (planta) | 949 - 97/4                | 158,6                         | 188,1  | 0,32                               | 0,38 |
| 16       | Cravo (talo)       | 883 - 97/4                | 2591,7                        | 1333,7 | 1,02                               | 0,52 |
| 17       | Salsa              | 108 - 97/3                | 174,7                         | 249,8  | 0,35                               | 0,50 |
| 18       | Cerefólio          | 109 - 97/3                | 435,4                         | 443,3  | 0,87                               | 0,89 |
| 19       | Rosa (panta)       | 118 - 97/5                | 27,7                          | 51,4   | 0,06                               | 0,10 |
| 20       | Gramma             | 686 - 98/6                | 1006,3                        | 1232,7 | 0,77                               | 0,94 |
| 21       | Rosa (planta)      | 113 - 97/3                | 62,3                          | 136,7  | 0,13                               | 0,27 |
| 22       | Fibra de coco      | 129 - 99/1 <sup>(b)</sup> | 1381,5                        | 2348,4 | 0,54                               | 0,92 |
| 23       | Milho              | 885 - 99/4                | 293,8                         | 600,1  | 0,23                               | 0,46 |
| 24       | Cevada (grão)      | 547 - 99/1                | 7,6                           | 57,1   | 0,02                               | 0,12 |
| 25       | Rosa (planta)      | 114 - 97/2                | 56,1                          | 120,3  | 0,11                               | 0,24 |
| 26       | Rosa (planta)      | 118 - 97/5                | 27,2                          | 55,1   | 0,06                               | 0,11 |
| 27       | Couve              | 849 - 97/2                | 90,3                          | 119,3  | 0,18                               | 0,24 |
| 28       | Favas              | 904 - 97/2                | 240,0                         | 246,0  | 0,48                               | 0,49 |
| 29       | Beringela (planta) | 949 - 97/2                | 193,8                         | 194,7  | 0,39                               | 0,39 |
| 30       | Mangueira (folhas) | 995 - 97/2                | 28,0                          | 62,2   | 0,06                               | 0,13 |
| 31       | Gerbera            | 980 - 97/1                | 135,8                         | 183,2  | 0,27                               | 0,37 |
| 32       | Gramma (GR94)      | 100 - 98/4 <sup>(c)</sup> | 392,1                         | 406,4  | 0,79                               | 0,82 |
| 33       | Milho (planta)     | 677 - 98/4                | 47,3                          | 105,4  | 0,10                               | 0,21 |
| 34       | Gramma             | 686 - 99/6                | 1053,6                        | 1203,0 | 0,81                               | 0,92 |
| 35       | Gladiolo (bulbo)   | 874 - 98/2                | 78,5                          | 124,4  | 0,16                               | 0,25 |
| 36       | Beringela (planta) | 949 - 98/6                | 222,5                         | 225,8  | 0,45                               | 0,45 |
| 37       | Morango (planta)   | 125 - 98/1                | 192,5                         | 303,1  | 0,39                               | 0,91 |
| 38       | Brocoli            | 132 - 99/3                | 216,1                         | 234,6  | 0,43                               | 0,47 |
| 39       | Cravo (talo)       | 883 - 99/5                | 2949,0                        | 1342,3 | 1,16                               | 0,53 |
| 40       | Alfafa             | 933 - 99/4                | 329,3                         | 234,9  | 0,66                               | 0,47 |

\*n° Wageningen - ano/período

(a) 800 mg

(b) 700mg

(c) 630 mg

**Observação:** Os extratos das amostras assinaladas com letras foram obtidos a partir de massas menores do que 1,0 g para permitir a inclusão de concentrações específicas no conjunto de calibração.

Os espectros das amostras da IPE que não foram selecionadas para o conjunto de calibração e de amostras processadas pelo CSRA-IAC, num total de 60 espectros, foram utilizados para a validação do modelo. As informações essenciais sobre essas amostras (conjunto de validação) estão mostradas na Tabela 5.5.

**Tabela 5.5-** Amostras de plantas utilizadas no conjunto de validação para o desenvolvimento de modelos PLS com amostras reais. As concentrações apresentadas foram calculadas a partir das determinações com ICP-AES.

| Espectro | Amostra            | Identificação* | — mg kg <sup>-1</sup> folha — |        | -mg L <sup>-1</sup> (validação) - |      |
|----------|--------------------|----------------|-------------------------------|--------|-----------------------------------|------|
|          |                    |                | Al                            | Fe     | Al                                | Fe   |
| 1        | --                 | IAC            | 1550,1                        | 1165,2 | 1,18                              | 0,89 |
| 2        | Capim              | IAC            | 2761,1                        | 2370,8 | 1,08                              | 0,93 |
| 3        | Trigo (folha)      | IAC            | 443,8                         | 275,1  | 0,89                              | 0,55 |
| 4        | Trigo (folha)      | IAC            | 402,4                         | 232,9  | 0,81                              | 0,47 |
| 5        | Trigo (folha)      | IAC            | 473,8                         | 271,8  | 0,95                              | 0,55 |
| 6        | Trigo (folha)      | IAC            | 340,8                         | 495,6  | 0,68                              | 0,99 |
| 7        | Trigo (folha)      | IAC            | 341,5                         | 221,3  | 0,69                              | 0,44 |
| 8        | Trigo (folha)      | IAC            | 899,2                         | 862,3  | 0,69                              | 0,58 |
| 9        | Beringela          | 951 – 98/3     | 415,6                         | 710,7  | 0,32                              | 0,55 |
| 10       | Cravo (talo)       | 883 – 99/5     | 781,4                         | 391,9  | 0,60                              | 0,30 |
| 11       | Brocoli            | 132 – 99/3     | 201,6                         | 245,0  | 0,40                              | 0,49 |
| 12       | Gramma             | 686 – 97/6     | 888,1                         | 1158,0 | 0,68                              | 0,88 |
| 13       | Milho (planta)     | 677 – 98/4     | 84,6                          | 209,4  | 0,17                              | 0,42 |
| 14       | Couve              | 849 – 97/2     | 104,0                         | 182,8  | 0,21                              | 0,37 |
| 15       | Gladiolo (bulbo)   | 874 – 98/2     | 70,9                          | 150,2  | 0,14                              | 0,30 |
| 16       | Beringela (planta) | 949 – 98/6     | 176,4                         | 218,7  | 0,35                              | 0,44 |
| 17       | Salsa              | 108 – 97/3     | 144,9                         | 197,9  | 0,29                              | 0,40 |
| 18       | Cerefólio          | 109 – 97/3     | 398,7                         | 404,2  | 0,80                              | 0,81 |
| 19       | Cravo (talo)       | 883 – 97/4     | 2888,7                        | 1209,5 | 1,13                              | 0,47 |
| 20       | Pinho (agulhas)    | 127 – 98/6     | 379,3                         | 157,9  | 0,52                              | 0,12 |
| 21       | Beringela          | 951 – 98/3     | 538,6                         | 695,1  | 0,41                              | 0,53 |
| 22       | Pó de madeira      | 992 – 98/5     | 29,1                          | 70,1   | 0,06                              | 0,14 |
| 23       | Fibra de coco      | 129 – 99/1     | 773,0                         | 1493,3 | 0,59                              | 0,51 |
| 24       | Acacia (folha)     | 999 – 98/2     | 42,0                          | 143,4  | 0,08                              | 0,29 |
| 25       | Milho              | 885 – 99/4     | 249,3                         | 520,1  | 0,50                              | 1,04 |
| 26       | Melão              | 950 – 99/4     | 264,4                         | 363,7  | 0,53                              | 0,73 |
| 27       | Gerbera            | 980 – 99/4     | 153,6                         | 191,9  | 0,31                              | 0,39 |
| 28       | Feijão             | 137 – 00/1     | 497,0                         | 601,8  | 0,38                              | 0,46 |
| 29       | Gramma             | 146 – 00/1     | 443,0                         | 749,3  | 0,34                              | 0,57 |
| 30       | Gramma (GR94)      | 100 – 00/1     | 498,4                         | 537,2  | 0,38                              | 0,41 |
| 31       | Valeriana (raiz)   | 145 – 00/2     | 1185,8                        | 1306,0 | 0,90                              | 0,99 |
| 32       | Feijão             | 137 – 00/1     | 541,5                         | 606,7  | 0,41                              | 0,46 |
| 33       | Cravo              | 939 – 00/1     | 214,8                         | 210,5  | 0,46                              | 0,42 |
| 34       | Gramma (GR94)      | 100 – 00/1     | 491,9                         | 541,7  | 0,37                              | 0,39 |
| 35       | Cravo              | 939 – 00/1     | 311,6                         | 274,2  | 0,63                              | 0,55 |
| 36       | Gramma             | 146 – 00/1     | 503,4                         | 782,1  | 0,38                              | 0,59 |
| 37       | Gramma (GR94)      | 100 – 00/1     | 501,8                         | 531,8  | 0,38                              | 0,41 |
| 38       | Gramma (GR94)      | 100 – 00/2     | 486,1                         | 508,0  | 0,98                              | 1,02 |
| 39       | Feijão             | 137 – 00/1     | 470,9                         | 528,3  | 0,36                              | 0,40 |
| 40       | Gerbera            | 980 – 00/2     | 153,8                         | 213,0  | 0,31                              | 0,43 |
| 41       | Cravo              | 939 – 00/1     | 248,9                         | 232,0  | 0,50                              | 0,47 |
| 42       | Gerbera            | 980 – 00/2     | 139,5                         | 198,0  | 0,28                              | 0,40 |

|    |                  |            |        |        |      |      |
|----|------------------|------------|--------|--------|------|------|
| 43 | Gramma           | 146 – 00/1 | 484,1  | 778,3  | 0,37 | 0,59 |
| 44 | Acacia (folha)   | 999 – 00/2 | 42,7   | 147,7  | 0,09 | 0,30 |
| 45 | Gerbera          | 980 – 00/2 | 131,2  | 189,6  | 0,26 | 0,38 |
| 46 | Gerbera          | 980 – 00/2 | 138,0  | 198,0  | 0,28 | 0,40 |
| 47 | Acacia (folha)   | 999 – 00/2 | 48,4   | 158,6  | 0,10 | 0,32 |
| 48 | Acacia (folha)   | 999 – 00/2 | 45,9   | 154,3  | 0,09 | 0,31 |
| 49 | Acacia (folha)   | 999 – 00/2 | 43,2   | 155,8  | 0,09 | 0,31 |
| 50 | Valeriana (raiz) | 145 – 00/2 | 1110,8 | 1344,0 | 0,43 | 0,53 |
| 51 | Valeriana (raiz) | 145 – 00/2 | 1094,6 | 1300,6 | 0,43 | 0,51 |
| 52 | Valeriana (raiz) | 145 – 00/2 | 1035,2 | 1227,7 | 0,40 | 0,48 |
| 53 | Gramma (GR94)    | 100 – 00/2 | 440,2  | 515,5  | 0,88 | 1,03 |
| 54 | Gramma (GR94)    | 100 – 00/2 | 433,0  | 490,7  | 0,87 | 0,98 |
| 55 | Gramma (GR94)    | 100 – 00/2 | 426,6  | 514,4  | 0,86 | 1,03 |
| 56 | Algodao          | IAC        | 472,6  | 745,3  | 0,36 | 0,57 |
| 57 | Algodao          | IAC        | 290,7  | 477,4  | 0,58 | 0,96 |
| 58 | Limão            | IAC        | 1045,1 | 1488,8 | 0,21 | 0,30 |
| 59 | –                | IAC        | 1242,3 | 708,0  | 0,30 | 0,14 |
| 60 | Café             | IAC        | 435,6  | 462,8  | 0,87 | 0,93 |

\*nº Wageningen - ano/período

### Seleção de amostras para os conjuntos de calibração estudados

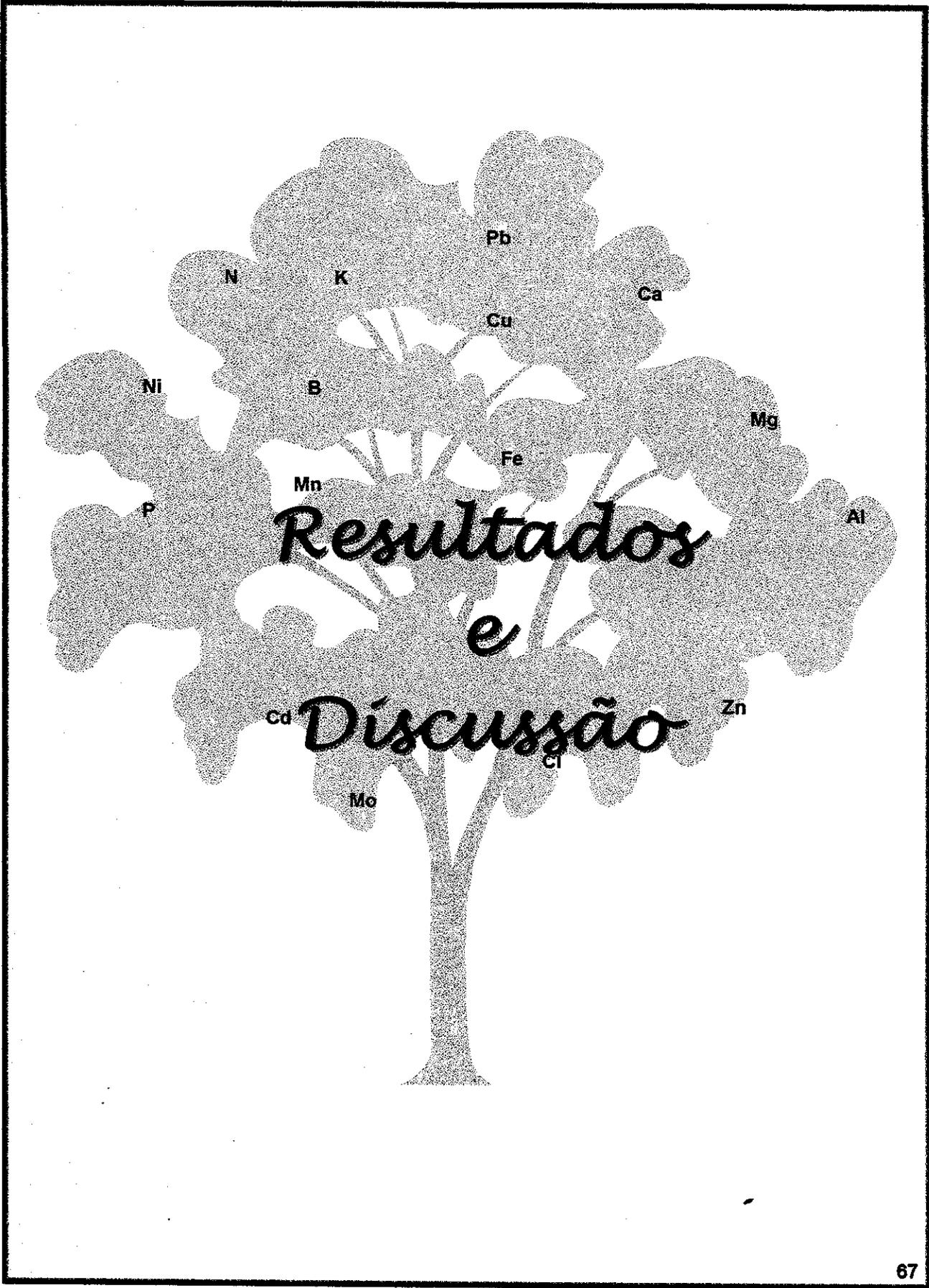
O algoritmo desenvolvido por Kennard e Stone foi utilizado para selecionar subconjuntos com 30, 20 e 10 espectros das amostras listadas na Tabela 5.4 para constituir conjuntos de calibração (Kennard e Stone, 1969). Esse algoritmo é um dos vários disponíveis para selecionar as amostras mais representativas de uma determinada população, que devem ser incluídas no conjunto de calibração. Seu uso permite obter modelos mais robustos na etapa de previsão, reduzindo a possibilidade de extrapolação nessa etapa, pois as amostras contendo mais informação de interesse (maior variância) são utilizadas no desenvolvimento do modelo.

No algoritmo de Kennard e Stone as amostras são selecionadas interativamente, maximizando a distância euclidiana entre o último ponto selecionado e o próximo ponto a ser escolhido. Porém, a forma como o algoritmo é desenvolvido geralmente faz com que os pontos que encontram-se nas bordas dos planejamentos experimentais sejam preferencialmente selecionados, o que nem sempre corresponde estritamente à informação contida nos dados. Além disso, quando um número pequeno de amostras deve ser selecionado, não há garantias de que o espaço experimental será mapeado da maneira o mais uniforme possível (Despagne e Massart, 1998).

Para evitar esses inconvenientes, especialmente quando poucos pontos devem ser selecionados, a informação estatisticamente redundante deve ser eliminada (Kennard e Stone, 1969). Isto pode ser feito utilizando-se os “scores” de uma análise de componentes principais das amostras para realizar os cálculos da distância (no nosso caso, dos espectros do

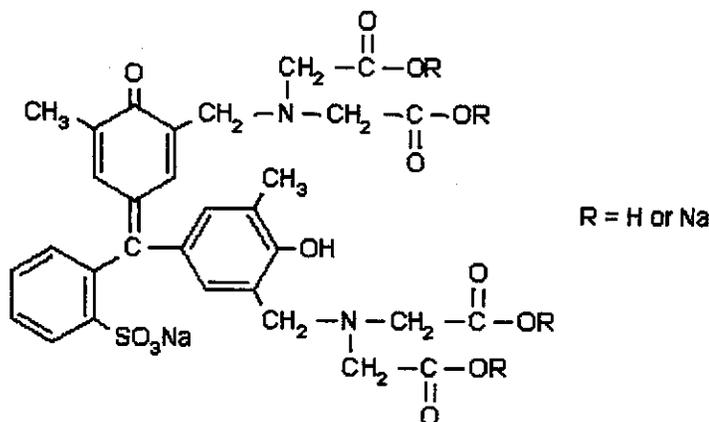
conjunto de calibração), pois elas são ortogonais entre si. Tanto o cálculo da distância euclidiana entre os espectros quanto e entre seus "scores" foram utilizados nesse trabalho para selecionar as amostras dos conjuntos de calibração estudados.

Após selecionar as amostras adequadas, os espectros foram centrados na média e construíram-se modelos, usando de 2 a 8 variáveis latentes, para todos os conjuntos de calibração avaliados. A exemplo do procedimento adotado na calibração com soluções-padrão aquosas, a seleção do número de variáveis latentes para definir qual o melhor modelo em cada caso estudado foi feita através da comparação dos valores de %RMSE. A capacidade preditiva dos modelos selecionados foi comparada através de curvas de correlação entre os valores previstos pelo PLS e aqueles obtidos por ICP. Além disso, quatro amostras da IPE, com concentrações distribuídas ao longo da faixa de aplicabilidade do método proposto, foram analisadas em quadruplicata e as concentrações determinadas com os modelos de calibração puderam ser comparadas com os valores de referência do programa.



## VI. Resultados e discussão

O Alaranjado de Xilenol (AX), cuja estrutura é mostrada na Figura 6.1, é um reagente cromogênico não específico que pode reagir com vários metais, em diversos estados de oxidação, produzindo complexos coloridos.



**Figura 6.1** - Estrutura química do Alaranjado de xilenol (3,3'-bis-[N,N-di(carboximetil)-aminometil]-o-cresolsulfoneftaleína). A forma hidrossolúvel é o sal tetrassódico (R = Na)

Sua baixa seletividade ocasiona sérios problemas de interferência na determinação espectrofotométrica de íon metálicos. Apesar disso, o AX tem sido aplicado extensivamente nestas determinações, que geralmente são feitas com o auxílio de agentes mascarantes e procedimentos de extração para contornar os efeitos de interferência observados (Tikhonov, 1986; Tikhonov, 1965; Murakami et al., 1980; Murakami, e Yoshino, 1981; Yoshino et al., 1979; Saraswat et al., 1979).

Além disso, como acontece com o alumínio e o ferro, podem formar-se complexos com estequiometrias diferentes, através de etapas que envolvem reações em equilíbrio (Murakami e Yoshino, 1981; Yoshino et al., 1979). A formação destes complexos depende do pH do meio reacional, que influencia fortemente a reatividade do AX e pode ser utilizado para favorecer a formação preferencial de um determinado complexo com um dado metal. Outro fator importante que atua sobre as reações envolvidas neste equilíbrio é a relação meta/ligante (Murakami e Yoshino, 1981; Yoshino et al., 1979). Aparentemente os dois grupos quelantes (grupos sulfoftaleínas) do AX também podem reagir de forma independente (Murakami et al., 1980).

Essas características, embora muito estudadas, ainda são um ponto de discussão e, pelo menos em princípio, podem ser apontadas como responsáveis pelo comportamento não linear observado para o sistema Al-AX, mesmo em medidas realizadas num único comprimento de onda (Otomo, 1963; Gholivand et al., 1998; Tikhonov, 1965). Assim, a exemplo do que acontece nas determinações de alumínio utilizando o procedimento clássico adotado nos métodos espectrofotométricos, as determinações de outros metais também sofrem diversas restrições operacionais.

A escolha do alaranjado de xilenol como reagente cromogênico foi estratégica, principalmente para a determinação do alumínio, pois sua baixa especificidade e a influência do pH em sua reatividade, associadas ao efeito interferente do ferro, mostraram-se particularmente interessantes para a aplicação dos modelos de calibração multivariada na resolução dos problemas de seletividade freqüentemente encontrados nas determinações espectrofotométricas na região do visível. Além disso, a menor sensibilidade do AX na determinação do alumínio mostrou-se adequada para uso nas matrizes agronômicas testadas.

Como as plantas contêm tanto alumínio e ferro, em quantidades variáveis, e considerando-se o interesse na determinação de ambos os elementos (Kabata-Pendias e Pendias, 1984; Wright, 1989; Foy, 1988), enfocou-se prioritariamente a determinação de alumínio e de ferro em extratos de folhas. O método proposto para a determinação espectrofotométrica de alumínio trocável em solos é uma alternativa derivada desses estudos. Foi necessário avaliar as condições experimentais mais adequadas para estas determinações, mantendo-se em mente a obtenção de um procedimento robusto, que pudesse representar uma contribuição para a determinação destes metais também em outras matrizes agronômicas ou ambientais.

#### *IV.1 Estudos das condições experimentais*

Embora Fe(II) e Fe(III) formem complexos com AX (Cheng, 1959; Sarawast et al., 1979), considerou-se neste trabalho que apenas Fe(III) seria encontrado nos extratos de solos analisados. No caso dos solos, a existência de íons  $Fe^{2+}$  é limitada pela própria geoquímica deste elemento, como discutido no Cap. 2. Nas plantas, a forma absorvida é o  $Fe^{2+}$ , mas internamente este elemento pode ser encontrado em ambos os estados de oxidação. Porém, devido às condições utilizadas na abertura das amostras para a eliminação da matéria orgânica, é certo que todo o ferro presente nestes extratos esteja na forma de íons  $Fe^{3+}$ .

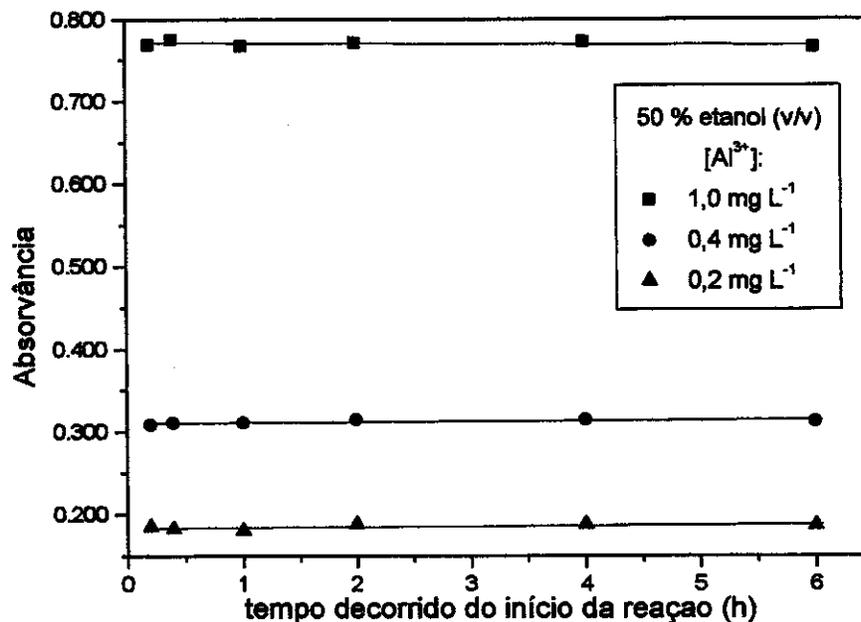
## Cinética da reação

Um dos maiores inconvenientes associado à determinação do alumínio com o AX é a cinética lenta de formação do complexo. Tradicionalmente, a solução em que será realizada a determinação do alumínio é aquecida para acelerar a reação. Uma alternativa aparentemente pouco explorada para o sistema em batelada é o uso do etanol como acelerador da reação, como proposto em sistemas semi-automatizados (Dodson e Jennings, 1972). Por sua vez, a reação do AX com ferro é rápida e supostamente não deveria ser afetada pelo uso do etanol, pois estudos realizados em meio metanólico nada apontaram nessa direção (Craig et al., 1999a), embora estudos adicionais sobre o mecanismo envolvido nessas condições não tenham sido encontrados.

Estudando-se o uso de etanol como agente acelerador desta reação, procurou-se obter a maior resposta (absorvância) no menor tempo possível para uma concentração fixa  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de alumínio. Para avaliar possíveis efeitos de interação entre a concentração de etanol (% v/v) na solução utilizada para obtenção de espectros e a temperatura de desenvolvimento da reação, preparou-se um planejamento fatorial  $3^2$  (2 variáveis, 3 níveis). Neste planejamento estudaram-se as seguintes concentrações de etanol: zero, 20 e 50 % (v/v) e as temperaturas ambiente ( $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ),  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os ensaios, realizados no pH ótimo para a reação de AX com o alumínio (pH 3,4), foram acompanhados através de leituras da absorvância em 555 nm, mantendo-se o reagente cromogênico em excesso [ $2,5\text{AX}:(1 \text{ mg L}^{-1} \text{ de Al} + 1 \text{ mg L}^{-1} \text{ de Fe})$ ].

Nos ensaios em que houve aquecimento, mesmo após o resfriamento da solução à temperatura ambiente, verificou-se que a absorvância diminuiu significativamente em função do tempo. Dependendo da concentração de etanol adicionada ao ensaio, a absorvância lida estabilizava-se ou voltava a aumentar. Este efeito, causado pelo aquecimento da solução, é relatado na literatura, mas tem importância reduzida quando utiliza-se EDTA como mascarante para o ferro (Tikhonov, 1965; Pritchard, 1967). No entanto, essas variações são indesejáveis quando pretende-se realizar a aquisição de espectros e as condições em que esse efeito foi observado foram descartadas para fins práticos.

Os melhores resultados, em termos de absorvância, foram obtidos utilizando-se uma solução final a 50% (v/v) de etanol, sem aquecimento. Pequenas variações na concentração final de etanol parecem não alterar significativamente a absorvância lida. Além disso, verificou-se que o desenvolvimento da reação é independente da relação etanol/metalo, bem como da relação metal/AX, pois o mesmo comportamento, em função do tempo, foi observado quando variou-se a concentração de alumínio em solução, como mostrado na Figura 6.2.



**Figura 6.2** - Uso do etanol para acelerar a formação do complexo com alumínio.

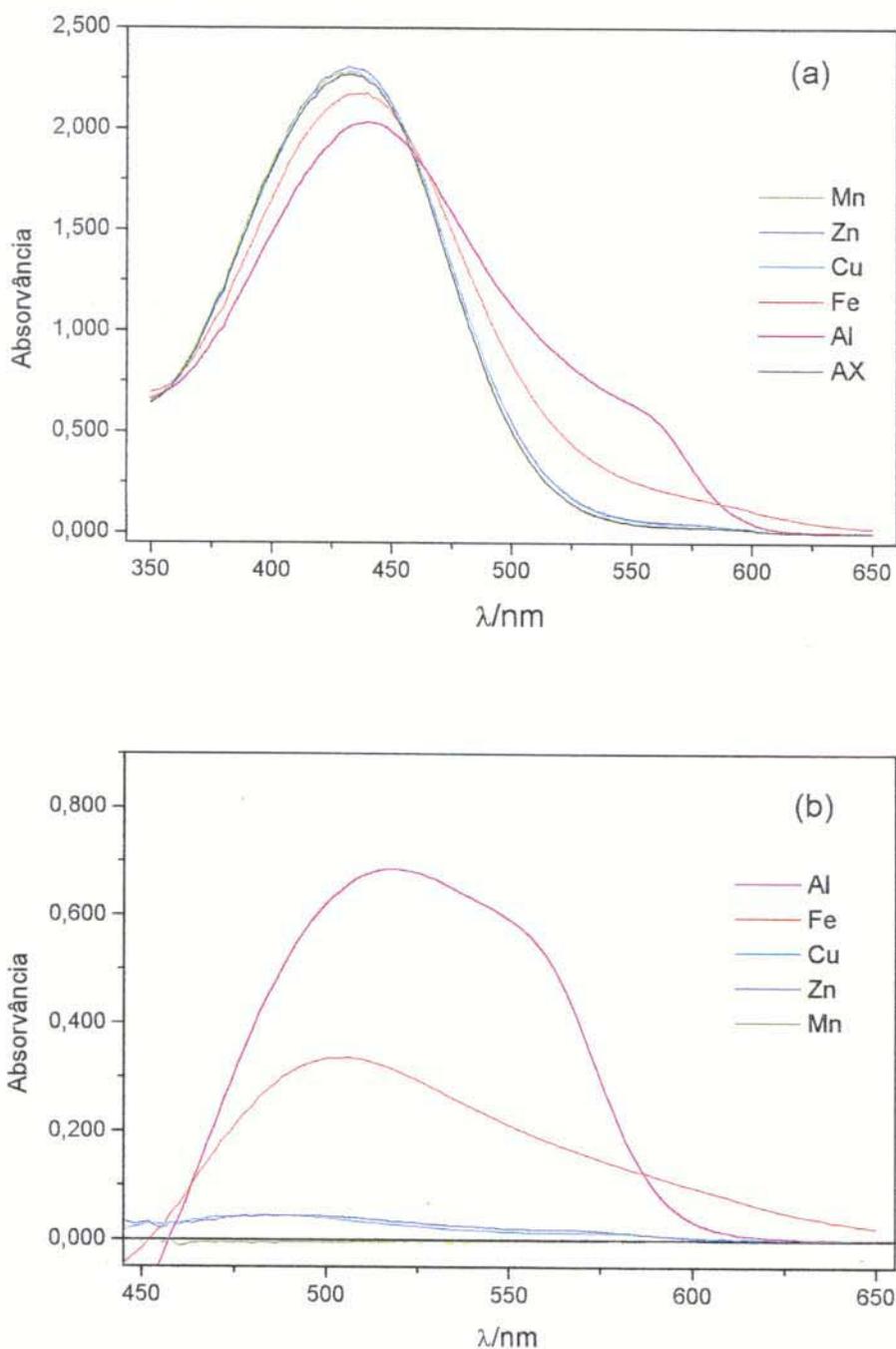
Absorvância medida em 555 nm, pH 3,4 e 2,5AX:(1 mg L<sup>-1</sup> de Al + 1 mg L<sup>-1</sup> de Fe). Os resultados apresentados correspondem à média de dois experimentos.

Nessas condições, a reação está praticamente completa após 1 hora. Porém, a aquisição dos espectros deve ser feita apenas 2 horas após o início da reação pois até esse período a variação na absorvância para concentração baixas de alumínio (menor ou igual a 0,2 mg L<sup>-1</sup>) é significativa. Decorrido esse período a variação da absorvância é inferior a 4,5% por hora. Depois de formado o complexo é estável por vários dias e obtém-se uma variação de no máximo 3% nas 24 horas subsequentes. No entanto, para padronizar o procedimento e minimizar possíveis variações na cinética da reação, causadas pela variação da matriz (concentração variável de diversas espécies, potencialmente interferentes ou não, nas amostras de plantas), é recomendável que todos os dados (calibração e determinações) sejam coletados de forma o mais reprodutível possível. Recomenda-se, portanto, que os espectros sejam registrados entre 2 e 4 h após o início da reação.

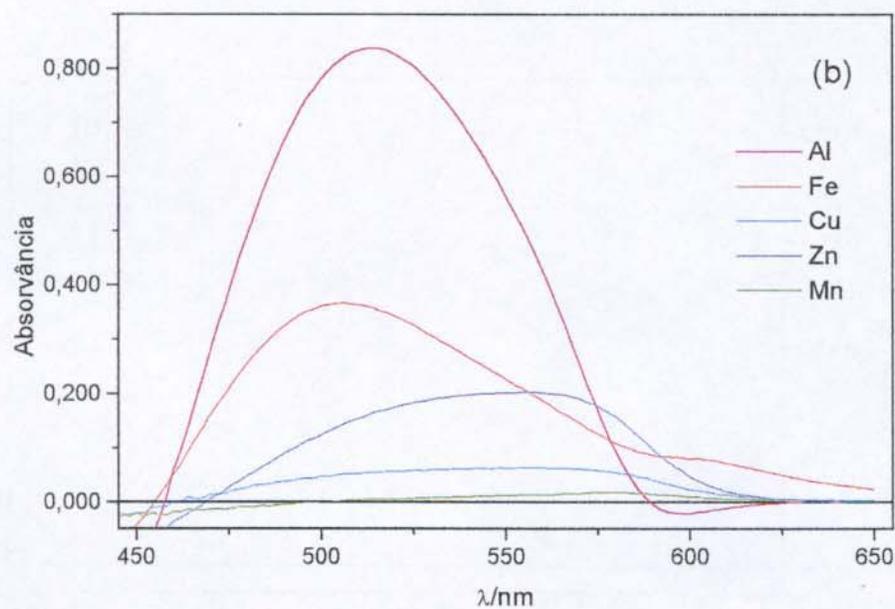
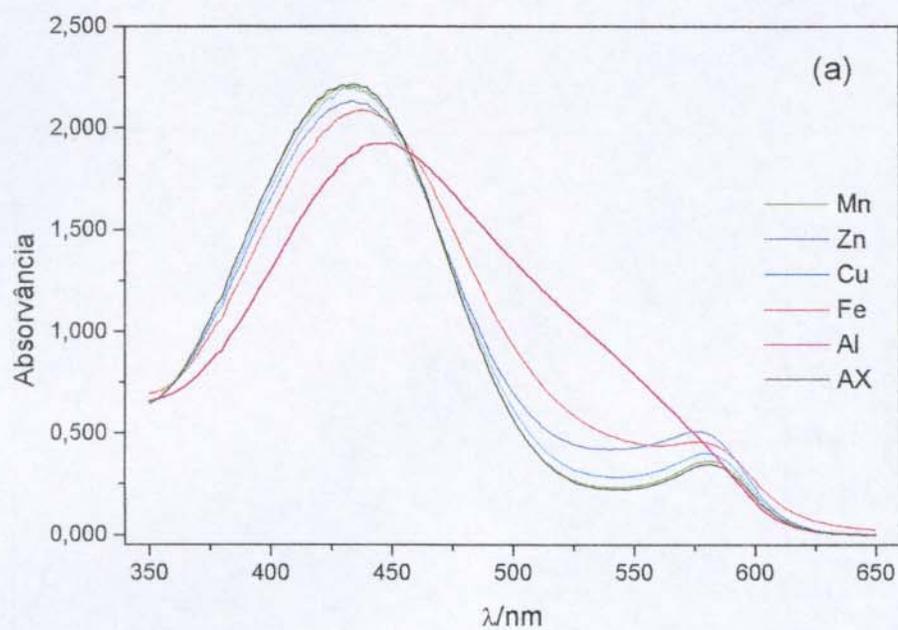
## pH

Experimentos de varredura realizados para definir o pH mais indicado para a realização das determinações mostraram que a formação de complexos de AX com outros cátions é facilitada em pHs próximos de 5. Os espectros dos complexos de AX com Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>,

cátions presentes em maiores concentrações nos extratos de folhas, em diferentes pHs, podem ser observados nas Figuras 6.3 e 6.4.



**Figura 6.3** – Espectros obtidos para os complexos de AX com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de Cu, Fe, Al, Mn e Zn em pH 3,3 (tampão acetato). (a) registrados tendo água como branco e (b) após a subtração do espectro do AX (direita). ( $[AX] \approx 7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ )



**Figura 6.4** – Espectros obtidos para os complexos de AX com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de Cu, Fe, Al, Mn e Zn em pH 4,5 (tampão acetato). (a) registrados tendo água como branco e (b) após a subtração do espectro do AX (direita). ( $[\text{AX}] \approx 7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ )

A partir dos espectros obtidos torna-se evidente que os efeitos de interferência causados por estes metais é minimizado realizando-se as determinações em pH mais ácido. Esta condição também apresentaria vantagens em relação à possível interferência de fosfato e sulfato, que também podem ser encontrados em concentrações elevadas nos extratos de folhas e solos.

O pH mais favorável para a formação de complexos de AX com Fe(III) é ao redor de 1,5 (Cheng,1959; Craig et al., 1999a). Porém, neste pH parece que não ocorre reação entre AX e íons  $Al^{3+}$ , pois não são detectadas mudanças no espectro na região do visível (Murakami e Yoshino,1981). Por outro lado, a determinação de alumínio poderia ser realizada com sucesso em pH 5,0 ou pH 3,4 (Tikhonov,1965). Na faixa entre 3,2 e 3,8 os complexos de AX com alumínio são pouco afetados por pequenas variações de pH (Otomo,1963).

Com base nessas informações, a faixa de pH entre 3,2 e 3,8 é a melhor região para desenvolver-se a determinação simultânea de alumínio e ferro. Nessa faixa de pH não teríamos alterações significativas em relação aos complexos de alumínio e seria possível preparar soluções tampão eficientes, como o tampão formiato. Em qualquer outra situação fora dessa faixa de pH seria necessário um controle bastante rigoroso do meio reacional para evitar que pequenas variações introduzissem mudanças significativas na composição dos complexos e portanto, nos espectros registrados. Assim, nas determinações em extratos de folhas, obtidos inicialmente numa solução fortemente ácida ( $0,8 \text{ mol L}^{-1}$  em HCl), empregou-se um tampão mais forte, o tampão formiato/ácido fórmico ( $pK_a$  3,77), e para as determinações nos extratos de solos, obtidos em KCl ou  $NH_4Cl$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ , empregou-se o tampão acetato/ácido acético ( $pK_a$  4,74), mantendo-se em ambas as situações o pH do meio reacional no intervalo ( $3,3 \pm 0,1$ ).

### **Faixa analítica de trabalho**

A partir da literatura consultada, verificou-se que a faixa analítica de trabalho utilizada na determinação de alumínio com AX, usando o processo em batelada, costuma ser restrita e nem sempre coincidente. Como exemplo, pode-se citar as faixas analíticas de trabalho utilizadas por Otomo (1963), entre 0 e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , e por Pritchard (1967), entre 0,1 e  $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ . Esta aparente discordância representa, de fato, uma aproximação linear para um sistema químico que apresenta desvios da Lei de Beer (Tikhonov,1965; Gholivand et al., 1998). O mesmo comportamento não linear é observado em trabalhos mais recentes, nos quais sistemas de análise em fluxo são utilizados visando a determinação simultânea de elementos na amostra (Zolotov et al., 1995).

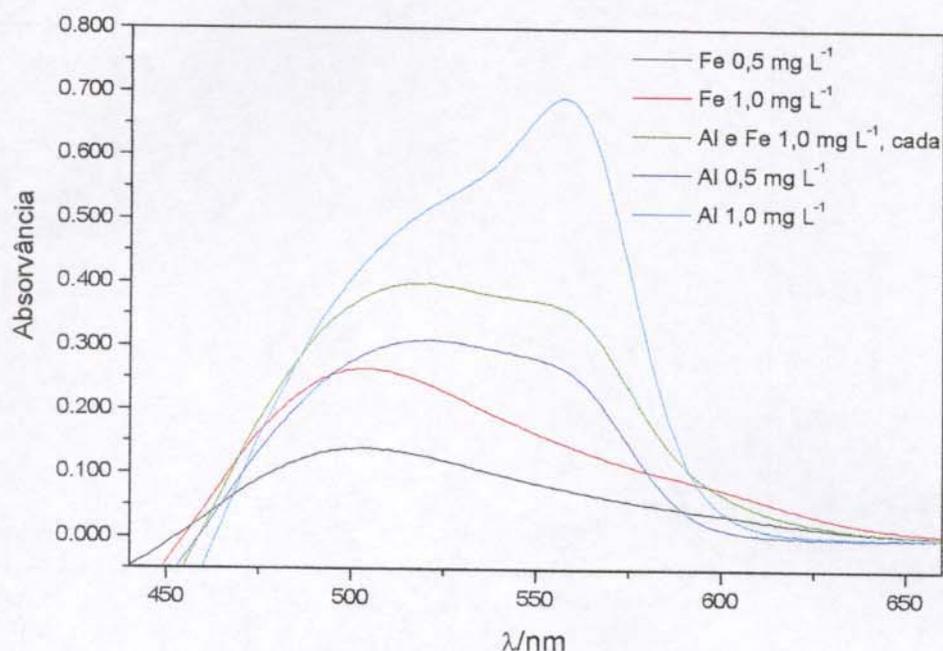
O modelamento de sistemas químicos com características não lineares, utilizando métodos de calibração multivariada como as redes neurais e o próprio PLS, é uma das possibilidades de emprego desses métodos. Assim, seria possível tentar modelar o sistema composto por alumínio, ferro e AX, sem que o comportamento peculiar dos complexos de AX com alumínio representasse uma restrição importante. Pelas condições de contorno mencionadas na literatura e encontradas nas matrizes em que desejávamos realizar as determinações, definiram-se as faixas de concentração entre 0 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> para alumínio (0 – 1,9 X 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) e para ferro (0 – 9,0 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>) para realizar a calibração.

### **Relação metal/ligante**

A definição de uma relação metal/ligante na qual as determinações seriam realizadas também mostrou ser importante. Outros experimentos de varredura, nos quais manteve-se a relação 1AX:1(Al+Fe) ([AX]= 2,8 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>), foram realizados para tentar definir qual seria o planejamento experimental mais adequado para a calibração do sistema. Nos espectros registrados para esses experimentos, usando água como branco, verificou-se que a banda registrada parecia estar sendo deslocada em direção a comprimentos de onda maiores.

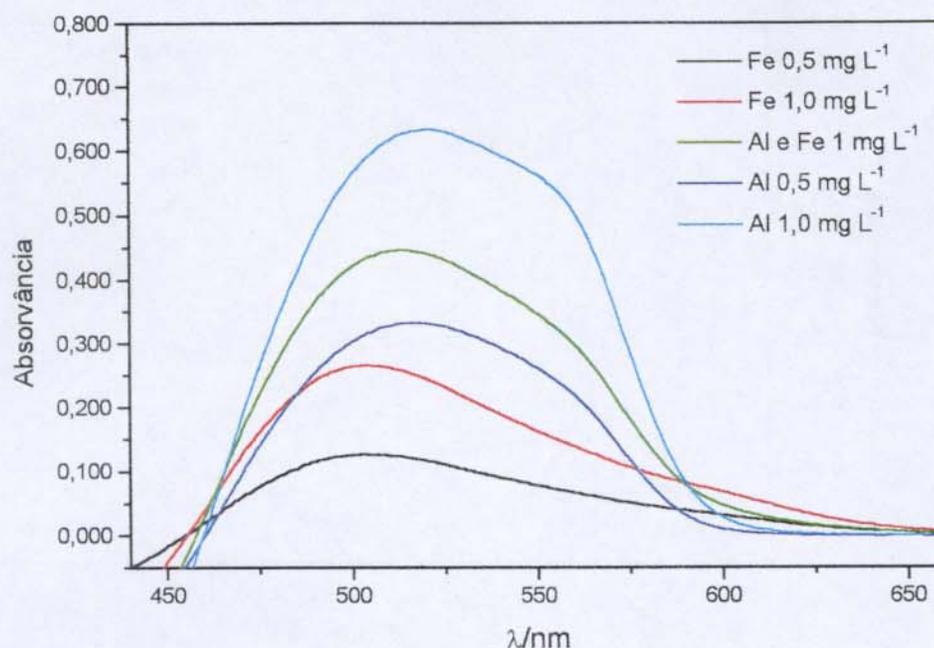
Esse comportamento pode ser atribuído à alteração no equilíbrio dos complexos formados com os metais que estaria ocorrendo devido à alteração significativa da relação metal/ligante causada pelo elevado consumo do AX nas condições desses experimentos. Essa hipótese é apoiada pelos espectros mostrados na Figura 6.5. Nessa figura a alteração do perfil dos espectros de AX com alumínio, após a subtração da banda do reagente, pode ser verificada, ocorrendo também a mudança do máximo de absorção de 514 para 550 nm nesses espectros.

Por outro lado, não parecem ocorrer alterações significativas para o complexo Fe-AX. Aparentemente, nas condições desses experimentos, estaria sendo formado um só complexo Fe-AX, de composição definida, que não fora perturbado pela variação na concentração metal/ligante observada. No entanto, não é adequado afirmar que os complexos de AX com ferro são independentes da concentração de AX devido à literatura existente (Murakami et al., 1980; Yoshino et al., 1979). Na Figura 6.5 é possível verificar também a sobreposição existente entre os espectros das espécies Al-AX e Fe-AX, o que torna crítica a interferência do ferro nas determinações de alumínio com alaranjado de xilenol e a sua eliminação, segundo o método espectrofotométrico convencional, no mínimo, complexa.



**Figura 6.5** – Efeito da alteração do perfil dos espectros de Al-AX devido à alteração na relação metal/ligante, causada pelo elevado consumo do reagente cromogênico ( $[AX] = 2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ).

Uma forma de restringir as variações na relação Al:AX e conseqüentemente do equilíbrio envolvido nessas reações, obtendo-se um sistema mais robusto, seria tornar o sistema independente da concentração de AX. Para tal seria necessário adicionar um grande excesso de AX, de forma que a variação na concentração do reagente fosse mínima, tornando-a aproximadamente constante. Uma condição próxima a esta foi obtida utilizando-se 2,5 AX:1(Al+Fe) ( $[AX] \approx 7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), na qual não se observa mais alteração no perfil dos espectros contendo complexos Al-AX (Figura 6.6). Devido à forte absorção do AX, com máximo em 420 nm, um excesso maior de AX foi evitado por tornar os valores de absorvância muito elevados e impróprios para a realização de medidas instrumentais. Nessa condição continua sendo possível registrar os espectros usando água como branco, deixando eventuais correções para o modelamento, sem gasto excessivo de reagente. Desta forma, o ponto zero de concentração dos metais estudados, a ser incluído na calibração, é o próprio espectro do AX.



**Figura 6.6** – Perfil dos espectros Al-AX na presença de excesso do reagente cromogênico. A relação metal/ligante corresponde a 2,5 AX:1(Al+Fe) ( $[AX] \approx 7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ).

### Outras considerações

Antes de discutir os resultados do modelamento e suas aplicações, é oportuno chamar a atenção para outros aspectos operacionais relevantes. Um desses aspectos é a qualidade do AX disponível comercialmente e a dificuldade em realizar sua purificação. Como na maioria dos métodos espectrofotométricos, a qualidade do reagente cromogênico utilizado é crítica e a qualidade do produto comercializado varia bastante, o que pode ocorrer também entre lotes de uma mesma marca. A qualidade do AX disponível não deixa de ser questionada, inclusive no caso de fornecedores consagrados (Craig et al., 1999a). Na verdade, a purificação deste tipo de produto geralmente é lenta e difícil, embora também para o AX muitas alternativas tenham sido reportadas na literatura (Yamada e Fujimoto, 1971; Kiciak e Gontarz, 1986; Kiciak, 1989; Murakami et al., 1967). Em nossos estudos o reagente da marca Merck forneceu bons resultados.

Os principais contaminantes do AX são o semi-alaranjado de xilenol, o ácido iminodiacético e o vermelho de cresol. O ácido iminodiacético e o vermelho de cresol, encontrados são resíduos dos reagentes empregados na síntese do AX, enquanto o semi-alaranjado de xilenol, que contém apenas um grupo cromogênico, é fruto da reação incompleta

entre estas espécies e possui características muito semelhantes à do AX. Apenas o ácido iminodiacético não absorve radiação no visível (Murakami et al., 1967).

Devido à necessidade de recalibração freqüente, problemas relacionados a qualidade do reagente podem ser minimizados quando utilizam-se os métodos espectrofotométricos tradicionais. Porém, este pode tornar-se um procedimento complexo quando estão envolvidos estudos multivariados, nos quais a calibração usualmente exige a preparação de um conjunto de padrões (conjunto de calibração) baseado em algum tipo de planejamento fatorial.

Sob este ponto de vista, procurou-se desenvolver uma calibração que não incluisse experimentos em excesso e a partir da qual fosse possível avaliar a necessidade de recalibração. Em nosso trabalho, o conjunto de calibração inicialmente proposto consistiu de um grupo de 36 soluções-padrão aquosas de alumínio e ferro, o qual será discutido a seguir, sendo necessário prepará-lo apenas uma vez para cada volume de solução de AX preparada. A necessidade de recalibração pode ser verificada preparando-se novamente apenas os 10 experimentos do conjunto de validação e calculando-se o erro obtido nestas determinações. Se o valor calculado for significativamente diferente daquele obtido quando realizou-se a calibração, deve-se refazê-la.

Verificou-se também que armazenado-se a solução de AX em geladeira e adicionado-se como preservante 1mL de clorofórmio por litro de AX preparado, esta solução é estável por até 6 meses. Seguindo este procedimento, é possível realizar determinações simultâneas de  $Al^{3+}$  e  $Fe^{3+}$  em 1000 amostras, por litro de reagente cromogênico preparado. Assim, como o custo do reagente cromogênico costuma ser relevante em métodos espectrofotométricos de análise, além de um procedimento robusto como o descrito na Parte Experimental (Cap. 5), o custo associado ao método proposto ora proposto é bastante reduzido, o que facilitaria sua implementação em condições de rotina.

## *IV.2 Calibração usando soluções padrão aquosas*

O procedimento de calibração mais simples para a determinação simultânea de alumínio e ferro consiste em preparar soluções contendo concentrações conhecidas destes metais, empregando-se soluções padrão aquosas. O uso destas soluções é um procedimento tradicionalmente empregado na rotina de laboratórios que utilizam métodos espectroquímicos de análise e poderia ser implementado sem maiores complicações. Estudos preliminares realizados com 4, 5 e 6 níveis de concentração de alumínio e de ferro, entre 0 e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de

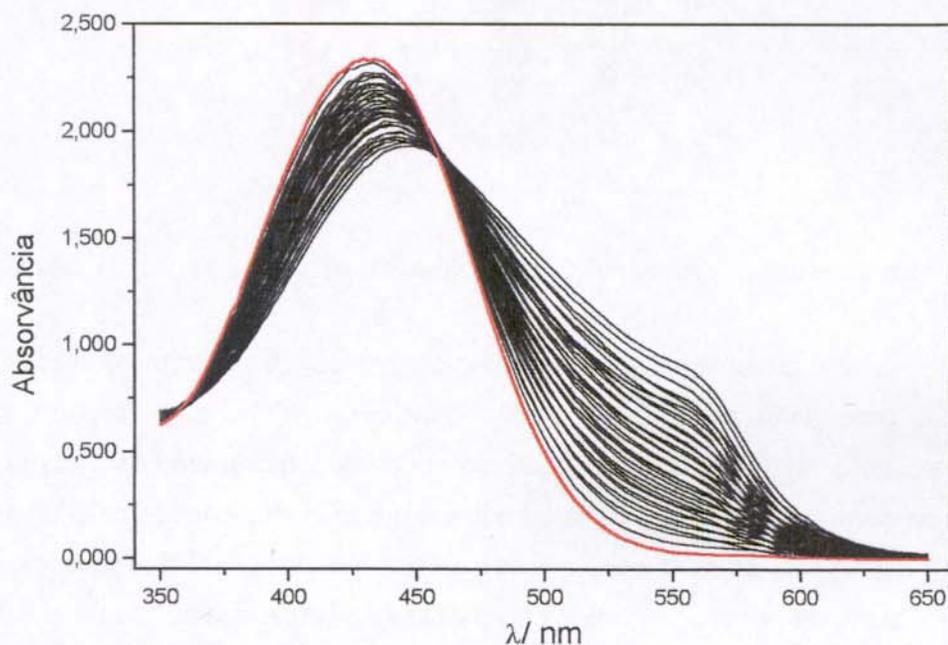
cada metal, no planejamento experimental, indicaram ser conveniente utilizar um planejamento fatorial completo com 6 níveis de concentração, num total de 36 experimentos (26 para calcular os modelos e 10 para testa-los), preparados como descrito na Parte Experimental. Quando um número menor de níveis foi utilizado para a construção dos modelos, os resultados das determinações com as respectivas soluções utilizadas para teste não foram satisfatórios.

Além disso, visando aumentar a similaridade com a matriz real, outra estratégia adotada foi tentar simular as condições encontradas nas matrizes analisadas. Assim, dois planejamentos fatoriais distintos foram preparados, adicionando-se o volume adequado do extrator utilizado em cada calibração (para folhas, 5 ml de HCl 0,8 mol L<sup>-1</sup> e para solos, 2 mL de NH<sub>4</sub>Cl ou KCl 1 mol L<sup>-1</sup>) às soluções previstas no planejamento fatorial. No entanto, para o uso de extratores tão diferentes pequenos ajustes foram feitos no procedimento empregado para a análise de extratos de folhas ou solos, mas o procedimento básico foi mantido e continuou bastante simples. O procedimento de calibração consistiu em pipetar uma alíquota apropriada do extrator utilizado para um balão volumétrico de 50 mL, adicionando-se em seguida as alíquotas adequadas das soluções padrão diluídas de alumínio e de ferro, o AX, o tampão e o etanol. Acerta-se o volume final com água e homogeneiza-se cuidadosamente a solução. Após 2 horas os espectros podem ser registrados, iniciando-se as etapas de calibração e/ou determinação das concentrações usando o modelo desenvolvido.

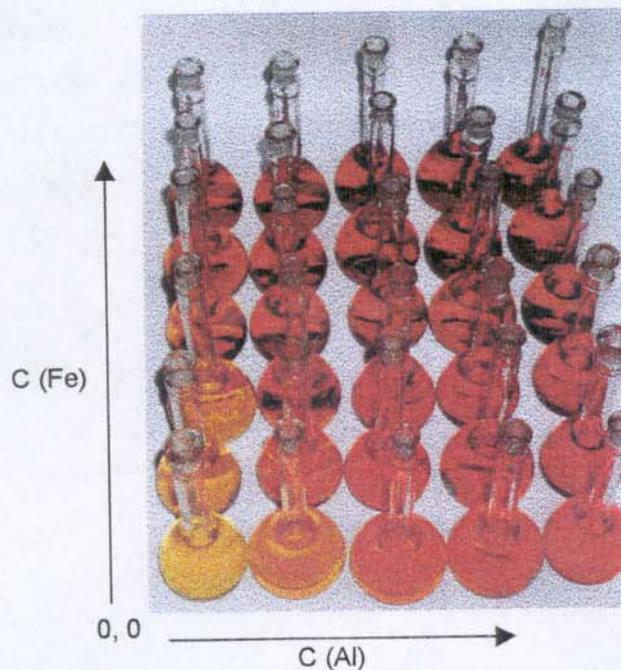
Os ajustes experimentais diferenciados para a análise de solos e plantas destinam-se ao melhor controle de acidez da solução final, utilizada para a obtenção dos espectros. Nas determinações em plantas é necessário realizar uma pré-neutralização das alíquotas dos extratos com a adição de um volume fixo de base concentrada. O ajuste final deve ser feito individualmente com o auxílio do próprio AX como indicador, que vira para roxo (o pKa do AX é aproximadamente 6,8) através da adição de algumas gotas de base, sem alterações para a solução final. Neste caso, o tampão deve ter uma capacidade de tamponamento elevada, pois uma etapa de neutralização rigorosamente controlada é inviável, principalmente quando trabalha-se com um grande número de amostras. O uso do tampão formiato mostrou-se adequado para manter o pH na faixa desejada (3,3 ± 0,1).

Por outro lado, nas determinações em extratos de solos a etapa de neutralização é dispensável, utilizando-se apenas o tampão para ajustar o pH. Nesses casos, o tampão formiato foi utilizado com sucesso, mas pode ser substituído pelo tampão acetato. O tampão acetato é mais barato e pode ser utilizado sem inconvenientes, desde que a calibração e as determinações sejam feitas nas mesmas condições.

Quando simulam-se os extratos de solos ou plantas não há diferença visual entre as soluções preparadas segundo o planejamento fatorial ou espectros registrados. Assim, os espectros utilizados para a construção de modelos para a determinação em plantas, mostrados na Figura 6.7, serão utilizados para exemplificar as etapas envolvidas no desenvolvimento dos modelos de calibração construídos utilizando-se as soluções padrão aquosas. O aspecto das soluções preparadas pode ser observado na foto da Figura 6.8.



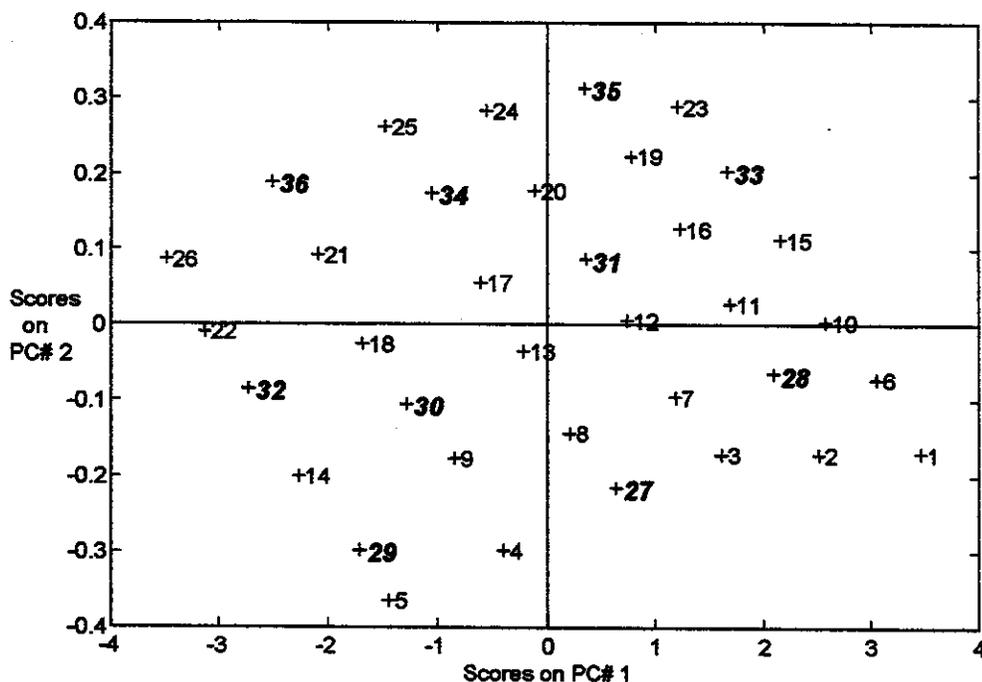
**Figura 6.7-** Espectros dos experimentos previstos no planejamento fatorial 6 X 6 para a calibração multivariada de  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  na faixa de 0 a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , utilizando-se soluções-padrão aquosas, simulando a condição dos extratos de plantas. O nível zero corresponde ao espectro do AX (linha vermelha).



**Figura 6.8-** Soluções utilizadas no desenvolvimento dos modelos de calibração usando padrões aquosos.

Antes de iniciar o desenvolvimento de modelos, os espectros foram centrados na média e submetidos a uma análise de componentes principais (PCA). Esse pré-processamento consistiu em calcular o valor médio de absorvância em cada comprimento de onda, subtraindo-o da absorvância correspondente em cada amostra e dividir o valor obtido pelo desvio padrão dos valores de absorvância de cada coluna (comprimento de onda fixo) da matriz de espectros e também foi aplicado nas etapas de construção e validação dos modelos

Com dois componentes principais (PCs) é possível explicar 99,59% da variância total contida nestes dados. O exame do gráfico de "scores" para estas componentes principais, mostrado na Figura 6.9, com o auxílio da Tabela 5.3 que apresenta a composição das soluções (parte experimental), permite verificar que a PC1 descreve principalmente o aumento de concentração de alumínio nas amostras enquanto a PC2 descreve este mesmo aumento principalmente para as concentrações de ferro. Como esperado, segundo a estrutura do planejamento fatorial utilizado, os "scores" das soluções apresentam uma distribuição uniforme no espaço experimental estudado.



**Figura 6.9-** Gráficos dos scores para as componentes principais 1 e 2, obtidas através da análise de componentes principais dos espectros mostrados na Figura 6.7. Os espectros foram centrados na média. A composição das soluções é apresentada na Tabela 5.3.

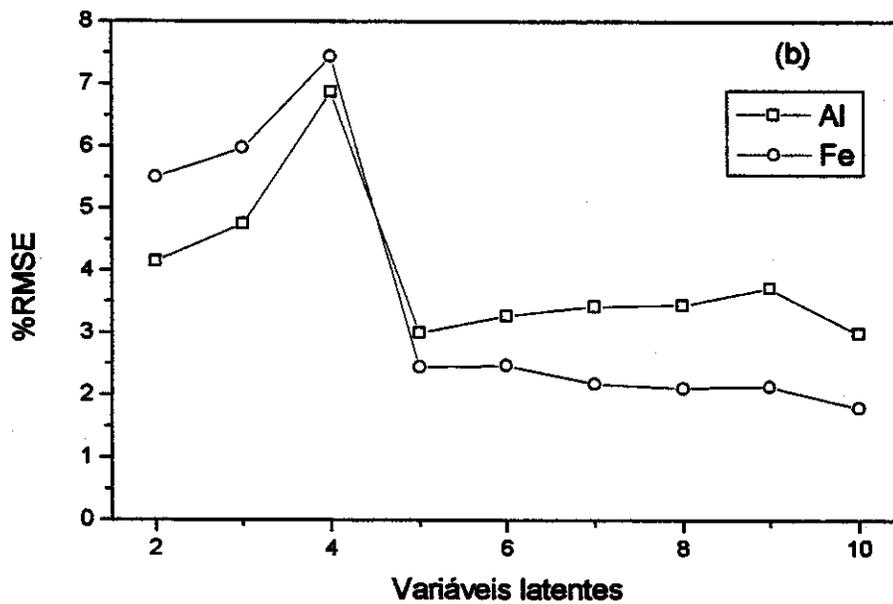
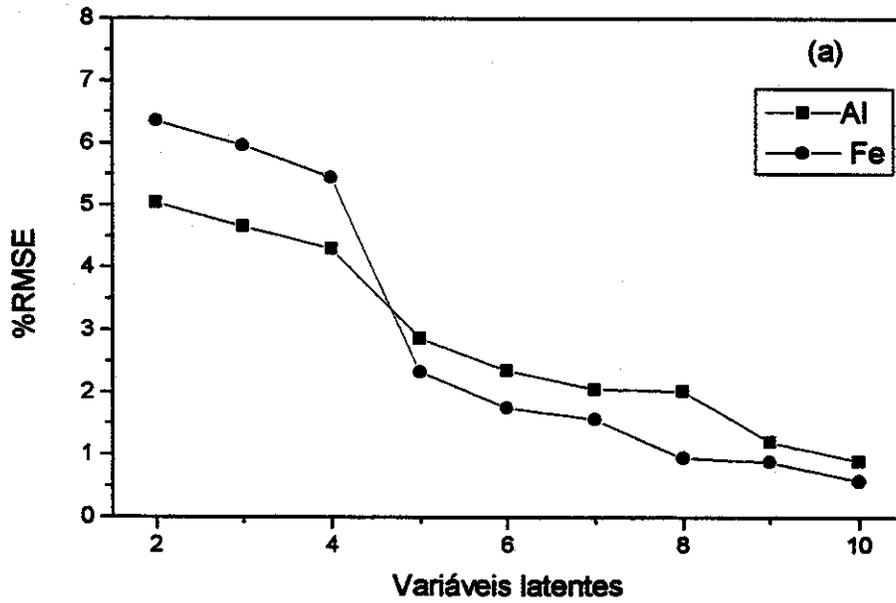
A partir do gráfico da Figura 6.9 foram selecionadas 10 soluções do planejamento fatorial inicial (marcadas em negrito) para constituir um conjunto de validação, procurando-se representar todo o espaço experimental. As soluções do conjunto de validação não são incluídas no cálculo do modelo de calibração e servem para avaliar a capacidade de determinação (ou capacidade preditiva) dos modelos. Este procedimento, denominado de validação externa, é recomendado em relação a outros procedimentos de avaliação dos modelos construídos e deve ser usado sempre que possível (Martens e Naes, 1989).

O algoritmo original do PLS foi concebido considerando que a relação linear entre os dados (químicos) e suas respostas é linear. Porém, em diversas ocasiões o uso de um número maior de variáveis latentes pode fornecer uma boa aproximação das características de sistemas químicos com algum grau de não linearidade (Martens e Naes, 1989). Desta forma, em busca da melhor alternativa para o desenvolvimento dos modelos, testaram-se também as possíveis variações do PLS, que correspondem ao modelamento de ferro e alumínio em separado utilizando-se o algoritmo PLS-1, o modelamento simultâneo dos metais usando o PLS-2 e o modelamento específico para sistemas mais complexos com o PLS polinomial, no qual a relação entre variáveis e repostas pode ser descrita por uma função quadrática ou de ordem superior (Martens e Naes, 1989; Wold et al., 1989).

Com o PLS- polinomial, utilizando-se um polinômio de 2º grau, obteve-se uma boa calibração, mas os modelos desenvolvidos não foram capazes de fornecer previsões satisfatórias. Isso parece indicar que as condições experimentais selecionadas para tomar o procedimento mais robusto (especialmente o pH e a relação metal/ligante) teriam também simplificado o sistema químico. Assim, um ajuste excessivo para descrever os experimentos do conjunto de calibração teria produzido um modelo incapaz de realizar previsões satisfatórias. Essa hipótese parece coerente com os outros resultados obtidos usando o PLS-1, pois os modelos construídos usando esse algoritmo foram equivalentes aos obtidos usando o PLS-2, tanto no que diz respeito ao ajuste da calibração quanto à capacidade preditiva. O uso de modelos obtidos com o PLS-2 é mais vantajoso, pois é necessário apenas um modelo para a determinação simultânea satisfatória dos metais estudado e foi utilizado em todos os nossos estudos.

#### **Seleção do número de variáveis latentes**

O melhor modelo é sempre escolhido de modo a otimizar o ajuste de calibração e sua capacidade preditiva simultaneamente, para que não ocorra nem o sobreajuste nem a falta de ajuste do modelo selecionado. Quando utiliza-se a validação externa para avaliar modelos construídos com um número diferente de parâmetros internos (variáveis latentes, no PLS; neurônio para redes neurais), deve-se comparar os erros obtidos na previsão das concentrações conhecidas de cada analito. Isto pode ser feito para cada analito, em todas as amostras de cada conjunto, ou alternativamente, dos analitos de forma global. A raiz quadrada do erro médio relativo (%RMSE), descrito na parte experimental, serve como uma estimativa do desvio padrão das determinações. É comum colocar-se os valores de %RMSE em gráficos, como os mostrados na Figura 6.10, para melhor visualizar os resultados



**Figura 6.10** - Raiz quadrada do erro médio relativo (%RMSE) para a avaliação da capacidade preditiva dos modelos desenvolvidos usando o algoritmo PLS-2. (a) conjunto de calibração; (b) conjunto de validação (dez soluções do planejamento fatorial).

O compromisso entre os erros calculados indica que, no nosso caso, o melhor modelo é aquele que emprega 5 variáveis latentes, pois quando utiliza-se um número maior destas, o %RMSE para o conjunto de validação não diminui significativamente.

O comportamento observado para o %RMSE com 4 variáveis latentes para o conjunto de validação pode ser considerado anômalo, pois espera-se sempre uma melhor capacidade preditiva do modelo, e conseqüentemente uma diminuição do %RMSEP, até que se obtenha o número ótimo de variáveis latentes para esse sistema químico, a partir do qual o %RMSE voltaria a aumentar. Esse tipo de comportamento poderia ser atribuído à presença de amostras anômalas ("outliers") nos conjuntos de calibração ou de validação e sua detecção pode ser feita através da análise do gráfico de influência. Nesse gráfico compara-se o ajuste das diferentes amostras no modelo construído, através dos valores da variância residual para cada amostra em relação ao modelo e da influência dessa amostra na construção do modelo (Martens e Naes, 1989). O MatLab permite a obtenção dos gráficos de influência, mostrando também o limite de aceitação para cada parâmetro calculado (linha tracejada) com 95% de confiança. Porém não foi possível identificar a existência de "outliers" nos conjuntos de calibração ou validação, no modelo com 4 variáveis latentes.

Com 5 variáveis latentes o modelo desenvolvido descreve 99,99% da variância da matriz de espectros (bloco X) e 99,98% da variância da matriz de concentrações (conhecidas) das soluções (bloco Y). Com apenas duas variáveis latentes é possível explicar 99,52% e 99,06% de variância para os mesmos blocos de dados, respectivamente. O uso de um número elevado de parâmetros internos no modelo (cinco), quando são esperadas 3 fontes de variação no sinal analítico (espectros gerados pelas espécies Al-AX, Fe-AX e AX), poderia ser atribuído às características não lineares do sistema Al-AX, como verificado em outras condições experimentais. No entanto, esta afirmação não parece ser a mais correta quando se leva em conta os resultados obtidos utilizando-se os outros algoritmos do PLS. Assim, outras fontes de variação nos dados utilizados, que não são significativamente importantes para a calibração realizada, poderiam explicar esse efeito.

### **Aplicabilidade em solos e plantas**

A concentração de elementos químicos nas plantas, nutrientes ou não, pode variar bastante em função da espécie e variedade do vegetal, das condições encontradas nos solos e dos aspectos ambientais. No entanto, em plantas saudáveis, é possível definir os níveis e as faixas de concentração mais freqüentemente encontrados para um determinado elemento no tecido vegetal (Kabata-Pendias e Pendias, 1984; Mills e Jones, 1996). Estes níveis estão relacionados aos critérios utilizados na interpretação das análises químicas de plantas e foram utilizados neste trabalho para estabelecer o procedimento sugerido para as determinações em plantas e avaliação dos interferentes presentes nos extratos utilizados.

Nas condições operacionais descritas, tomando-se uma alíquota de 5,00 mL do extrato de folhas obtido como descrito na Parte Experimental, concentrações menores do que  $1,00 \text{ mg L}^{-1}$  ou maiores do que  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  de alumínio e/ou ferro na solução medida (com tolerância de  $\pm 5\%$ ) podem ser determinadas utilizando-se os modelos desenvolvidos. Considerando-se os fatores de diluição envolvidos, pode-se realizar a determinação simultânea de alumínio e ferro, em plantas, na faixa de 25 a  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  de matéria seca. Caso as concentrações de alumínio ou ferro encontradas nos extratos estejam fora destes limites, deve-se repetir as determinações realizando-se uma diluição (1+5) v/v em HCl  $0,8 \text{ mol L}^{-1}$  ou tomando-se uma alíquota de 10,00 mL do extrato, respectivamente. Desta forma, é possível determinar de 12,5 a  $2500 \text{ mg kg}^{-1}$  de alumínio e/ou ferro na folha, sendo oportuno lembrar que a maioria das plantas saudáveis apresenta concentrações de alumínio ou de ferro na faixa de 25 a  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  de folha (matéria seca) (Kabata-Pendias e Pendias, 1984; Mills e Jones, 1999).

Nos extratos de solos, tomando-se uma alíquota de 2,00 mL do extrato, é possível determinar-se entre 15 e 250 mg de alumínio e/ou ferro <sup>(3)</sup> por kg de solo. Esta faixa de concentrações é suficiente para a determinação do alumínio trocável em mais de 90% dos solos encontrados no estado de São Paulo (Quaggio, J.A., comunicação pessoal – 1998), mas tomando-se alíquotas de 10,00 e 1,00 mL pode-se realizar determinações entre 2,5 e 500 mg de  $\text{Al}^{3+}$  e/ou  $\text{Fe}^{3+} \text{ kg}^{-1}$  de solo <sup>(4)</sup>.

O limite inferior, de  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  na solução medida, foi estabelecido experimentalmente. Abaixo desta concentração é possível realizar determinações, mas os erros obtidos são superiores aos encontrados em outras concentrações. Assim, é recomendável repetir a determinação utilizando-se alíquotas maiores dos extratos. O maior erro relativo encontrado abaixo desta concentração pode ser causado pela pouca definição do planejamento experimental utilizado nesta região do espaço experimental ou ainda pela baixa sensibilidade relativa do método espectrofotométrico com AX na determinação de alumínio, o qual se encontra também fora das condições ótimas para o ferro. Assim, a baixa reprodutibilidade dos espectros obtidos nessas concentrações mostrou ser inconveniente utilizar as previsões do modelo PLS para o espectro correspondente à solução de medida preparada utilizando o branco das extrações de plantas para a correção das concentrações de alumínio e ferro determinadas nas amostras, devido ao erro envolvido nessa determinação. Essa correção é completamente dispensável se observados os cuidados necessários para o controle de qualidade dos resultados laboratoriais.

---

<sup>(3)</sup> - 1,5 a 28  $\text{mmol}_c \text{ Al}^{3+} \text{ kg}^{-1}$  solo e/ou 0,8 a 13,5  $\text{mmol}_c \text{ Fe}^{3+} \text{ kg}^{-1}$  solo.  
<sup>(4)</sup> - 0,3 a 55,6  $\text{mmol}_c \text{ Al}^{3+} \text{ kg}^{-1}$  solo e/ou 0,2 a 27,0  $\text{mmol}_c \text{ Fe}^{3+} \text{ kg}^{-1}$  solo.

### VI.3 Os interferentes

As condições em que ocorre a formação de complexos de AX com os metais cobre, zinco e manganês nas determinações de interesse já foi bastante estudada, não se justificando um novo estudo amplo e sistemático para caracterizar os efeitos dessas espécies. Assim, o objetivo desse estudo de interferência foi o de procurar estabelecer quais os níveis críticos de cada interferente na determinação simultânea de alumínio e ferro nas matrizes estudadas. Para isso, tomou-se como referência as concentrações típicas de mangânes, cobre, zinco, fosfato e sulfato encontradas nos extratos de folhas, pois nessa matriz ocorrem maiores concentrações dessas espécies químicas em relação aos extratos de solos estudados.

O manganês aparentemente seria um interferente importante, pois pode ser encontrado nas plantas em concentrações elevadas, de 15 a 350 mg kg<sup>-1</sup> folha (Kabata-Pendias e Pendias, 1984). Porém, nas condições experimentais adotadas não ocorreu a complexação de Mn<sup>2+</sup> pelo AX, até o nível de 1,0 mg L<sup>-1</sup> na solução de medida. Esta concentração corresponde aproximadamente a 500 mg kg<sup>-1</sup> de folha. A interferência de cobre, nutriente cujas concentrações raramente excedem 20 mg kg<sup>-1</sup> folha (Kabata-Pendias e Pendias, 1984), é desprezível na determinação de alumínio e/ou ferro.

Dois fatores podem ser considerados importantes em relação à interferência de manganês e de cobre, que mostraram-se desprezíveis. Em primeiro lugar, o pH ótimo para a formação de complexos de AX com esses metais é elevado em relação à nossas medidas (aproximadamente 6 e 5, respectivamente). Além disso, o efeito de diluição associado à preparação da solução utilizada para o registro dos espectros parece ter contribuído para reduzir o sinal dessas espécies, especialmente no caso do cobre. Esses efeitos também contribuíram, em diferente extensão nos casos do zinco, do sulfato e do fosfato.

O zinco é freqüentemente encontrado nas plantas em concentrações entre 30 e 40 mg kg<sup>-1</sup> folha, mas em condições normais é possível encontrar-se concentrações de até 75 mg kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias e Pendias, 1984). Dentre os micronutrientes estudados, este mostrou ser o interferente mais importante em nossos estudos.

A estratégia adotada para determinar quais os níveis críticos de zinco, fosfato e sulfato na determinação de alumínio e ferro, segundo o procedimento proposto, foi preparar diversas soluções contendo concentrações fixas de alumínio e de ferro e concentrações crescentes de cada interferente em estudo, individualmente, e registrar o espectro da solução resultante. Esses espectros foram submetidos à previsão usando o modelo PLS-2 selecionado, como se fossem amostras. No caso do zinco, os resultados mostraram que as concentrações de ferro

determinadas com o PLS são superestimadas em torno de 5% se concentrações iguais ou maiores que  $75 \text{ mg kg}^{-1}$  de Zn e menores ou iguais a  $75 \text{ mg kg}^{-1}$  de ferro forem encontradas nas plantas, embora esta condição seja rara. Neste caso, a previsão do alumínio não é afetada.

Os ânions sulfato e fosfato poderiam interferir nestas determinações competindo com o AX pelos metais. Para estas espécies o estudo de interferência foi realizado em soluções contendo alumínio e ferro nos níveis 0,20; 0,40 e 0,80  $\text{mg L}^{-1}$  (o que corresponde aproximadamente a 100, 200 e 400  $\text{mg kg}^{-1}$  folha de Al ou Fe), usando-se concentrações diferentes do ânion (fosfato ou sulfato) para estudar o efeito da razão  $[\text{ânion}]/[\text{Metal}]$  em cada concentração de alumínio e de ferro. Na tentativa de verificar a existência de uma dependência entre a concentração dos ânions e as concentrações de alumínio e de ferro, as razões  $[\text{ânion}]/[\text{Metal}]$  foram colocadas em um gráfico contra as concentrações previstas usando PLS, como mostrado nas Figuras 6.11 e 6.12 para o sulfato.

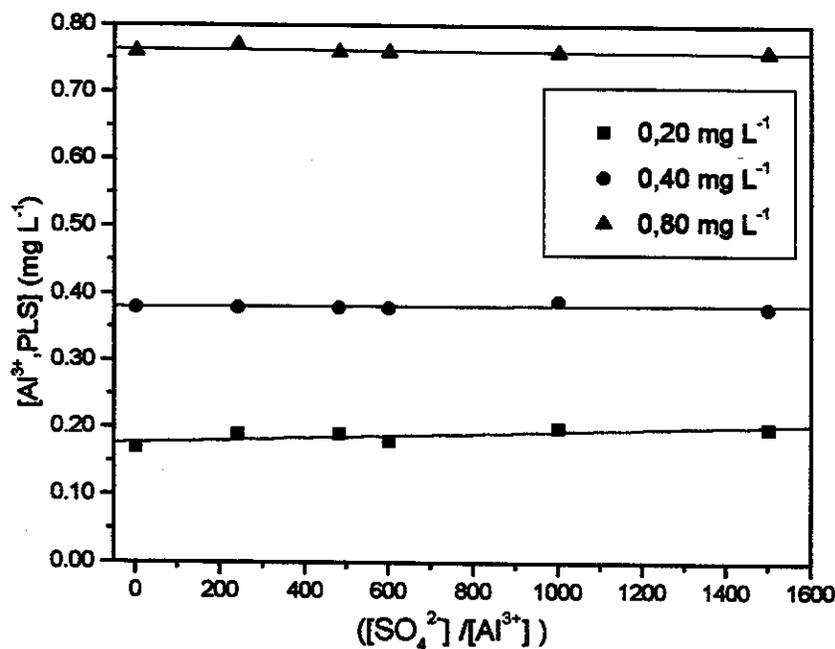
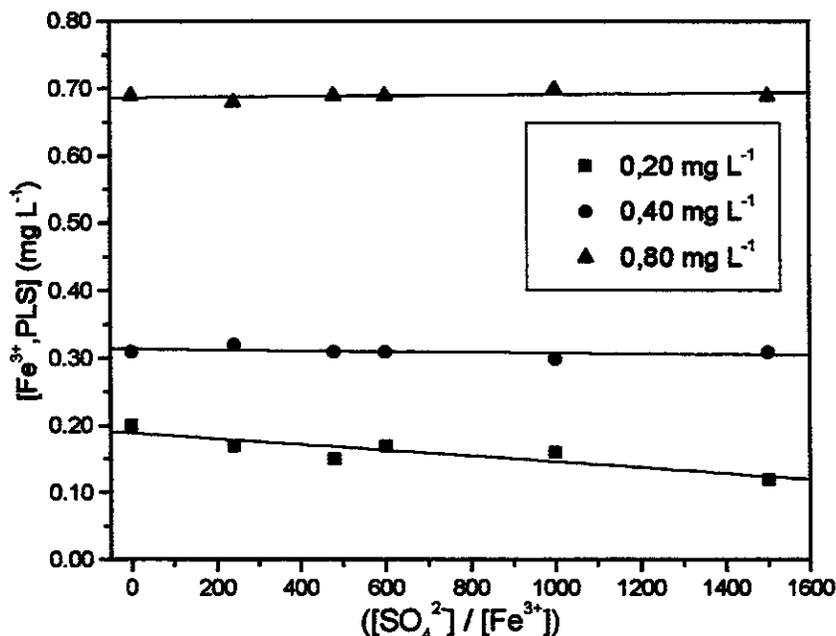


Figura 6.11 – Estudo de interferência do sulfato na determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e ferro. Efeito sobre a determinação de alumínio. Para detalhes ver o texto.

Como pode ser observado através da Figura 6.11, a interferência de sulfato não é significativa na determinação de alumínio. No entanto, é importante na determinação de ferro quando este encontra-se em concentrações baixas (nível  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) e a relação  $[\text{SO}_4^{2-}]/[\text{Fe}^{3+}]$  é elevada (Figura 6.12). Nesta situação, a interferência será significativa para concentrações de

sulfato acima de 22 g kg<sup>-1</sup> de folha (equivalente a 7,3 g de S kg<sup>-1</sup> de folha) e se a concentração de ferro for menor do que 100 mg kg<sup>-1</sup> folha. A tendência de aumento observada nos resultados fornecidos pelo modelo para o alumínio não é significativa na faixa estudada e pode ser atribuída ao modelo de calibração, desenvolvido de forma simultânea para os dois metais.



**Figura 6.12** – Estudo de interferência do sulfato na determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e ferro. Efeito sobre a determinação de ferro. Para detalhes ver o texto.

Os gráficos construídos para o estudo com o fosfato na determinação de alumínio podem ser observados na Figura 6.13. A interferência do fosfato na determinação de alumínio é evidente no nível de concentração mais elevada de alumínio, mas também é significativa para os outros níveis estudados. Comparando-se os valores de absorvância obtidos em função do aumento da concentração de sulfato, com a absorvância da solução sem o interferente, é possível verificar que ocorre um decréscimo de 5% no sinal. Convertendo a relação [fosfato]/[Al<sup>3+</sup>] obtida em cada curva da Figura 6.13 para valores de concentração, verifica-se que a interferência na determinação de alumínio torna-se significativa na presença de concentrações de fosfato superiores a 200 g kg<sup>-1</sup> na folha (equivalente a 65,3 g de P kg<sup>-1</sup> na folha). Por outro lado, nos níveis estudados o fosfato não apresenta efeito de interferência importante na determinação do ferro, como mostrado na Figura 6.14.

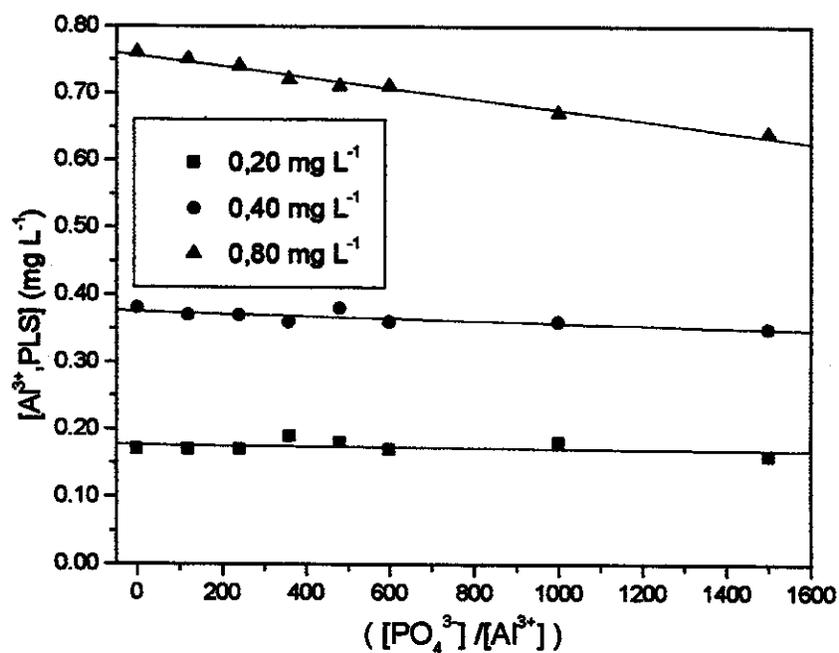


Figura 6.13 – Estudo de interferência do fosfato na determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e ferro, utilizando o modelo PLS-2 com 5 variáveis latentes. Efeito sobre a determinação de alumínio. Para detalhes ver o texto.

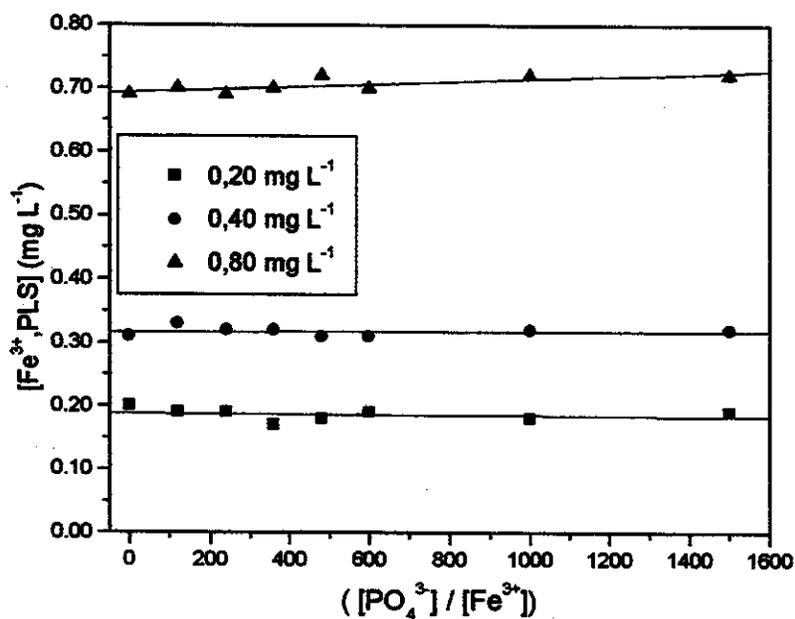


Figura 6.14 – Estudo de interferência do fosfato na determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e ferro, utilizando o modelo PLS-2 com 5 variáveis latentes. Efeito sobre a determinação de alumínio. Para detalhes ver o texto.

Os níveis considerados críticos para sulfato e fosfato estão bem acima daqueles geralmente encontrados em plantas, como pode ser observado na Tabela 6.1. Os dados apresentados nessa Tabela correspondem à concentração das espécies examinadas nesse estudo, para amostras utilizadas na fase de validação do modelo desenvolvido. É possível concluir que o efeito destas espécies, com exceção do zinco quando a concentração desse elemento na planta é maior do que  $75 \text{ mg kg}^{-1}$  e a concentração de ferro é inferior a  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , pode ser considerado desprezível e o método proposto pode ser aplicado na presença de concentrações de fosfato e sulfato maiores do que as encontradas em outros métodos (Royset, 1985).

**Tabela 6.1-** Medianas e desvio absoluto das medianas para as espécies potencialmente interferentes na determinação de alumínio e ferro em amostras de plantas usando AX.

| Amostra <sup>b</sup> | (mg kg <sup>-1</sup> ) |           |        | (g kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup> |                               |
|----------------------|------------------------|-----------|--------|------------------------------------|-------------------------------|
|                      | Mn                     | Cu        | Zn     | P (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> |
| 100                  | 80 ± 3                 | 7,7 ± 0,6 | 34 ± 1 | 11,9 ± 0,4                         | 3,8 ± 0,2                     |
| 108                  | 35 ± 2                 | 9,3 ± 0,5 | 33 ± 2 | 11,8 ± 0,3                         | 2,5 ± 0,5                     |
| 119                  | 43 ± 2                 | 3,4 ± 0,4 | 32 ± 2 | 5,7 ± 0,2                          | 0,5 ± 0,1                     |
| 568                  | 68 ± 3                 | 5,8 ± 0,4 | 56 ± 3 | 10,1 ± 0,4                         | 0,6 ± 0,1                     |
| 599                  | 121 ± 5                | 3,7 ± 0,4 | 61 ± 3 | 12,2 ± 0,4                         | 6,5 ± 0,3                     |
| 638                  | 27 ± 2                 | 3,7 ± 0,4 | 49 ± 3 | 6,1 ± 0,2                          | 1,4 ± 0,3                     |
| 686                  | 214 ± 12               | 7,4 ± 1,4 | 49 ± 3 | 18,4 ± 0,7                         | 3,7 ± 0,1                     |
| 883                  | 139 ± 6                | 6,0 ± 0,5 | 76 ± 3 | 21,4 ± 0,6                         | 4,7 ± 0,4                     |
| 995                  | 53 ± 2                 | 9,0 ± 0,5 | 25 ± 2 | 5,1 ± 0,2                          | 0,6 ± 0,1                     |

<sup>a</sup> Dados originais em mmol kg<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> Amostras do programa IPE, do ano de 1997.

## VI.4 Validação do modelo utilizando soluções aquosas para calibração

### Plantas

A validação do método proposto foi feita utilizando amostras de plantas do programa IPE, distribuídas em 1997 aos participantes do programa. Estas amostras foram selecionadas na tentativa de cobrir a maior faixa de concentração possível para alumínio e ferro (IPE, 1997). As concentrações de alumínio e de ferro foram determinadas segundo o método proposto, utilizando o conjunto de calibração apresentado nas Figuras 6.7 a 6.10. Os resultados obtidos, apresentados na Tabela 6.2, foram comparados com as determinações feitas por ICP-AES e com os critérios estatísticos de aceitação de resultados da IPE (Montfort et al., 1996). Todos os

resultados obtidos para alumínio e ferro usando o PLS foram aceitos pela IPE, encontrando-se dentro da faixa de aceitação calculada individualmente para cada amostra. Como as faixas de aceitação da IPE são largas, devido aos inúmeros métodos de mineralização e determinação utilizados, as determinações com o PLS e com o ICP (médias e desvio padrão) foram comparadas utilizando-se o teste t pareado e o teste F e não há diferença significativa para as determinações de alumínio e ferro entre estes métodos, num nível de 95% de confiança.

**Tabela 6.2** - Média e estimativa do desvio padrão para três determinações independentes de alumínio e ferro nas amostras IPE 1997 analisadas (Coscione et al., 2000b).

|         |        | Al (mg kg <sup>-1</sup> ) |            |                              |                                 |
|---------|--------|---------------------------|------------|------------------------------|---------------------------------|
| Amostra | Planta | Este trabalho             |            | Dados reportados pelo IPE    |                                 |
|         |        | AX/PLS-2                  | ICP-AES    | Valores aceitos <sup>a</sup> | Valores observados <sup>b</sup> |
| 100     | Gramma | 337 ± 41                  | 367 ± 58   | 252 - 628                    | 37 - 851                        |
| 108     | Salsa  | 137 ± 31                  | 171 ± 6    | 90 - 210                     | 71 - 630                        |
| 119     | Rosa   | 46 ± 3                    | 45 ± 1     | 42 - 99                      | 33 - 436                        |
| 568     | Trigo  | 10 ± 1                    | 7 ± 1      | 0,3 - 25                     | 6 - 50                          |
| 599     | Couve  | 81 ± 1                    | 86 ± 5     | 67 - 128                     | 68 - 641                        |
| 638     | Milho  | 170 ± 8                   | 162 ± 8    | 109 - 237                    | 4 - 490                         |
| 686     | Gramma | 834 ± 157                 | 876 ± 114  | 255 - 1751                   | 285 - 2942                      |
| 883     | Cravo  | 2358 ± 231                | 2370 ± 291 | 2287 - 2893                  | 81 - 6690                       |
| 995     | Manga  | 20 ± 1                    | 22 ± 1     | 11 - 39                      | 10 - 204                        |

|         |        | Fe (mg kg <sup>-1</sup> ) |           |                              |                                 |
|---------|--------|---------------------------|-----------|------------------------------|---------------------------------|
| Amostra | Planta | Este trabalho             |           | Dados reportados pelo IPE    |                                 |
|         |        | AX/PLS-2                  | ICP-AES   | Valores aceitos <sup>a</sup> | Valores observados <sup>b</sup> |
| 100     | Gramma | 456 ± 22                  | 481 ± 17  | 198 - 816                    | 132 - 700                       |
| 108     | Salsa  | 235 ± 13                  | 221 ± 11  | 185 - 265                    | 10 - 461                        |
| 119     | Rosa   | 74 ± 11                   | 78 ± 11   | 66 - 125                     | 14 - 180                        |
| 568     | Trigo  | 41 ± 1                    | 41 ± 3    | 33 - 59                      | 8 - 123                         |
| 599     | Couve  | 113 ± 34                  | 139 ± 33  | 99 - 161                     | 15 - 225                        |
| 638     | Milho  | 343 ± 21                  | 396 ± 26  | 300 - 542                    | 41 - 920                        |
| 686     | Gramma | 1052 ± 105                | 1123 ± 41 | 914 - 1528                   | 219 - 1826                      |
| 883     | Cravo  | 1250 ± 241                | 1256 ± 65 | 996 - 1507                   | 50 - 2500                       |
| 995     | Manga  | 46 ± 1                    | 49 ± 5    | 33 - 67                      | 4 - 218                         |

<sup>a</sup> Maior e menor valor aceito.

<sup>b</sup> Maior e menor valor reportado.

Além disso, as determinações de alumínio e de ferro nesses extratos usando ICP-AES foram utilizadas como referência para avaliar a eficiência do método proposto em relação às próprias determinações do ICP, verificando possíveis diferenças entre essas medidas e as determinações espectrofotométricas e do procedimento de mineralização por via seca em relação aos valores da IPE, pois embora esse procedimento seja usualmente utilizado para esse tipo de determinação em amostras de folhas, a extração de alguns elementos pode não ser completa (Novozamsky et al, 1993), o que impossibilitaria a comparação dos resultados obtidos pelo método proposto com os valores fornecidos pelo programa interlaboratorial.

Novamente nos deparamos com a questão de qual seria o processo mais adequado para a mineralização de amostras de plantas, especificamente para a determinação de alumínio. Embora a mineralização das amostras de plantas com ácido fluorídrico seja sugerida na literatura como meio de eliminar problemas relativos à retenção de metais por adsorção em silicatos, que não seriam destruídos quantitativamente em outros procedimentos (Novozamsky et al, 1993), o uso desse procedimento continua restrito mesmo entre os participantes do programa IPE. Isso acontece porque além de oferecer riscos adicionais, a mineralização com ácido fluorídrico pode acarretar danos e desgaste dos equipamentos de espectroscopia, largamente empregados nessas determinações. Assim, outras alternativas continuam a ser empregadas e a comparação entre os resultados das determinações empregando a mineralização das amostras com e sem ácido fluorídrico, passou a ser feita separadamente para possibilitar um cálculo mais refinado dos parâmetros estatísticos de rejeição de resultados analíticos do IPE (IPE, 2000a).

Além dos problemas de corrosão dos equipamentos de espectroscopia, o uso de HF impossibilita o uso de métodos alternativos como o proposto nesse trabalho, pois o fluoreto, a exemplo de sulfato e fosfato, compete com o AX na complexação dos íons metálicos. No entanto, a mineralização por via seca, usando apenas o ácido clorídrico, pode ser problemática para algumas amostras, como a 883 e a 686, que contém pelo menos 27600 e 5200 mg de Si kg<sup>-1</sup> de folha. Essas medianas, de 1997, foram maiores em 1998 e 1999. Nas determinações realizadas nessas amostras obtivemos estimativas do desvio padrão maiores do que em outras, o que pode ser atribuído, talvez, à adsorção ou oclusão dos íons metálicos em silicatos, pois os valores de sílica nessas amostras são relativamente altos. Esse é um efeito de matriz que não se limita às nossas determinações, refletindo-se também nas faixas de valores aceitos e observados do IPE, como pode ser observado na Tabela 6.2.

## **Solos**

Nos extratos de solos obtidos com NH<sub>4</sub>Cl e KCl 1 mol L<sup>-1</sup>, utilizados para a avaliação de fertilidade, estudos paralelos mostraram que as concentrações de ferro usualmente encontradas são baixas o suficiente para permitir a determinação de alumínio com AX, sem a necessidade de etapas para eliminar sua interferência (Coscione et al., 2000a). As concentrações típicas de alumínio e dos principais interferentes do método espectrofotométrico tradicional encontrados em extratos de solos do estado de São Paulo (Tabela 5.2) podem ser observadas na Tabela 6.3.

**Tabela 6.3 – Concentrações de alumínio, ferro, sulfato e fosfato, em mg L<sup>-1</sup>, em solos representativos do estado de São Paulo <sup>a</sup>. As determinações foram feitas por ICP-AES, em extratos de KCl.**

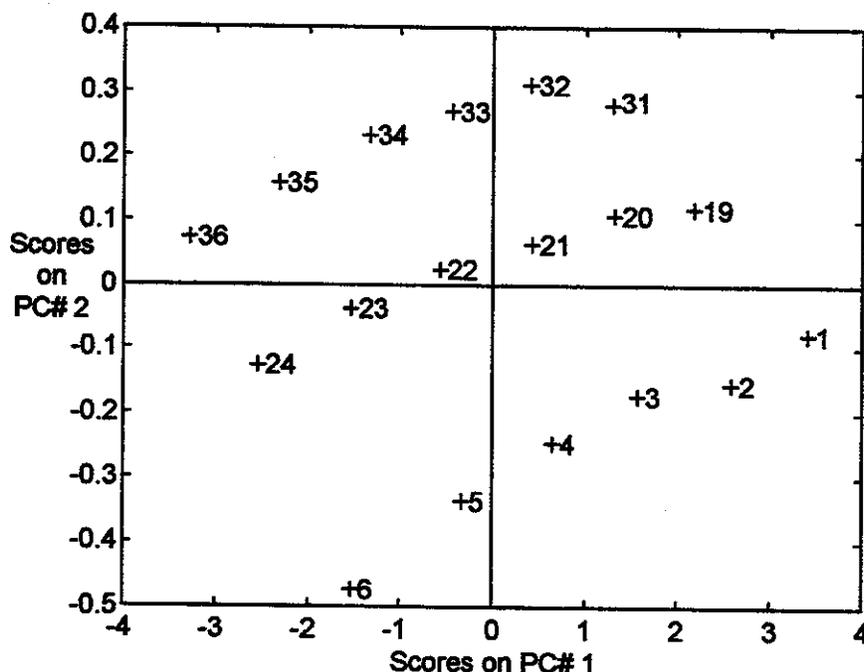
| Amostra <sup>b</sup> | Al    | Fe   | S (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) | P (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) |
|----------------------|-------|------|------------------------------------|------------------------------------|
| 1                    | 13,8  | 2,7  | 12,3                               | 2,6                                |
| 2                    | 261,0 | 9,8  | 21,5                               | 3,5                                |
| 3                    | 88,5  | 5,1  | 17,8                               | 4,2                                |
| 4                    | 55,8  | 4,1  | 20,6                               | 4,2                                |
| 5                    | 2,7   | 2,2  | 17,8                               | 5,5                                |
| 6                    | 0,45  | 2,4  | 22,0                               | 6,0                                |
| 7                    | 23,5  | 3,8  | 15,0                               | 4,5                                |
| 8                    | 65,2  | 6,1  | 20,0                               | 1,0                                |
| 9                    | 90,4  | 10,1 | 27,9                               | 3,0                                |
| 10                   | 72,4  | 4,1  | 27,5                               | 1,3                                |

<sup>a</sup> adaptado de Coscione et al,2000a

<sup>b</sup> concentrações calculadas a partir das determinações com ICP-AES.

A possibilidade de contaminação dos reagentes com ferro não deve ser esquecida e pode ser contornada, até certo ponto, através da correção dos resultados usando brancos das soluções extratoras, mas nada pode ser feito em relação a resultados superestimados por causa de contaminações da vidraria ou pela ocorrência natural de maiores teores de ferro extraível. Nessas situações, o interesse passa a ser eliminação da interferência do ferro na determinação do alumínio.

Para determinar apenas o alumínio trocável, o planejamento experimental utilizado foi adaptado para permitir a determinação do alumínio trocável nos extratos de solos utilizando o menor número de soluções possível para a calibração dos modelos, dentre as soluções originalmente empregadas na calibração, para plantas para facilitar o trabalho em rotina. Essa adaptação foi feita usando-se o algoritmo PLS-1 e estudando-se o ajuste da calibração e a capacidade preditiva dos modelos. Para tal, variaram-se os níveis dos metais incluídos no conjunto de calibração e de validação, nas condições encontradas nos extratos de solos. Utilizaram-se inicialmente 18 soluções, incluindo apenas os níveis 0, 0,6 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ferro e todos os níveis de concentração que haviam sido estudados para o alumínio. As concentrações de alumínio incluídas em cada caso foram selecionadas a partir do gráfico de "scores" da Figura 6.15, do mesmo modo como feito para a calibração usada para plantas.



**Figura 6.15** - Gráficos dos scores para as componentes principais 1 e 2, obtidas através da análise de componentes principais dos espectros utilizados na calibração de extratos de solo. A composição das soluções é a mesma apresentada na Tabela 5.3.

Os planejamentos estudados, com as amostras utilizadas para o cálculo dos modelos e para testá-los, podem ser melhor compreendidos com o auxílio da Figura 5.1 e da Tabela 5.3. Como conjunto de validação utilizou-se um terço das soluções do planejamento experimental, selecionadas dentro dos limites do conjunto de calibração definido em cada caso, através do gráfico de "scores" da Figura 6.15.

O número de variáveis latentes mais adequado para a construção dos modelos, utilizando os diversos conjuntos de calibração avaliados, foi selecionado através do %RMSE calculado para o conjunto de calibração propriamente dito e do respectivo conjunto de validação (soluções padrão selecionadas através da análise de componentes principais) e só então aplicado na determinação em extratos de solos. Nos casos em que o mesmo número de soluções foi utilizado no conjunto de calibração, mas com níveis de concentração diferentes para o alumínio, adicionou-se um índice (a ou b) para diferenciá-los. As diferenças entre esses planejamento pode ser visualizada com o auxílio da Figura 5.1.

A validação do procedimento proposto para a determinação de alumínio na presença do ferro foi realizada utilizando-se extratos em KCl 1 mol L<sup>-1</sup>, obtidos para os solos descritos na Tabela 5.2. Como esses extratos continham baixas concentrações de ferro extrajível (Tabela 6.3), para demonstrar o potencial do procedimento proposto, duas extrações com três replicatas

de cada solo foram realizadas e uma extração (três extratos) foi dopada com ferro, produzindo concentrações equivalentes a 27, 53 e 104 mg kg<sup>-1</sup> solo. As concentrações de alumínio e de ferro em todos os extratos foram determinadas usando o ICP-AES.

Os conjuntos de calibração avaliados, incluindo as informações relevantes para a construção dos modelos e os resultados obtidos nas determinações nos extratos de solos (valores de %RMSE) estão mostrados na Tabela 6.4.

**Tabela 6.4-** Resultados para a determinação de alumínio trocável em extratos de solos, na presença de ferro, usando planejamentos experimentais simplificados. Níveis de ferro nos planejamentos: 0; 0,6 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>.

| Nº de níveis | Al Níveis (mg L <sup>-1</sup> ) | Nº de soluções na calibração | ivs <sup>a</sup> | %RMSE      |                      |                   |         |
|--------------|---------------------------------|------------------------------|------------------|------------|----------------------|-------------------|---------|
|              |                                 |                              |                  | Calibração | Validação (soluções) | Validação (solos) |         |
|              |                                 |                              |                  |            |                      | não dopados       | dopados |
| 6            | 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0      | 18                           | 2                | 7,64       | 5,58                 | 12,53             | 15,48   |
| 5            | Sem 0,2                         | 15 (a)                       | 2                | 4,43       | 10,68                | 7,16              | 10,71   |
| 5            | Sem 0,6                         | 15 (b)                       | 2                | 7,24       | 12,08                | 10,57             | 22,07   |
| 4            | Sem 0,4 e 0,8                   | 12 (a)                       | 2                | 7,30       | 13,96                | 11,11             | 23,41   |
| 4            | Sem 0,2 e 0,8                   | 12 (b)                       | 2                | 9,05       | 8,04                 | 11,19             | 17,16   |
| 3            | 0; 0,6; 1,0                     | 9                            | 2                | 5,48       | 16,22                | 8,90              | 11,29   |

<sup>a</sup> número de variáveis latentes no modelo

A comparação dos resultados obtidos com os diferentes modelos foi feita utilizando-se o %RMSE da validação com os extratos de solos, dopados e não dopados com ferro, separadamente, como uma estimativa da variância dos resultados das determinações em amostras reais. Para isso calculou-se a relação  $(\%RMSEP_i/\%RMSEP_j)^2$ , na qual %RMSEP<sub>i</sub> é o erro calculado para o modelo considerado mais preciso, comparando-se o valor obtido com o valor do F tabelado para o número de amostras envolvidas no cálculo do erro das previsões (Gemperline et al., 1991). Considerou-se cada replicata, para a qual obtiveram-se previsões com os modelos, como uma amostra independente e o modelo com 18 amostras na calibração como o mais preciso, devido ao maior número de soluções padrão empregadas para a construção do modelo. Nessa situação, num nível de 95% de confiança, o valor tabelado de F(30,30,95%) é 1,84.

Não houve diferença significativa para as determinações de alumínio trocável em extratos de solos não dopados com ferro, entre todos os modelos desenvolvidos. Por outro lado, a diferença nas determinações em extratos de solos dopados com ferro foi significativamente diferente do modelos construído com 18 amostras para os modelos desenvolvidos com os conjuntos de calibração 15(b) e 12(a). Esses resultados podem ser explicados com o auxílio da Tabela 6.4 e da Figura 5.1, observando-se os níveis de

concentração incluídos em cada conjunto de calibração. Quando a concentração de ferro nesses extratos é baixa, o seu efeito de interferência é desprezível, como estudado em condições semelhantes (Coscione et al., 2000a). No entanto, na presença de maiores concentrações de ferro, como nos extratos dopados, torna-se evidente a necessidade de construir um modelo mais equilibrado, capaz de eliminar a interferência do ferro e de fornecer boas previsões em toda a faixa de concentração estudada (ver conjuntos 15(b) e 12(a)). A condição essencial para que isso ocorra é obter um conjunto de calibração distribuído de maneira mais uniforme no espaço experimental estudado, mas não necessariamente um numero maior de soluções.

Embora a calibração com 9 soluções (seis para calibrar e três para prever) tenha fornecido resultados estatisticamente comparáveis com os do conjunto 15a, o uso de apenas 6 soluções para calcular um modelo de calibração multivariada representa uma situação instável, na qual facilmente poderia ocorrer sobreajuste. Assim, dentre os conjuntos de calibração estudados, admitindo-se que a condição mais freqüente é aquela na qual ocorrem menores teores de ferro, devido a possíveis contaminações, a situação mais favorável é a calibração com 15 amostras (10 para calibrar e 5 para prever) e deve-se preferir o conjunto 15(a), com os níveis 0; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de alumínio e 0; 0,6 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ferro na calibração. Os resultados obtidos nas determinações com os modelos podem ser comparados com os obtidos por ICP na Tabela 6.5.

**Tabela 6.5 – Determinações de alumínio trocável em extratos de KCl, com o modelo construído usando o algoritmo PLS-1 e o conjunto 15(a) para calibração.**

| Amostra | Al (mg kg <sup>-1</sup> solo) |              |              |              |
|---------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|         | não dopados                   |              | dopados      |              |
|         | PLS                           | ICP          | PLS          | ICP          |
| 1       | 21,4 ± 5,0                    | 26,1 ± 0,7   | 24,2 ± 1,9   | 28,7 ± 1,0   |
| 2       | 360,0 ± 6,7                   | 346,5 ± 16,9 | 366,3 ± 10,4 | 350,7 ± 62,7 |
| 3       | 144,1 ± 2,1                   | 146,5 ± 3,4  | 148,9 ± 5,3  | 161,1 ± 5,1  |
| 4       | 97,7 ± 2,8                    | 102,8 ± 5,1  | 103,0 ± 5,1  | 111,8 ± 1,0  |
| 5       | 88,6 ± 1,35                   | 90,9 ± 2,4   | 92,0 ± 2,0   | 102,8 ± 3,8  |
| 6       | 68,5 ± 1,6                    | 68,2 ± 2,4   | 70,8 ± 3,7   | 79,5 ± 2,3   |
| 7       | ND                            | 2,5 ± 0,1    | 4,4 ± 2,0    | 3,0 ± 0,2    |
| 8       | ND                            | 1,3 ± 0,1    | 5,3 ± 2,5    | 1,7 ± 0,1    |
| 9       | 36,7 ± 1,51                   | 36,2 ± 1,0   | 41,8 ± 1,6   | 46,2 ± 0,6   |
| 10      | 52,3 ± 2,14                   | 49,1 ± 2,1   | 57,3 ± 2,5   | 65,3 ± 2,0   |

ND = não detectado

Entretanto, quando o objetivo é a determinação simultânea de alumínio e de ferro em solos, tais como em estudos de pedologia, nos quais realizam-se determinações das frações não cristalinas de alumínio e de ferro ligados a silicatos, pode-se empregar a sistemática de

análise proposta nessa Tese. Por exemplo, um dos processos utilizados para a extração dessas frações de alumínio e de ferro é a extração com oxalato de amônio, no escuro (Jackson et al., 1986). Nesses extratos, alumínio e ferro são extraídos simultaneamente e as quantidades de ferro extraído irão interferir na determinação de alumínio. O uso de métodos espectrofotométricos na determinação individual desses metais é comum (Jackson et al., 1986) e poderia ser substituída, com vantagens por um método que permitisse a determinação de ambos. Porém, estudos adicionais são necessários para a aplicação do procedimento proposto nessas determinações, pois pode ser necessário mineralizar previamente os extratos, recuperando-os em solução ácida, devido à competição entre os ânions oxalato da solução com o AX pelos metais.

### *VI.5 Calibração usando amostras de plantas*

A análise detalhada dos resultados obtidos para a determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e ferro em plantas, usando padrões aquosos para preparar as soluções utilizadas na calibração dos modelos, mostrou diversos aspectos conclusivos sobre o método proposto. Incluem-se entre estes:

1. possibilidade de uso do mesmo espectro para a calibração e a determinação de alumínio e de ferro nas amostras;
2. uso de um único modelo de calibração para a determinação simultânea de alumínio e ferro, o que é feito usando o algoritmo PLS-2;
3. aceitação dos valores reportados para a determinação dos dois metais estudados, segundo os critérios da IPE;
4. equivalência estatística entre as concentrações encontradas usando o método proposto e as determinações por ICP-AES para alumínio e ferro, verificada aplicando-se o teste F para o conjunto de amostras analisado, nível de 95% de confiança.

Por outro lado, apesar destes aspectos, as concentrações de alumínio encontradas nos extratos de folhas parecem estar sendo sistematicamente subestimadas em relação às concentrações encontradas nos mesmos extratos usando o ICP, como pode ser verificado na Tabela 6.2. No caso da determinação de ferro este comportamento não foi detectado.

Entre as explicações possíveis para este comportamento incluía-se a presença de um erro sistemático, cometido durante o processamento de amostras ou soluções empregadas na

calibração (conjuntos de calibração e validação) que tivesse resultado na presença de amostras anômalas em alguma etapa do trabalho. Caso este erro tivesse sido cometido na preparação das soluções, o modelo desenvolvido poderia estar sofrendo distorções ou, ainda, um modelo com um número de variáveis latentes diferente do ótimo poderia ter sido selecionado. Por outro lado, se o erro tivesse sido cometido no processamento das amostras, as determinações poderiam estar sendo realizadas fora do espaço experimental calibrado. Verificou-se experimentalmente que nenhuma destas situações estava ocorrendo, pois substituíram-se todas as soluções preparadas, inclusive as soluções-padrão estoque, recalcularam-se os modelos e fizeram-se determinações usando extratos de amostras-controle do IAC com os novos modelos preparados.

As explicações mais prováveis seriam a formação de fosfatos de alumínio ou a oclusão do alumínio em sílica, além de outros materiais que não sofreram mineralização completa nos extratos, como discutido anteriormente. Esse material poderia estar levando à obtenção de resultados subestimados na determinação espectrofotométrica de alumínio. Assim, a diferença entre as concentrações de alumínio encontradas e os valores de referência (determinações por ICP) poderia ser atribuída à interferências não específicas, decorrentes do efeito da matriz.

As folhas dos vegetais são matrizes complexas, pois diversos elementos e espécies químicas podem estar presentes, incluindo os interferentes, em faixas de concentrações diferentes e amplas, em diversas combinações, tornando-se variáveis difíceis de se controlar ou de se reproduzir.

Uma alternativa interessante, usada em calibração multivariada especialmente quando métodos não destrutivos de análise de amostras são utilizados, consiste em empregar amostras reais na fase de calibração dos modelos e não apenas na fase de validação (Martens e Naes, 1989). Este tipo de procedimento é muito usado na realização de medidas "on-line" em processos industriais ou quando não há reação química envolvida na determinação dos elementos ou componentes de interesse. Neste caso, devido às características de métodos de calibração multivariada como o PLS, PCR e redes neurais, é possível compensar os efeitos da matriz e otimizar os modelos, selecionando a informação química desejada.

No entanto, quando se pretende modelar sistemas ambientais e biológicos, este procedimento costuma ser problemático, pois nem sempre é fácil conseguir um número de amostras suficiente, distribuídas com certa uniformidade na faixa de concentração a ser estudada, para que seja possível preparar um conjunto de calibração adequado. Por isso, o preparo de soluções usando padrões aquosos para a calibração continua a ser muito utilizado e, quando este é inviável ou apresenta problemas, ainda se procura adicionar concentrações

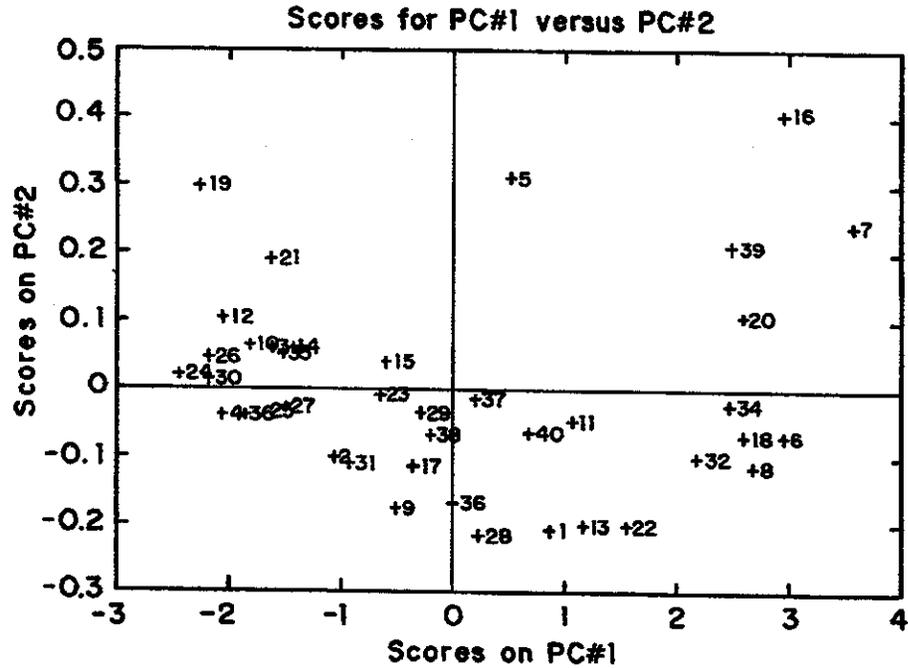
conhecidas do(s) elemento(s) ou componente(s) de interesse em amostras mais ou menos caracterizadas para simular as condições encontradas na matriz desejada (Hemadéz-Arteseros et al., 2000; Blanco, et al., 2000; Azubel, et al., 1999; Ni et al., 2000; Hemadéz et al., 2000).

Nosso objetivo nesta etapa do projeto foi o de avaliar o efeito (vantagens e desvantagens) do uso de amostras reais como conjunto de calibração no modelamento do sistema químico em estudo. Além disso, para avaliar melhor a capacidade preditiva das possibilidades exploradas utilizou-se um número relativamente grande de amostras.

O conjunto de calibração, com 40 espectros, a partir do qual desenvolveram-se os estudos seguintes, encontra-se descrito na Tabela 5.4. As amostras que deram origem a estes espectros tiveram suas concentrações determinadas por ICP e continham alumínio entre 7,6 e 2949 mg kg<sup>-1</sup> e ferro entre 55 e 2348 mg kg<sup>-1</sup>. Considerando-se os fatores de diluição, este conjunto possibilita o desenvolvimento de uma calibração entre a 0,02 e 1,16 mg L<sup>-1</sup> para alumínio e 0,10 e 1,05 mg L<sup>-1</sup> para ferro, na solução utilizada para o registro dos espectros (balão de 50 mL). Nesse estudo, um único conjunto foi utilizado para avaliar a capacidade preditiva dos modelos, em oposição aos conjuntos de validação contendo soluções padrão do planejamento fatorial inicial ou amostras, usados anteriormente. As amostras que deram origem a este conjunto, com 60 espectros, tinham entre 29 e 2889 mg kg<sup>-1</sup> de alumínio e entre 70 e 2371 mg kg<sup>-1</sup> de ferro. Considerando-se os fatores de diluição, este conjunto possibilitaria previsões entre 0,06 e 1,18 mg L<sup>-1</sup> para alumínio e 0,12 e 1,04 mg L<sup>-1</sup> para ferro, na solução utilizada para o registro dos espectros (balão de 50 mL).

A seleção das 40 amostras do conjunto de calibração inicial foi feita empiricamente, considerando-se que na calibração com padrões aquosos o conjunto de calibração tinha 26 soluções e o planejamento fatorial completo (calibração + validação), totalizando 36 soluções. Admitiu-se, portanto, que este seria um número suficiente para a construção de modelos funcionais.

A análise com PCA para o conjunto de 40 espectros mostrou que dois componentes principais são suficientes para explicar 99,7% da variância deste conjunto de dados. A análise de gráfico de "scores" (Figura 6.16), com o auxílio da Tabela 5.4, permite verificar que os "scores" dos espectros estão distribuídos em função das concentrações de alumínio e ferro, como obtido para o planejamento usando as soluções aquosas, como por exemplo para as amostras 9, 19 e 16. É interessante observar também que não é possível distinguir o ano em que as amostras foram distribuídas pelo programa IPE, o que confirma a ausência de alterações químicas nas amostras durante este período, como por exemplo as amostras 7, 16 e 39 (Houba et al., 1995).



**Figura 6.16** - Gráficos dos scores para as componentes principais 1 e 2, obtidas através da análise de componentes principais dos espectros das amostras de folhas descritas na Tabela 5.4. Os espectros foram centrados na média.

### **Seleção dos conjuntos de calibração e desenvolvimento de modelos**

Utilizando-se o algoritmo de Kennard e Stone, no modo de cálculo direto da distância euclidiana e no seu modo de cálculo a partir das componentes principais, verificou-se que 25 espectros do conjunto com 30 amostras foram coincidentes, o que representaria uma similaridade de cerca de 80%. No conjunto com 20 amostras, 10 espectros foram comuns aos 2 conjuntos, enquanto apenas 2 estavam em ambos os conjuntos de 10 amostras (similaridade de 20%). Esses dados apontam a conveniência de testar as duas alternativas para selecionar as amostras do conjunto de calibração para a construção dos modelos a fim de evitar possíveis distorções nos modelos desenvolvidos. Os conjuntos de calibração com os 10 espectros selecionados em cada caso são mostrados na Figura 6.17.

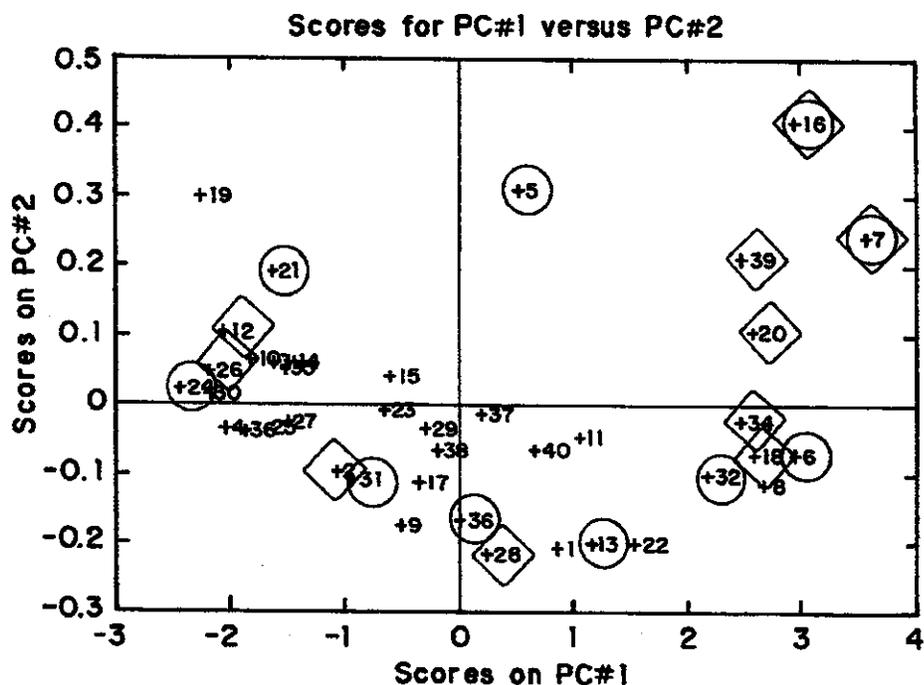


Figura 6.17 – Conjuntos de 10 amostras selecionados utilizando-se o algoritmo de Kennard e Stone: círculos – sem ortogonalização; losangos – com ortogonalização (PCA).

Após preparados os conjuntos de calibração com 30, 20 e 10 amostras, construíram-se modelos com 2 a 8 variáveis latentes, utilizando PLS-2. O mesmo foi feito com o conjunto de calibração com 40 amostras de plantas e para o conjunto de calibração constituído por soluções padrão aquosas, para comparação. Em todos os casos envolvendo calibração com as amostras reais, o melhor modelo foi obtido utilizando 4 variáveis latentes.

A capacidade preditiva dos modelos selecionados foi comparada através do teste F, como feito para as determinações em extratos de solos. Os valores de %RMSEP calculados em termos de  $\text{mg L}^{-1}$  na solução de leitura para as 60 amostras (Tabela 5.5) utilizadas na fase de validação são mostrados na Tabela 6.6.

Tabela 6.6- Avaliação da capacidade preditiva dos modelos construídos para plantas usando amostras reais.

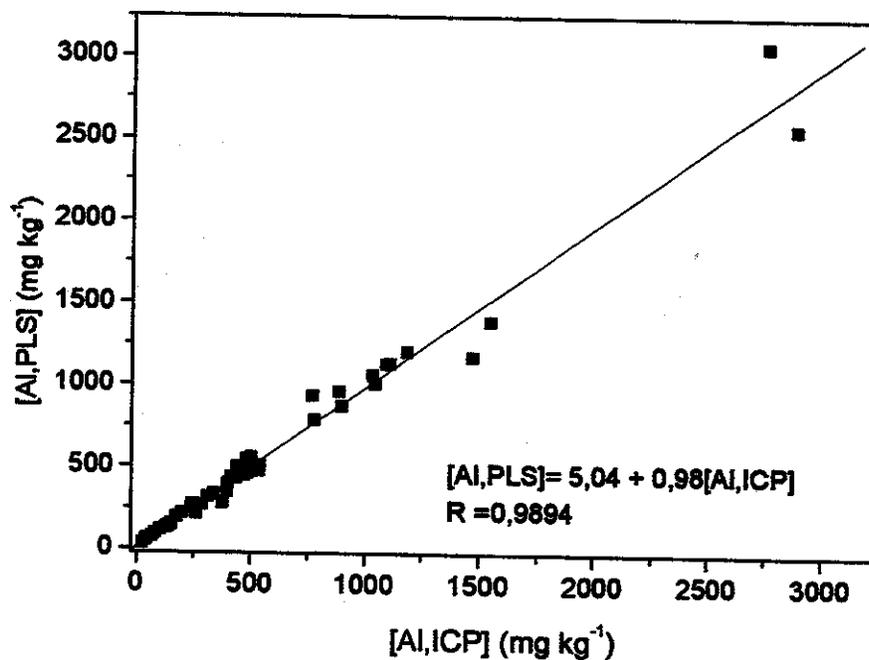
| Modo de seleção<br>Amostras na calibração | %RMSEP               |     |  |     |
|---|----------------------|-----|--|-----|
|   | Distância Euclidiana |     | Distância Euclidiana após PCA            |     |
|   | Al                   | Fe  | Al                                       | Fe  |
| 30  | 12,1                 | 8,1 | 10,8                                     | 7,0 |
| 20  | 12,1                 | 7,8 | 11,4                                     | 7,4 |
| 10  | 12,0                 | 7,8 | 12,5                                     | 9,1 |
| 40  | 10,8                 | 7,8 | F <sub>tabelado</sub> (60,60,95%) = 1,53 |     |
| 26*                                       | 17,2                 | 7,8 |  |     |

\* calibração usando soluções aquosas

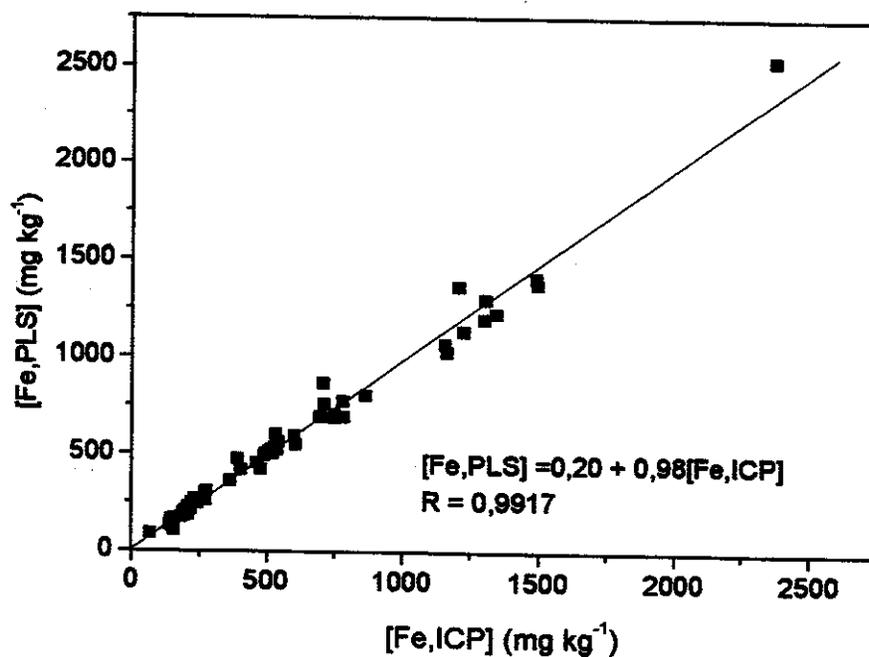
O modelo mais preciso foi aquele com 40 amostras no conjunto de calibração (menores valores de %RMSEP). Em relação a este conjunto, verificou-se que não há diferença significativa nas concentrações de alumínio e de ferro determinadas através de modelos que tiveram as amostras do conjunto de calibração selecionadas com o algoritmo de Kennard e Stone, para qualquer número de amostras, com e sem ortogonalização. Assim, além de ser possível construir modelos de calibração usando amostras de plantas para a determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e de ferro com AX, tendo como referência para a calibração as determinações por ICP, também seria possível utilizar apenas 10 amostras de plantas para calibrar o sistema químico em questão, obtendo bons resultados.

Na prática seria conveniente utilizar um conjunto de 15 amostras, empregando 10 como conjunto de calibração e 5 como conjunto de validação externa. O uso de algoritmos apropriados para a seleção das amostras do conjunto de calibração e de métodos instrumentais para obter os valores de referência deve ser considerado essencial pois, como observado nas determinações obtidas usando a calibração com soluções padrão aquosas, os valores de concentração medidos refletem também o processo de mineralização adotado e portanto, não devem ser substituídos por amostras certificadas.

Por outro lado, a diferença encontrada na previsão de alumínio na calibração com soluções aquosas é significativa em relação a todos os modelos calibrados com amostras de plantas, embora isto não aconteça em nenhum caso para a determinação de ferro e à primeira vista o uso alternativo de soluções padrão para a calibração dos modelos deveria ser descartada. No entanto, a avaliação dos resultados obtidos para as amostras empregadas na validação com os modelos construídos e com os valores obtidos por ICP através de curvas de correlação apresentou aspectos interessantes. As curvas de correlação obtidas para o conjunto de calibração com 40 amostras (melhores determinações) são apresentadas nas Figuras 6.18 e 6.19, para ilustração.



**Figura 6.18** - Curva de correlação para as concentrações de alumínio determinadas com o modelo calibrado com os espectros de 40 amostras de plantas e por ICP.



**Figura 6.19** - Curvas de correlação para as concentrações de ferro determinadas com o modelo calibrado com os espectros de 40 amostras de plantas e por ICP.

Na Tabela 6.7 foram incluídas as curvas de correlação mais relevantes para a discussão dos resultados. O índice PC ("principal component") será usado daqui em diante para discriminar os modelos nos quais as amostras do conjunto de calibração foram selecionadas com o algoritmo de Kennard e Stone, após ortogonalização.

**Tabela 6.7 – Curvas de correlação ( $\text{mg kg}^{-1}$  folha) para determinações com ICP e alguns modelos obtidos segundo o método proposto, usando amostras de plantas.**

| Amostras na calibração | Variáveis latentes | Al                    |                                |
|------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|
|                        |                    | Curva de correlação   | Coefficiente de correlação (r) |
| 40                     | 4                  | $Y = 5,04 + 0,98X$    | 0,9894                         |
| 10PC                   | 4                  | $Y = 6,13 + 0,92X$    | 0,9886                         |
| 10                     | 4                  | $Y = 8,66 + 0,93 X$   | 0,9759                         |
| 26*                    | 6                  | $Y = -14,53 + 0,93 X$ | 0,9816                         |
| Fe                     |                    |                       |                                |
| 40                     | 4                  | $Y = 0,20 + 0,98X$    | 0,9917                         |
| 10PC                   | 4                  | $Y = -18,29 + 1,06X$  | 0,9898                         |
| 10                     | 4                  | $Y = 2,47 + 0,96X$    | 0,9919                         |
| 26*                    | 6                  | $Y = 0,26 + 0,93X$    | 0,9878                         |

PC = cálculo da distância euclidiana após ortogonalização.

\* calibração com padrões aquosas

A análise preliminar dos coeficientes angular e linear das curvas de correlação e do coeficiente de correlação (r) apresentados na da Tabela 6.7 indicam que o modelo calibrado com 40 amostras fornece os resultados mais próximos aos do ICP. Por outro lado, nos modelos desenvolvidos a partir de conjuntos com 10 amostras na calibração e com soluções aquosas, os três parâmetros analisados distinguem-se desse, apresentando maiores coeficientes lineares, o que poderia levar a erros sistemáticos nas determinações. Em geral, os valores dos coeficientes angulares e dos coeficientes de correlação desses modelos indicam que os valores obtidos são mais distantes daqueles do ICP. Com o auxílio dos erros padrão dos coeficientes analisados, foi possível calcular os intervalos de confiança de cada coeficiente analisado e verificar que, embora não ocorra erro sistemático nas determinações (os coeficientes lineares dos modelos não são significativamente diferentes de zero), apenas os resultados obtidos usando o modelo calibrado com 40 amostras são comparáveis com os do ICP. Os coeficientes angulares e os coeficientes de correlação dos outros modelos foram significativamente diferentes de 1,00, a um nível de confiança de 95%. Dessa forma, os resultados dos modelos com 10 amostras de plantas são comparáveis aos obtidos usando soluções aquosas para a calibração.

A relativa perda de qualidade observada nos modelos com 10 amostras é, até certo ponto, esperada pois o número de amostras utilizado para calibrar as concentrações de

alumínio e de ferro na faixa de concentração desejada é reduzido e elas não estão, necessariamente, distribuídas de forma uniforme no espaço experimental, o que pode tornar o modelo deficiente em determinadas regiões ou bem melhor calibrado em outras. Esse efeito pode ser verificado comparando-se atentamente a distribuição das amostras (eixos x e y) selecionadas para os conjuntos de calibração com 10 amostras, nos 2 modos do algoritmo de Kennard e Stone, mostrados na Figura 6.17.

Essa análise ainda pode ser complementada através da comparação dos resultados obtidos e dos valores de referência da IPE para algumas amostras estrategicamente distribuídas na faixa de concentração calibrada, para avaliar a uniformidade dos modelos construídos. Para tal, dentre as várias amostras do programa IPE incluídas no conjunto de validação, 4 amostras distribuídas ao longo do ano 2000 foram analisadas em quadruplicata (IPE, 2000b). Os valores de referência, em  $\text{mg kg}^{-1}$  folha encontram-se na Tabela 6.8.

**Tabela 6.8-** Valores reportados pela IPE para as amostras utilizadas na comparação da capacidade preditiva dos modelos, ao longo da faixa de concentração de interesse.

| Dados IPE                         | Amostra                                    |           |          |         |
|-----------------------------------|--|-----------|----------|---------|
|                                   | 980  | 999       | 145      | 100     |
|                                   | <b>Al (<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b> |           |          |         |
| Mediana                           | 117  | 50,3      | 1223     | 440     |
| n° de resultados reportados       | 29   | 21        | 29       | 27      |
| Valores aceitos <sup>(a)</sup>    | 76-158                                     | 38,6-62,0 | 633-1813 | 269-611 |
| Valores reportados <sup>(b)</sup> | 94-171                                     | 28,4-99,9 | 766-1773 | 232-644 |
|                                   | <b>Fe (<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b> |           |          |         |
| Mediana                           | 179  | 151       | 1324     | 514     |
| n° de resultados reportados       | 99   | 94        | 100      | 98      |
| Valores aceitos <sup>(a)</sup>    | 151-208                                    | 131-171   | 913-1735 | 434-594 |
| Valores reportados <sup>(b)</sup> | 37-526                                     | 38-414    | 69-2570  | 48-5245 |

<sup>(a)</sup> maior e menor valor aceito  
<sup>(b)</sup> maior e menor valor reportado

As concentrações calculadas a partir dos valores determinados com os diversos modelos desenvolvidos são apresentadas na Tabela 6.9. Todas as médias das concentrações determinadas usando os modelos estudados foram aceitas, incluindo a calibração com padrões aquosos. Porém, nos modelos construídos empregando-se amostras selecionadas através do algoritmo de Kennard e Stone, no modo do cálculo direto da distância euclidiana, a determinação de alumínio na amostra 999 forneceu concentrações próximas ao limite de aceitação ( $62,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ) segundo o critério da IPE. Este resultado parece indicar que amostras selecionadas através do cálculo da distância a partir do PCA, podem produzir modelos de calibração mais equilibrados para a determinação de baixas concentrações de alumínio.

**Tabela 6.9 – Comparação entre as concentrações de alumínio e ferro nos extratos analisados, usando os diferentes modelos PLS desenvolvidos usando amostras de plantas.**

| Amostras na calibração | Amostra <sup>(a)</sup>    |             |            |          |
|------------------------|---------------------------|-------------|------------|----------|
|                        | 980                       | 999         | 145        | 100      |
|                        | Al (mg kg <sup>-1</sup> ) |             |            |          |
| 40                     | 134 ± 11                  | 51,6 ± 2,1  | 1127 ± 59  | 435 ± 14 |
| 30                     | 126 ± 9                   | 60,1 ± 3,7  | 1077 ± 76  | 434 ± 13 |
| 30PC                   | 126 ± 7                   | 50,8 ± 4,4  | 1126 ± 44  | 430 ± 13 |
| 20                     | 130 ± 9                   | 62,1 ± 3,6  | 1097 ± 82  | 447 ± 13 |
| 20PC                   | 124 ± 8                   | 46,3 ± 4,2  | 1118 ± 29  | 415 ± 13 |
| 10                     | 126 ± 11                  | 50,0 ± 3,6  | 1086 ± 107 | 456 ± 9  |
| 10PC                   | 135 ± 8                   | 58,0 ± 3,2  | 1050 ± 56  | 409 ± 14 |
| 26                     | 111 ± 7                   | 55,7 ± 13,5 | 1063 ± 56  | 417 ± 12 |
|                        | Fe (mg kg <sup>-1</sup> ) |             |            |          |
| 40                     | 200 ± 7                   | 158 ± 3     | 1213 ± 69  | 506 ± 14 |
| 30                     | 204 ± 7                   | 159 ± 3     | 1129 ± 58  | 502 ± 13 |
| 30PC                   | 207 ± 7                   | 167 ± 3     | 1213 ± 81  | 511 ± 15 |
| 20                     | 204 ± 7                   | 163 ± 3     | 1231 ± 69  | 510 ± 14 |
| 20PC                   | 208 ± 9                   | 161 ± 2     | 1200 ± 78  | 499 ± 14 |
| 10                     | 184 ± 7                   | 149 ± 9     | 1183 ± 72  | 497 ± 12 |
| 10PC                   | 189 ± 9                   | 165 ± 13    | 1285 ± 101 | 556 ± 14 |
| 26                     | 181 ± 12                  | 148 ± 2     | 1119 ± 88  | 490 ± 15 |

<sup>(a)</sup>média e estimativa do desvio padrão para 4 replicatas.

Do ponto de vista analítico, a calibração com amostras de plantas é sem dúvida o procedimento que pode vir a ser adotado, bastando verificar periodicamente as condições do processo de obtenção de extratos com a utilização de amostras de referência interna do laboratório. Além disso, é importante destacar que por se tratar de um modelamento indireto, baseado em outros métodos analíticos, é comum obter-se erros da ordem de 10% nas determinações com PLS, como nos melhores modelos desenvolvidos nesse trabalho. Esses valores são considerados satisfatórios quando se trabalha com calibração multivariada. Por outro lado, do ponto de vista agrônomo, o procedimento baseado na calibração com padrões aquosos poderia ser utilizado como uma boa estimativa das concentrações de alumínio em plantas, o que muitas vezes é satisfatório para em análises de rotina agrônoma.



## VII. Conclusão

---

A partir dos resultados obtidos nessa Tese verificou-se ser possível utilizar o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada como alternativa na determinação espectrofotométrica simultânea de elementos ou na eliminação de interferentes em matrizes complexas.

O método de determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e de ferro desenvolvido, independente da estratégia de calibração adotada, apresenta um procedimento experimental robusto, sendo relativamente menos sensível à presença de interferentes, tais como sulfato e fosfato. O zinco foi o único interferente capaz de formar complexos com o AX relevante nessas determinações. Quando as concentrações de ferro forem menores do que 100 mg kg<sup>-1</sup> e o zinco estiver presente em concentrações maiores do que 75 mg kg<sup>-1</sup>, erros maiores do que 5% são obtidos nas determinações de ferro

A calibração usando soluções padrão aquosas é um procedimento muito utilizado em química devido à disponibilidade dos padrões e facilidade de manipulação. Assim, o desenvolvimento de modelos utilizando esta estratégia de calibração não introduziria mudanças significativas quando ao treinamento de pessoal e custo envolvidos. Os resultados inicialmente obtidos indicavam que os modelos baseados nessa calibração poderia ser utilizados com poucas limitações. Porém, quando testados mais extensivamente (60 amostras de plantas do IPE e do IAC), verificou-se que os resultados obtidos para a determinação de alumínio tendem a ser significativamente menores do que as concentrações determinadas com o ICP.

Um exame detalhado das previsões das concentrações de alumínio feitas com o modelo para o conjunto de validação com as 60 amostras, selecionado de forma a representar a maior variação possível nas amostras de plantas, mostrou que os maiores desvios estão associados aos elevados teores de sílica presentes em algumas amostras, confirmando as hipóteses levantadas durante desenvolvimento desse trabalho. Assim, a determinação de alumínio nos extratos analisados está intimamente associada ao processo de mineralização das amostras. Considerando a rotina dos laboratórios de análise de solos e de plantas não há interesse em alterar esse processo, pois esse permite a determinação de macro e micronutrientes em espectrofotômetros de absorção e emissão atômica. Nesse caso, apesar desse efeito, as boas correlações com os valores do ICP e a reprodutibilidade verificada para as determinações com replicatas realizadas em plantas com teores "normais" de sílica, justificam o uso dos modelos de calibração com soluções aquosas na determinação simultânea de alumínio e de ferro para os

fins agronômicos ou quando uma boa estimativa da concentração de alumínio em amostras ambientais é suficiente. Vale destacar que se as amostras tipicamente analisadas na rotina do laboratório não apresentarem teores elevados de sílica, como as amostras de cravo e de grama analisadas, esse método representa uma boa alternativa para a determinação das concentrações de alumínio e de ferro em folhas.

Por outro lado, é possível utilizar extratos de folhas na calibração dos modelos PLS, empregando as determinações das concentrações de alumínio e de ferro por ICP como valores de referência para a construção de modelos. Embora os resultados mais próximos aos do ICP tenham sido obtidos usando 40 amostras na calibração, verificou-se ser possível utilizar apenas 10 amostras de plantas para obter resultados satisfatórios. No entanto, essas amostras devem ser selecionadas através de algoritmos específicos, como o de Kennard e Stone, para que sejam escolhidas da maneira mais uniforme possível, produzindo um modelo capaz de realizar determinações satisfatórias em toda a faixa calibrada. Além disso, para garantir o desempenho do modelo, os extratos das amostras que serão empregados na calibração devem ter suas concentrações de alumínio e de ferro determinadas por um método analítico de referência. Nesse caso, a influência da sílica na matriz é eliminada e se as amostras tipicamente analisadas pelo laboratório forem utilizadas para a calibração, resultados exatos e precisos em relação ao método de referência utilizado poderão ser obtidos. O modelo é mais sofisticado e o custo associado também é maior.

A determinação de alumínio na presença de ferro em extratos de solos foi feita com sucesso utilizando-se a calibração com soluções aquosas. Nessa situação, é necessário preparar apenas 15 amostras para a construir os modelos (10 para calibrar e 5 para prever), obtendo-se determinações de alumínio satisfatórias em extratos com baixas concentrações de ferro e também em extratos utilizados para a avaliação da fertilidade de solos, que foram dopados com ferro. A aplicação desse método na determinação simultânea de alumínio e de ferro em extratos de oxalato de amônio, utilizados para a classificação do solo, deverá ser melhor estudado.



*Referências  
bibliográficas*

## VII. Referências Bibliográficas

---

- Abreu, M. F. Extração e determinação simultânea por emissão em plasma de nutrientes e elementos tóxicos em amostras de interesse agrônomo. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de química. 1997.
- Abreu, C. A. de ; Abreu, M. F. de e Andrade, J.C. de. Determinação de cobre, ferro, manganês, zinco, cádmio, cromo, níquel e chumbo em solos usando solução de DTPA em pH 7,3 (Capítulo 16). IN: B. van Raij, J. C. de Andrade; H. Cantarella e J. A. Quaggio, *Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais*, Editora IAC, Campinas - SP, 2001.
- Abreu, C. A. de ; Abreu, M. F. de, Harada, L.S. e Andrade, J.C. de. 1997. The effects of the DTPA extraction conditions on the determination of micronutrients in Brazilian soils, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 28:1-11
- Andrade, J.C. de e Abreu, M.F. de. Instrumentação básica e medidas analíticas (Capítulo 5). IN: B. van Raij, J. C. de Andrade; H. Cantarella e J. A. Quaggio, *Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais*, Editora IAC, Campinas - SP, 2001.
- Andrade, J. C. de; Bruns, R.E.; Eiras, S. de P. 1993. Catalytic determination of Mo(IV) in plants using mono-segmented continuous-flow analysis and spectrophotometric detection, *Analyst*, 118: 213-217.
- Andrade, J, C de.; Ferreira, M.; Bacchan, N. e Bataglia, O.C. 1988. Spectrophotometric determination of boron in plants using monosegmented continuous flow analysis, *Analyst*, 113: 289-293.
- Azubel, M.; Fernandez, F.M.; Tudino, M.B. e Troccoli, O.E. 1999. Novel application and comparison of multivariate calibration for the simultaneous determination of Cu, Zn and Mn at trace levels using flow injection diode array spectrophotometry, *Anal. Chim. Acta*, 398: 93-102.
- Bataglia, O.C.; Furlani, A. M. C. ;Teixeira, J. P. F. ; Furlani, P. R. ; Gallo, J. R. Boletim Técnico nº 78, Serviço de Divulgação Técnico Científica do Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 1983, p.9.
- Bataglia, O.C. *Ferro*. (p.159-172) IN: Ferreira, M.E. e Cruz. M.C.P. da (editores). *Micronutrientes na Agricultura*. Associação para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba-SP, 1991.
- Beebe, K.R. e Kowalski, B.R. 1987. An introduction to multivariate calibration and analysis, *Anal. Chem.* 59:1007A-1017A.
- Bertsch, P.M. e Bloom, P.R. *Aluminum* (Capítulo 18) IN: D.L. Sparks (editor). *Methods of Soil Analysis. Part 3 – Chemical Methods*. SSSA Book Series nº5. Soil Sci. Soc. of Am., Inc. Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1996.

- Black, C. A. (editor). Methods of Soil Analysis, Part 2, n°9. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1965.
- Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S. e Bano R.G. 2000. On-line monitoring of starch enzymatic hydrolysis by near-infrared spectroscopy, *Analyst*, 125:749-752.
- Bremner, J.M. e Mulvaney, C.S. *Nitrogen-Total* (Capítulo 31). IN: Page, A.L. et al. (editores). Methods of Soil Analysis, Part 2, n°9. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1982.
- Brereton, R.G. 2000. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry, *Analyst*, 125:2125-2154.
- Campi, G.L. e Ingle, J.D. 1989. Fluorimetric reaction-rate method for the determination of aluminum with acid alizarin garnet R, *Anal. Chim. Acta*, 224:363-372.
- Cantarella, H.; Dechen, A. R. e Raij, B. van. 1981. Influência da origem do cloreto de potássio utilizado em extrações de amostras de solos nos resultados de alumínio trocável, *Bragantia*, 40:189-192.
- Cantarella, H. e Trivelin, P.C.O., Determinação de N total em solo (Capítulo 19) IN: B. van Raij, J. C. de Andrade; H. Cantarella e J. A. Quaggio, *Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais*, Editora IAC, Campinas - SP, 2001a.
- Cantarella, H. e Trivelin, P.C.O., Determinação de N inorgânico em solo pelo método da destilação a vapor (Capítulo 20) IN: B. van Raij, J. C. de Andrade; H. Cantarella e J. A. Quaggio, J.A., *Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais*, Editora IAC, Campinas - SP, 2001b.
- Cantarella, H.; Quaggio, J.A. e Raij, B. van, Determinação da matéria orgânica (Capítulo 10) IN: B. van Raij, J. C. de Andrade; H. Cantarella e J. A. Quaggio, *Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais*, Editora IAC, Campinas - SP, 2001a.
- Cantarella, H.; Quaggio, J.A. e Andrade, J.C. de, Controle de qualidade dos resultados analíticos (Capítulo 8) ) IN: B. van Raij, J. C. de Andrade; H. Cantarella e J. A. Quaggio, *Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais*, Editora IAC, Campinas - SP, 2001b.
- Chenery, E. M. 1948. Thioglycollic acid as an inhibitor for iron in the colorimetric determination of aluminum by means of Aluminon, *Analyst*, 73: 501-503.
- Cheng, K.L. 1959. A spectrophotometric study of the ferric xylenol orange complex, *Talanta*,3:147-150.
- Coscione, A.R.; Andrade, J.C. de; Raij, B. van. e Abreu, M. F.de. 2000a. An improved analytical protocol for the routine spectrophotometric determination of exchangeable aluminum in soils extracts with xylenol orange, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 31: 2027-2037.

- Coscione, A.R.; Andrade, J.C. de; Poppi, R.J.; Mello, C.; Raij, B. van. e Abreu, M. F. de. 2000b. Multivariate calibration applied to a highly interfering chemical system. The simultaneous spectrophotometric determination of aluminum and iron in plants using xylenol orange and PLS - Regression, *Anal. Chim. Acta*, 423: 31-40.
- Coscione, A.R.; Andrade, J.C. de e Raij, B. van. 1998. Revisiting titration procedures for the determination of exchangeable acidity and exchangeable aluminum in soils, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 29:1973 – 1982.
- Craig, G.; Collins, J. e Gebicki, J.M. 1999a. Determination of iron in solutions with the ferric-xylenol orange complex, *Anal. Biochem.*, 273:143-148.
- Craig, G.; Collins, J. e Gebicki, J.M. 1999b. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex, *Anal. Biochem.*, 273:149-155.
- Cunniff, P. (editor). Official methods of Analysis of AOAC International. AOAC International, 3rd revision, 16th edition, Gaithersburg, Estados Unidos, 1997.
- Despagne, F. e Massart, D. L. 1998. Neural networks in multivariate calibration, *Analyst*, 123:157R – 178R.
- Dodson, A. e Jennings, V.J. 1972. Semi-automated determination of aluminum with xylenol orange, *Talanta*, 19:801-803.
- Dominik, P. e Kaupenjohann, M. 2000. Simple spectrophotometric determination of iron in oxalate and hydrochloric acid soil extracts, *Talanta*, 51:701-707.
- Dougan, W. K. e Wilson, A.L. 1974. The absorptiometric determination of aluminum in water: A comparison of some chromogenic reagents and the development of an improved method, *Analyst*, 99:413-430.
- Edwards, A.C. e Cresser, M.S. 1983. An improved, automated xylenol orange method for the colorimetric determination of aluminum, *Talanta*, 30:702-704.
- Foy, C.D. 1988. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic plants, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 19:959-987.
- Ferreira, A.M.R.; Rangle, A.O.S.S. e Lima, J.L.F.C. 1998. Determination of iron in soils by flow-injection atomic absorption spectrometry, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 29:2407-2414.
- Geladi, P. e Kowalski, B.R. 1986. Partial least-squares regression: a tutorial, *Anal. Chim. Acta*, 185:1-17.
- Gemperline, P.; Long, J.R. e Gregoriou, V.S. 1991. Nonlinear multivariate calibration using principal components regression and artificial neural networks. *Anal. Chem.*, 63:2313-2323.

- Gholivand, M.B.; Bamdad, F. e Ghasemi, J. 1998. A potentiometric study of protonation and complex formation of xylenol orange with alkaline earth and aluminum ions, *Talanta*, 46:875-884.
- Helmke, P.A. *Neutron Activation Analysis* (Capítulo 6). IN: Sparks, D. L. (editor), Methods of Soil Analysis. Part 3 – Chemical Methods. Soil Science Society of America, Inc. & American Society of Agronomy, Inc.. Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1996.
- Hernandez-Arteseros, J.A.; Compano, R.; Ferrer, R. e Prat, M.D. 2000. Application of principal component regression to luminescence data for the screening of ciprofloxacin and enrofloxacin in animal tissues, *Analyst*, 125: 1155-1158.
- Hernandez, O.; Martin, E.; Jimenez, F.; Jimenez, A.I. e Arias, J.J. 2000. Use of partial least-squares regression for multicomponent determinations based on kinetic spectrofluorimetric data. Simultaneous determination of canrenone and spiro lactone in urine, *Analyst*, 125: 1159-1165.
- Hill, U. T. 1966. New direct spectrophotometric determination of aluminum in steel, spelter and iron ores, *Anal Chem.*, 38:654-656.
- Houba, V.J.G.; Uittenbogaard, J. e Pellen, P. 1996. Wageningen evaluating programmes for analytical laboratories (WEPAL), organization and purpose, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 27: 421-431.
- Houba, V.J.G.; Novozamsky, I. e van der Lee, J.J. 1995. Influence of storage of plant samples on their chemical composition, *Sci. Total Environ.*, 176: 73-79.
- International Plant – Analytical Exchange (IPE), Annual Report, Wageningen Agricultural University, Holanda, 1997.
- International Plant – Analytical Exchange (IPE), Quarterly Report 2000.1, January-March 2000, Wageningen Agricultural University, Holanda, 2000a.
- International Plant – Analytical Exchange (IPE), Quarterly Report 2000.2, April-June 2000, Wageningen Agricultural University, Holanda, 2000b.
- Jackson, M.L.; Chin, H.L. e Zelasny, L.W. *Oxides, Hydroxides and Aluminosilicates* (Capítulo 6) IN: Klute, A. (editor), Methods of Soil Analysis. Part 1 – Physical and Mineralogical Methods. Soil Science Society of America, Inc. & American Society of Agronomy, Inc.. 2<sup>nd</sup> edition Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1986.
- James, D. W. e Wells, K.L. *Soil sample collection and handling: technique based on source and degree of field variability* (Capítulo 3) IN: Westerman, R.L. (editor). Soil Testing and Plant Analysis. 3rd edition. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1990.

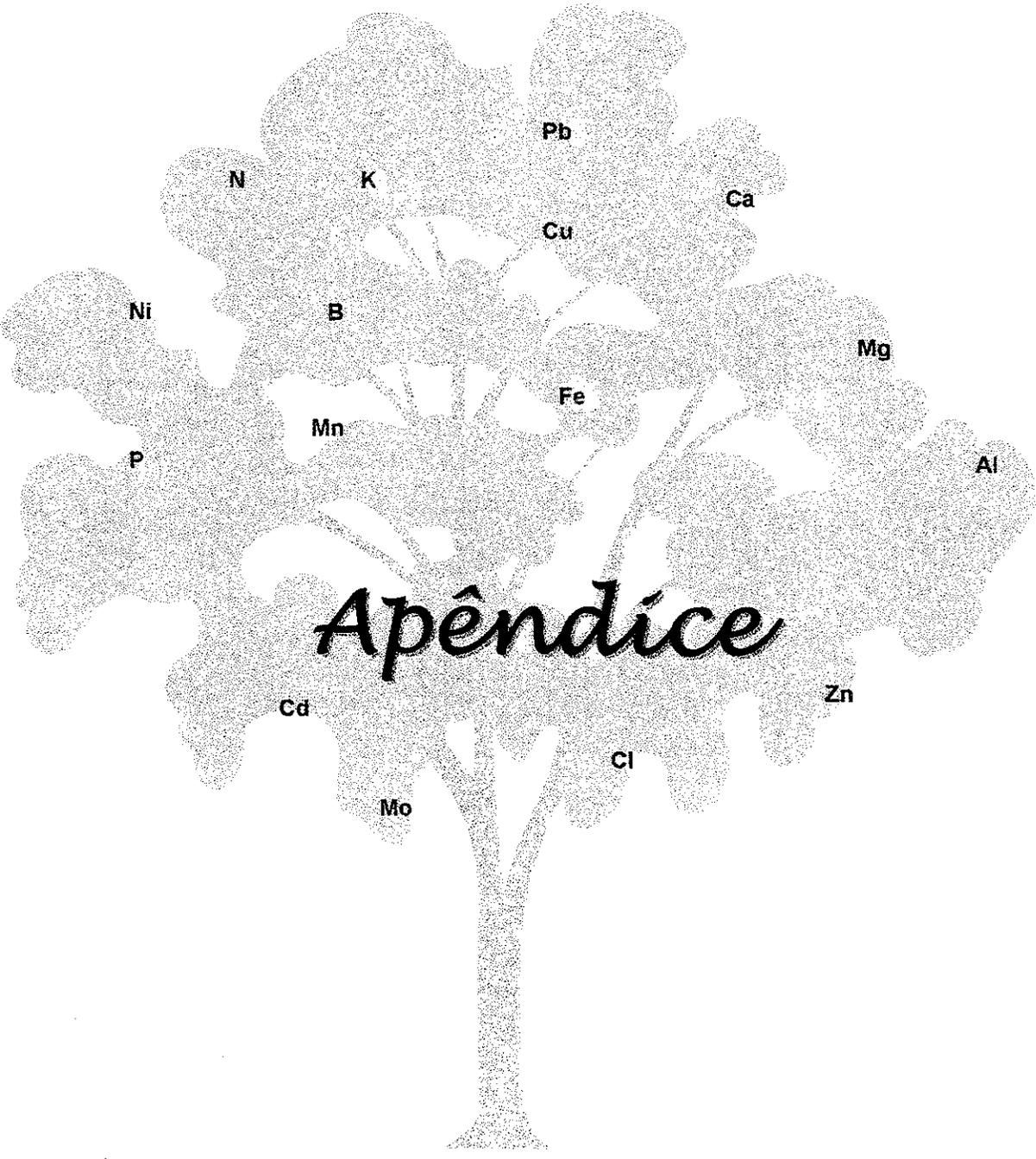
- Jayman, T.C.Z. e Sivasubramaniam, S. 1974. The use of ascorbic acid to eliminate interference from iron in the aluminon method for determining aluminum in plant and soil extracts, *Analyst*, 99:296-301.
- Jones, L.H. e Thurman, D.A. 1958. The determination of Al in soil, ash and plant material using eriochrome cyanine RA, *Plant and Soil*, 9(2): 131-142.
- Jones, J.B., Jr. e Case, V.W. *Sampling, Handling and Analysing Plant Tissue Samples* (Capítulo 15). IN: Westerman, R.L. (editor). Soil Testing and Plant Analysis. 3rd edition. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1990.
- Jones, J.B., Jr. 1990. Universal soil extractants: their composition and use, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 21:1091-1101.
- Kabata-Pendias, A. e Pendias, H. Trace Elements in Soils and Plants, CRC Press Inc., Boca Raton, 1984.
- Kamprath, E. J. 1970. Exchangeable Al as a criterion for liming leached mineral soils, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 27:277-280.
- Karathanasis, A.D. e Hajek, B.F. *Elemental Analysis by X-ray Fluorescence Spectroscopy* (Capítulo 7). IN: Sparks, D. L. (editor). Methods of Soil Analysis. Part 3 – Chemical Methods. Soil Science Society of America, Inc. & American Society of Agronomy, Inc.. Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1996.
- Kennard, R.W. e Stone, L.A. 1969. Computer aided design of experiments, *Technometrics*, 11:137-148.
- Kiciak, S. e Gontarz, H. 1986. Simultaneous spectrophotometric determination of o-cresol red, semi-xylenol orange and xylenol orange, *Talanta*, 33:314-348.
- Kiciak, S. 1989. Separation of xylenol-orange, semi-xylenol orange and o-cresol red, *Talanta*, 36:1101-1106.
- Lavine, B.K. 2000. *Chemometrics, Anal. Chem.*, 72: 91R-97R.
- Lavine, B.K. 1998. *Chemometrics, Anal. Chem.*, 70: 209R-228R.
- Loeppert, R.H. e Inskeep, W.P. *Iron* (Capítulo 23). IN: Sparks, D. L. (editor). Methods of Soil Analysis. Part 3 – Chemical Methods. Soil Science Society of America, Inc. & American Society of Agronomy, Inc.. Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1996.
- Lobinski, R. e Marckzenko, Z. 1992. Recent advances in ultraviolet-visible spectrophotometry, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 23:55-111.
- Marczenko, Z. Spectrophotometric determination of metals, Ellis Horwood, Ltd, Chichester, Reino Unido, 1976.

- Martens, H. e Naes, T. Multivariate Calibration, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, Reino Unido, 1989.
- Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, S.N.; Michotte, Y. e Kaufman, L. Chemometrics: a textbook. Elsevier, Amsterdam, Holanda, 1988.
- McLean, E.O. *Aluminum* (Capítulo 67). IN: Black, C. A. (editor) Methods of Soil Analysis, Part 2, nº9. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1965.
- McLean, E.O. *Soil pH and Lime requirement* (Capítulo 12). IN: Page, A.L. et al. (editores). Methods of Soil Analysis, Part 2, nº9. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1982.
- Miller, J.C. e Miller, J. N.. Statistics for Analytical Chemistry, Ellis Horwood, Chichester, Reino Unido, 3rd ed., 1990. (Capítulo 6).
- Mills, H. A. e Jones, J. B. Jr.. Plant Analysis Handbook II. Micromacro Publishing, Inc., Athens, Georgia, Estados Unidos, 1996 (revised).
- Mochizuki, T.; Toda, Y. e Kuroda, R. 1982. Flow-injection analysis of silicate rocks for total iron and aluminum, *Talanta*, 29:659-662.
- Montfort, M.A.J. van. 1996. Statistical remarks on laboratory-evaluating programs for comparing laboratories and methods, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 27:463-478.
- Munson, R.D. e Nelson, W.L. *Principles and Practices in Plant Analysis* (Capítulo 14). IN: Soil Testing and Plant Analysis. Westerman, R.L. (editor). 3<sup>rd</sup> edition. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1990.
- Murakami, M.; Yoshino, T. e Harasawa, S. 1967. Separation and equilibria of xylenol orange and semi-xylenol orange, *Talanta*, 14:1293-1307.
- Murakami, S.; Ogura, K. e Yoshino, T. 1980. Equilibria of complex formation between bivalent metal ions and 3, 3'-bis[N,N'-bis(carboxymethyl)aminomethyl]-o-cresolsulfonphthalein, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 53:2228 – 2235.
- Murakami, S. e Yoshino, T. 1981. Equilibria of aluminum(III) complexes with 3, 3'-bis[N,N'-bis(carboxymethyl)aminomethyl]-o-cresolsulfonphthalein, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 54:619 – 620.
- Ni, Y.; Wang, L. e Kokot, S. 2000. Voltammetric determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, propyl gallate and tert-butylhydroquinone by use of chemometric approaches, *Anal. Chim. Acta*, 412:185-193.
- Novozamsky, I.; Houba, V.J.G.; Daniel, R. C. and the members of CII,. 1993. Certification of carnation samples and their use in an international proficiency study, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 345: 198-201.

- Onishi, H. Photometric Determination of trace of metals. Part IIa. New York, John Wiley & Sons, 4th ed, 1986.
- Otomo, M. 1963. The spectrophotometric determination of aluminum with xylenol orange, Bull. Chem. Soc. Jpn., 36:809-813.
- Page, A. L. et al (editors). Methods of Soil Analysis, Part 2, nº9. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, Estados Unidos 1982.
- Peck, T. R. e Soltanpour, P.N. *The principles of soil testing (Capítulo 1)* IN: Westerman, R.L. (editor). Soil Testing and Plant Analysis. 3rd edition. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1990.
- Pritchard, D. T. 1967. Spectrophotometric determination of aluminum in soil extracts with xylenol orange, Analyst, 22:103-106.
- Raij, B. van e Quaggio, J. A.. *Methods used for diagnosis and correction of soil acidity in Brazil: an overview*. IN: Moniz A.C. et al. (editores). Plant Soil Interactions at low pH. Brazilian Soil Science Society, Brasil, 1997.
- Raij, B. van. 1994. New diagnostic Techniques: Universal soil extractants, Commun. Soil Sci Plant Anal. , 25:799-816.
- Raij, B. van. Fertilidade do solo e Adubação. Editora agrônômica Ceres Ltda., São Paulo, Brasil, 1991.
- Raij, B. van e Grohmann, F..1989. Densidade global de solos medida com anel volumétrico e por cachibagem de terra fina seca ao ar, Bragantia, 48:125 -130.
- Raij, B. van; Quaggio, J.A.; Cantarella, H.; Ferreira, M.E.; Lopes, A.S. e Bataglia, O.C. Análise química do solo para fins de fertilidade. Fundação Cargill, Campinas, 1987.
- Royset, O. 1985. Comparison of four chromogenic reagents for the flow-injection determination of aluminum in water. Anal. Chim. Acta. 178:223-230.
- Saraswat, J.P.; Sharma, C.L.; Sharma, A.. 1979. Thermodynamics of the interaction of bivalent transition metal ions with xylenol orange, J. Indian Chem. Soc., 56:257 – 259.
- Sena, M.M.de; Poppi, R.J.; Frighetto, R.T.S. e Valarini, P.J. 2000. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análises de solos, Química Nova, 23:547 – 556.
- Soltanpour, P.N.; Jones, J. B. Jr e Workman, S.M. *Optical emission spectrometry (Capítulo 2)*. IN: Page, A. L. et al (editors). Methods of Soil Analysis, Part 2, nº9. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1982.
- Soltanpour, P.N.; Johnson, G.W.; Worman, S.M.; Benton Jones, Jr, J. e Miller, R.O. *Inductively Coupled Plasma emission Spectrometry and Inductively Plasma-Mass Spectrometry*

- (Capítulo 5). IN: D. L. Sparks. (editor). Methods of Soil Analysis. Part 3 – Chemical Methods. Soil Science Society of America, Inc. & American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1996.
- Sparks, D. L. (editor). Methods of Soil Analysis. Part 3 – Chemical Methods. Soil Science Society of America, Inc. & American Society of Agronomy, Inc., Wisconsin, Estados Unidos, 1996.
- Specht, A. W.; Myers, A. T. e Uteana, O. *Elemental analysis by optical emission spectrography*. (Capítulo 53). IN: Black, C. A. (editor) Methods of Soil Analysis, Part 2, n<sup>o</sup>9. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1965.
- Thomas, E.V. 1994. A primer on multivariate calibration, *Anal. Chem.*, 66:795A-804A.
- Thornton, F.C.; Schaedle, M. e Raynal, D. J. 1985. Comparison of three techniques to determine aluminum content in micro samples of plant material, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 16:931-941.
- Tikhonov, V. I. 1965. Photometric determination of aluminum by means of xylenol orange, *J. Anal. Chem. USSR*. 20:1009-1013 [em russo: *Zh. Anal. Khim.* 20:941-1013].
- Tikhonov, V. I. 1986. Complex formation of metal ions with xylenol orange, *J. Anal. Chem. USSR* 41: 962 – 969. [em russo: *Zh. Anal. Khim.* 41:1353 – 1360].
- Trojanowicz, M; Szpunar-Lobinska, J. e Michalski, Z. 1991. Multicomponent analysis with a computerized flow injection system using LED photometric detection, *Mikrochim. Acta*, 1:159-169.
- Trojanowicz, M. e Szpunar-Lobinska, J. 1990. Simultaneous flow-injection determination of aluminium and zinc using LED photometric detection, *Anal. Chim. Acta*, 230:125-130.
- Westerman, R.L. (editor). Soil Testing and Plant Analysis. 3rd edition. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1990.
- Willoughby, E.J. 1986. A comparison of methods for measuring aluminum in KCl extract of soils, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 17(6), 667-677.
- Wold, S.; Kettaneh-Wold, N. e Skagerberg, B. 1989. Nonlinear PLS modeling, *Chemomom. Intell. Lab. Sys.*, 7:53-65.
- Wold, S. e Sjorstrom, M. 1998. Chemometrics, present and future success, *Chemom. Intell. Lab. Sys.*, 44:3-14.
- Wold, S.; Esbensen, K. e Geladi, P 1987. Principal component analysis, *Chemomom. Intell. Lab. Sys.*, 2:37 - 52
- Wright, R.J. 1989. Soil aluminum toxicity and plant growth, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 20:1479-1497.

- Wright, R.J. e Tuczunski, T. *Atomic absorption and Flame Emission Spectrometry* (Capitulo 4)  
IN: D. L. Sparks (editor). Methods of Soil Analysis. Part 3 – Chemical Methods. Soil Science Society of America, Inc. & American Society of Agronomy, Inc.. Madison, Wisconsin, Estados Unidos, 1996.
- Yoshino, T.; Murakami, S. e Ogura, K. 1979. Equilibria of iron(III) complexes with xylenol orange and methylthymol blue, *J. Inorg. Chem.*, 41:1011 – 1013.
- Yamada, M. e Fujimoto, M. 1971. Separation of semi-xylenol orange from xylenol orange by thin-layer chromatography with solvents giving stepwise pH change on the plate, *Bull. Chem. Soc. of Jpn*, 44:294.
- Yuan, T. L. 1959. Determination of exchangeable hydrogen in soils by a titration method, *Soil Sci.*, 88:164-167.
- Zolotov, Y.A.; Morosanova, E.I.; Zhalovannaya, S.V. e Dyukarec, S.S.. 1995. Continuous flow analysis: simultaneous spectrophotometric determination of metals, *Anal. Chim. Acta*, 308:386-396.



*Apêndice*

N

K

Pb

Ca

Cu

Ni

B

Mg

Fe

Mn

P

Al

Cd

Zn

Mo

Cl

# Apêndice

---

## Tutorial:

Determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e de ferro com PLS, usando soluções aquosas para a calibração, no software MatLab.

Cada espectro deve ser salvo em um arquivo ASCII, com a extensão *.dat*. É aconselhável usar um nome composto por letras e números, a partir do qual a amostra possa ser identificada facilmente. Os arquivos contendo os espectros das soluções usadas na calibração devem ser nomeados de forma seqüencial, usando o número empregado para identificá-las, como mostrado na Tabela 5.3 da parte experimental. Use, por exemplo, para a primeira solução de calibração: *c01.dat*

O primeiro passo para que os cálculos possam ser feitos usando o MatLab, é converter os arquivos em ASCII para um formato que possa ser manipulado dentro deste "software". Isto deve ser feito para todos os espectros, quer sejam soluções usadas para calibração ou amostras. Nos arquivos em ASCII, os dados vêm registrados em colunas. Na primeira coluna estão listados os comprimentos de onda lidos e na segunda coluna, as absorbâncias correspondentes. A primeira coluna não é considerada nos cálculos e deve ser descartada. Além disso, os espectros devem ser agrupados em matrizes e salvos segundo o padrão do MatLab.

Lembre-se de teclar "E" após digitar cada comando.

### Carregando e convertendo arquivos ASCII

1. Copiar todos os arquivos contendo os espectros no formato ASCII (*.dat*) para a pasta *temp* do disco rígido do computador.
2. Clicar 2 vezes sobre o ícone MatLab para carregar o programa.
3. Digitar `load c:\temp\[nome_do_arquivo_].dat` para carregar o arquivo. Repetir este procedimento até que todos os arquivos tenham sido carregados. Para as soluções do planejamento experimental utilizado para construir o modelo, repetir este procedimento para os arquivos de *c01.dat* até *c36.dat*
4. Digitar `[nome_do_arquivo_] = [nome_do_arquivo_](:,2);` para cada arquivo carregado. Esse procedimento serve para excluir a primeira coluna dos arquivos.  
➤ Atenção: Não sair do MatLab neste ponto. Se você carregou as soluções de calibração vá para o próximo item. Se você já preparou a calibração siga para previsão.

## Calibração

1. Para gerar a matriz de calibração, digitar exatamente, dando espaço entre os números:  
`cal=[ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 1 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26];`
2. Para que o modelo possa ser calculado, cada linha da matriz deve corresponder a um espectro. Para inverter a matriz, colocando-as desta forma digitar: `cal=cal'`;
3. Digitar `cal=mncn(cal)`; para centrar os dados na média;
4. Para salvar apenas a matriz no formato padrão lido pelo MatLab, na pasta *temp* do seu HD, podendo recuperá-la sem ter que começar tudo novamente digite: `save c:\temp\cal cal` ou `save a:\cal cal`, para salvar em disco.
5. Para gerar a matriz de previsão (validação externa) digitar exatamente, dando espaço entre os números:

`pre=[27 28 29 30 31 32 33 34 35 36];`

6. Digite `pre=pre'`;  
`pre=mncn(pre)`;  
`save c:\temp\pre pre`  
para inverter, centrar na média e salvar essa matriz.

7. Para preparar as matrizes de concentrações, utilizadas nos cálculos digitar exatamente:  
(matriz de concentrações para o conjunto de calibração)  
`tgcal=[0,0;0.2,0;0.4,0;0.8,0;1,0;0,0.2;0.4,0.2;0.6,0.2;0.8,0.2;0,0.4;0.2,0.4;0.4,0.4;0.6,0.4;1,0.4;0,0.6;0.2,0.6;0.6,0.6;0.8,0.6;0.2,0.8;0.4,0.8;0.8,0.8;1,0.8;0,1;0.4,1;0.6,1;1,1];`

salve essa matriz!

(matriz de concentrações para o conjunto de previsão)

`tgpre=[0.6,0;0.2,0.2;1,0.2;0.8,0.4;0.4,0.6;1,0.6;0,0.8;0.6,0.8;0.2,1;0.8,1];`

salve essa matriz!

8. Para calcular os modelos digitar: `[p,q,w,t,u,b,ssqdif] = pls(cal,tgcal,3)`;  
onde *cal* e *tgcal* são as matrizes de calibração 3 é o número de variáveis latentes que você será utilizado no cálculo. A resposta mostrada na tela será a variância explicada com 3 variáveis latentes, nos blocos *x* e *y*. Construiremos modelos com 4, 5 e 6 lvs, calculando o %RMSE associado a cada caso, para selecionar o modelo mais adequado para as determinações. O programa irá calcular também diversos parâmetros relacionados ao modelo, que não serão utilizados nesse procedimento específico. Para maiores informações sobre esses parâmetros você pode digitar: `help pls`.
9. Para fazer determinações utilizando a matriz de calibração, avaliando o ajuste da calibração e calcular o %RMSE digitar:

`[ypred,res,tsq]=modlpred[cal,pls];`

teclar "E" após cada gráfico, quando o prompt voltar para a tela do MatLab digitar:

`s=(ypred-tgcal).^2;`  
`sep=sqrt((sum(s))/26);`

**rmsec=((sep/0.4769)\*100)**

a resposta do programa será o %RMSE calculado para alumínio e ferro, com 3 variáveis latentes. Tome nota desses valores e repita o processo para a matriz de previsão para avaliar a capacidade preditiva do modelo digitando:

**[ypred,res,tsq]=modlpred[ pre,pls];**

teclar "E" após cada gráfico, quando o prompt voltar para a tela do MatLab digitar:

**s=(ypred-tgpre).^2;**

**sep=sqrt((sum(s))/10);**

**rmsep=((sep/0.5600)\*100)**

10. Repita os passos 8 e 9, usando 4 e 5 variáveis latentes no lugar de 3, no comando do passo 8. Tome nota de todos os valores de rmsec e rmsep calculados e construa um gráfico em função do número de variáveis latentes no modelo. Não encerre o MatLab! O número de variáveis latentes apropriado é aquele em que os erros calculados são mínimo e ocorre a menor diferença entre os valores obtidos para os conjuntos de calibração e de previsão.
11. Volte ao MatLab e digite: **[p,q,w,t,u,b,ssqdif] = pls(cal,tgcal,lv);** substituindo lv pelo número de variáveis selecionadas. Digite: **save c:\[dir]\pls** para salvar o modelo no diretório desejado no seu HD

## Previsão

1. Clicar 2 vezes sobre o ícone MatLab para carregar o programa.
2. Digitar **load c:\temp\[nome\_do\_arquivo].dat** para carregar os arquivos contendo os espectros das amostras para determinação. Repetir este procedimento até que todos os arquivos tenham sido carregados.
3. Digitar **[nome\_do\_arquivo] = [nome\_do\_arquivo](:,2);** para cada arquivo carregado.
4. Montar e salvar uma matriz para os espectros das amostras, como por exemplo:  
**am=[ am1 am2 am3 ];**  
**save c:\temp\lam am**
5. Digitar **load c:\[dir]\pls** para carregar o modelo
6. Para fazer a previsão digite: **[ypred,res,tsq]=modlpred[am,pls];**
7. Para ver os resultados das determinações das amostras digite: **ypred** (a primeira coluna corresponde ao alumínio e a segunda ao ferro).
8. Para salvar as determinações num arquivo ASCII, que pode ser aberto numa planilha eletrônica, por exemplo no Excel para outros cálculos digite:  
**save c:\temp\[nome\_do\_arquivo].dat -ascii -double**